

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Paula Werneck Steimback

Efeitos da frequência e da pressão de platô inspiratória durante o suspiro em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Rio de Janeiro

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Paula Werneck Steimback

Efeitos da frequência e da pressão de platô inspiratória durante o suspiro em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Área de Concentração em Ciências Pneumológicas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Ciências Pneumológicas.

Orientadores:

Prof. Dra. Patricia Rieken Macedo Rocco

Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva

Rio de Janeiro

2008

Steimback, Paula Werneck

Efeitos a frequência e da pressão de platô inspiratória durante o suspiro em modelo experimental de lesão pulmonar aguda / Paula Werneck Steimback. -- Rio de Janeiro : Faculdade de Medicina, 2008.

xvii, 119 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Patricia Rieken Macedo Rocco e José Roberto Lapa e Silva

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, 2008.

Referências bibliográficas: f. 71-78

1. Respiração com pressão positiva - Métodos. 2. Modelos animais. 3. Síndrome do desconforto respiratório do adulto. 4. Mecânica respiratória. 5. Apoptose. 6. Clínica Médica - Tese. I.

Paula Werneck Steimback

Efeitos da frequência e da pressão de platô inspiratória durante o suspiro em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Área de Concentração em Ciências Pneumológicas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Ciências Pneumológicas.

APROVADA EM:

---

Prof. José Rodolfo Rocco, MD, PhD, UFRJ

---

Prof. Hugo Caire Castro, MD, PhD, FIOcruz

---

Prof. Eduardo Rocha, MD, PhD, UFRJ

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Pulmonar 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), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ).

## Dedicatória

Ao André,  
o único que me faz suspirar,  
amor incondicional,  
incansável e  
infinito.

## Agradecimentos

À Profa Patrícia Rocco, minha orientadora, pelo estímulo em todas as horas, exemplo de pesquisadora, médica e mulher.

Ao Prof José Roberto Lapa e Silva pela orientação e dedicação dispensadas.

Ao Prof Paolo Pelosi pela inestimável contribuição desde a concepção deste trabalho.

Ao Prof Marcelo Morales e à Prof Vera Capelozi pela participação essencial na elaboração da biologia molecular e microscopia eletrônica.

À Gisele Pena e Andréia Rzezinski, minhas amigas, que estiveram ao meu lado em todas as etapas deste projeto e cuja participação foi fundamental para tornar este projeto realidade.

Ao André Benedito sempre disponível para preparação de toda infra-estrutura que eu precisava.

A todos os alunos do Laboratório de Investigação Pulmonar pela ajuda sempre disponível.

Ao Dr Marcos Knibel, meu chefe e guru, pela compreensão de sempre e pelo carinho.

Ao Dr Christian Nejm Roderjan, meu amigo de todo dia, pela compreensão e companheirismo inesgotáveis.

A todos os colegas de trabalho do Hospital São Lucas cuja compreensão foi fundamental para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, Penha e Paulo, por terem me dada força, entendido minhas ausências e me incentivado a ser perseverante.

Aos meus irmãos Cristiano, Carlota e Lauremiro e minha cunhada Patricia pela confiança e compreensão.

Ao meu sobrinho João Pedro e minha afilhada Júlia que ficaram sem a tia todo esse período.

À minha sogra Lia que vibrou cada instante para que esse trabalho acontecesse e ao meu sogro Hugo que me ajudou até na parte técnica deste trabalho.

## RESUMO

STEIMBACK, Paula Werneck. Efeitos da frequência e da pressão de platô inspiratória durante o suspiro em modelo experimental de lesão pulmonar aguda. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Área de concentração em Ciências Pneumológicas) - Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Apesar da manobra de recrutamento alveolar com suspiro acarretar melhora da mecânica e oxigenação na lesão pulmonar aguda (LPA), as elevadas frequência e pressão de platô inspiratória (Pplat) geradas pelo suspiro podem induzir e/ou intensificar o estresse pulmonar. Esse estudo objetiva avaliar os efeitos de diferentes frequências e Pplat durante o suspiro em modelo experimental de LPA. Foram estudados ratos saudáveis [salina (0,1 ml, ip)] e com LPA induzida por paraquat (15 mg/kg, ip). Após 24h, os ratos foram anestesiados e ventilados mecanicamente com volume corrente = 4 ml/kg e PEEP = 5 cmH<sub>2</sub>O. As manobras de recrutamento utilizadas foram: pressão contínua nas vias aéreas (MR-CPAP; 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos) ou suspiro. O suspiro foi realizado de três formas por período de 1 hora: a) 3 suspiros consecutivos por minuto com Pplat=40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40), b) 1 suspiro a cada seis minutos com Pplat=40 cmH<sub>2</sub>O (S10/40), c) 1 suspiro a cada seis minutos com Pplat=20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20). A elastância estática do pulmão (Est,L) e a pressão arterial parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) melhoraram independentemente da frequência do suspiro. S180/40 acarretou hiperinsuflação alveolar, lesão ao epitélio alveolar, aumento da apoptose de células epiteliais no rim e pulmão associados à elevada expressão de RNAm para procolágeno tipo III (PCIII). S10/40 induziu melhora da mecânica e PaO<sub>2</sub>, assim como redução da apoptose de células renais e pulmonares e da expressão de RNAm para PCIII. No grupo S10/20 houve piora da elastância e da oxigenação, porém a expressão do RNAm para PCIII foi similar ao grupo S10/40.

Em conclusão, sob as condições experimentais descritas neste estudo, a redução da frequência do suspiro acarretou melhora morfofuncional enquanto que a diminuição da pressão piorou a mecânica e oxigenação sem efeitos protetores ao parênquima pulmonar.

Palavras chaves: Elastância, pressão transpulmonar, manobras de recrutamento, apoptose.

## ABSTRACT

STEIMBACK, Paula Werneck. Effects of frequency and inspiratory plateau pressure during sigh in experimental acute lung injury. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Área de concentração em Ciências Pneumológicas) - Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Although sigh presented a beneficial effect on lung mechanics and oxygenation in acute lung injury (ALI), we tested the hypothesis that frequency and plateau pressure (Pplat) during sigh might yield or intensify lung mechanical stress. We studied healthy [saline (0.1 ml, *ip*)] and paraquat-induced ALI (15 mg/kg, *ip*) rats. Twenty-four hours after induction, rats were anesthetized and mechanically ventilated with tidal volume=4 ml/kg and PEEP=5 cmH<sub>2</sub>O. Recruitment maneuvers were then applied using continuous positive airway pressure (RM-CPAP, 40 cmH<sub>2</sub>O for 40 s) or sigh. Sigh was applied using three different strategies, during one hour: a) 3 consecutive sighs/min and Pplat=40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40), b) 1 sigh every 6 min and Pplat=40 cmH<sub>2</sub>O (S10/40), and c) S10 with Pplat=20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20). Lung static elastance (Est,L) and oxygenation (PaO<sub>2</sub>) improved independently of sigh frequency applied. S180/40 showed alveolar hyperinflation, alveolar epithelium lesion, increased rates of lung and kidney's epithelial cells apoptosis associated with high type III procollagen (PCIII) mRNA expression. S10/40 yielded a further decrease in Est,L, improvement in PaO<sub>2</sub>, marked reduction in alveolar hyperinflation, lung and kidney's epithelial cell apoptosis, and PCIII mRNA expression. Est,L and the amount of alveolar collapse were higher in S10/20 than S10/40, but PCIII mRNA expression remained similar to S10/40. In conclusion, under the present experimental conditions, the reduction in sigh frequency led to a better morphofunctional and molecular profile, and the association with reduced Pplat worsen lung mechanics and histology with no further protective effects on lung parenchyma.

Key words: elastance, transpulmonary pressure, recruitment maneuvers, apoptosis

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	18
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.3 FISIOPATOLOGIA.....	20
1.4 LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA .....	23
1.4.1 <i>Barotrauma</i> .....	24
1.4.2 <i>Volutrauma</i> .....	24
1.4.3 <i>Atelectrauma</i> .....	25
1.4.4 <i>Biotrauma</i> .....	25
1.5 ESTRATÉGIA DE VENTILAÇÃO PROTETORA .....	27
1.6 MANOBRAS DE RECRUTAMENTO ALVEOLAR.....	29
1.6.1 <i>Pressão positiva contínua nas vias aéreas</i> .....	29
1.6.2 <i>Manobra de Recrutamento com Pressão Controlada e aumento progressivo da PEEP</i> .....	30
1.6.3 <i>Suspiro</i> .....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	34
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	34
4.3 PREPARO DOS ANIMAIS.....	37
4.4 ELASTÂNCIA ESTÁTICA DO PULMÃO.....	41
4.5 MANOBRA DE RECRUTAMENTO COM CPAP OU SUSPIRO.....	43
4.6 REMOÇÃO DOS PULMÕES.....	43
4.7 HISTOLOGIA PULMONAR.....	44
4.7.1 <i>Microscopia Óptica</i> .....	44
4.7.2 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> .....	46
4.8 APOPTOSE.....	47
4.8.1 <i>Detecção in situ de células apoptóticas</i> .....	47
4.8.2 <i>Expressão de Fas-L por imunohistoquímica</i> .....	48
4.9 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO .....	49
4.9.1 <i>Extração de RNA Total do Tecido Pulmonar</i> .....	49
4.9.2 <i>Transcrição Reversa (RT)</i> .....	50
4.9.3 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	51
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1 ANÁLISE DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO NO SANGUE ARTERIAL.....	53
5.2 MECÂNICA PULMONAR.....	54
5.3 MORFOMETRIA DO PARÊNQUIMA PULMONAR.....	55
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	55
5.5 APOPTOSE DE CÉLULAS EPITELIAIS .....	58
5.6 EXPRESSÃO DO RNAm PARA PRÓ COLÁGENO TIPO III.....	60

<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. ANEXO I.....</b>	<b>76</b>

Índice de Figuras	
<b>Figura 1.</b> Desenho experimental. ....	35
<b>Figura 2.</b> Montagem experimental. ....	37
<b>Figura 3.</b> Traçados de volume (V), pressões transpulmonar (PL), esofagiana (Pes) e traqueal (Ptr) durante o ‘teste de oclusão ao final da expiração’. ....	39
<b>Figura 4.</b> Método de oclusão ao final da inspiração.....	40
<b>Figura 5.</b> Retículo com 100 pontos e 50 linhas para quantificação dos parâmetros morfométricos .....	44
<b>Figura 6.</b> Percentual de aumento da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $P_{aO_2}$ ) .....	52
<b>Figura 7.</b> Elastância estática do pulmão .....	53
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica da área ocupada por alvéolos hiperinsuflados (preto), colapsados (cinza) e normais (branco). ....	55
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia do pulmão e rim corados pela HE e TUNEL .....	58
<b>Figura 10.</b> Expressão do RNAm para procolágeno tipo III .....	60

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Critérios para definição de lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). .....	18
<b>Tabela 2</b> – Condições clínicas relacionadas a LPA/ SDRA .....	19
<b>Tabela 3</b> – Análise semi-quantitativa da microscopia eletrônica de transmissão no grupo LPA.....	56
<b>Tabela 4</b> – Análise semi-quantitativa da apoptose de células epiteliais do pulmão, rim, fígado e intestino delgado .....	57

## Abreviaturas

CPAP: continuous positive airway pressure (pressão positiva contínua nas vias aéreas)

CTRL: controle

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Est: Elastância estática

Fas-L: Fas ligante

FiO<sub>2</sub>: fração inspirada de oxigênio

H&E: Hematoxilina e eosina

IL: Interleucina

LPA: Lesão Pulmonar Aguda

NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

NR: não recrutado

NV: não ventilado

$\Delta P$ : Variação de pressão

PaO<sub>2</sub>: Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PCIII: procolágeno tipo III

PEEP: pressão expiratória final positiva

Pel: Pressão de retração elástica

Pel, rs: Pressão de retração elástica do sistema respiratório

Pel, w: Pressão de retração elástica da parede torácica

Pel, L: Pressão de retração elástica do pulmão

Pes: Pressão esofagiana

Pi: Pressão do sistema respiratório no ponto de inflexão

PCV: ventilação pressão controlada

PII: Pneumócito do tipo II

Ppl: Pressão pleural

Ptr: Pressão traqueal

Pw: Pressão da caixa torácica

MR-CPAP: grupo que recebeu manobra de recrutamento com CPAP 40cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos

RNA: Ácido ribonucléico

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

S80/40: grupo que recebeu 180 suspiros por hora com pressão inspiratória de 40cmH<sub>2</sub>O

S10/40: grupo que recebeu 10 suspiros por hora com pressão inspiratória de 40cmH<sub>2</sub>O

S10/20: grupo que recebeu 10 suspiros por hora com pressão inspiratória de 20cmH<sub>2</sub>O

TNF: fator de necrose tumoral

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end-labeling method*

V': Fluxo aéreo

V<sub>T</sub>: Volume corrente

VILI: lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica

VALI: lesão pulmonar associada à ventilação mecânica

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) caracteriza-se pelo acometimento agudo estrutural e funcional do pulmão, levando a hipoxemia grave, redução da complacência e da capacidade residual funcional associada a infiltrado pulmonar difuso e bilateral na telerradiografia de tórax (ARTIGAS, 1998). Desde a primeira descrição da síndrome (ASHBAUGH, 1967), diferentes critérios diagnósticos e terapias vêm sendo estudadas. Assim, na tentativa de uniformizar e simplificar o diagnóstico da SDRA, foi realizado o Consenso Americano-Europeu (BERNARD, 1994), onde foram definidos os seguintes critérios (Tabela 1):

Tabela 1 – **Critérios para definição de lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).**

	Início	Oxigenação	Rx tórax	Pressão Capilar Pulmonar
LPA	Agudo	$PaO_2/FiO_2 \geq 300$	Infiltrado bilateral	$\geq 18$ mmHg
SDRA	Agudo	$PaO_2/FiO_2 \geq 200$	Infiltrado bilateral	$\geq 18$ mmHg

$PaO_2$ : pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

$FiO_2$ : fração inspirada de oxigênio

De acordo com esses critérios, a SDRA corresponde à forma clínica mais grave e, a manifestação mais branda, convencionou-se chamar lesão pulmonar aguda (LPA).

Diversas condições clínicas podem acarretar a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (Tabela 2) (BERNARD, 1994). Do ponto de vista fisiopatológico, essas condições clínicas são divididas em lesões diretas ou indiretas dependendo da origem do insulto inicial. As lesões diretas são aquelas determinadas por agressões diretas ao parênquima pulmonar, com lesão primária do epitélio alveolar, como: pneumonia, broncoaspiração e trauma de tórax. Já as lesões indiretas têm seu foco inicial extra pulmonar, sendo causada por: sepse abdominal, pancreatite e politransusão de hemoderivados (GATTINONI, 1998), sendo a lesão primária do endotélio pulmonar.

**Tabela 2 – Condições clínicas relacionadas a LPA/ SDRA**

Lesões diretas	Lesões indiretas
Pneumonia	Sepse
Broncoaspiração	Pancreatite
Trauma de tórax	Politraumatismo
Inalação de Fumaça	Politransusão de hemoderivados
Embolia Gordurosa	Circulação extra – corpórea
Afogamento	

## **1.2 Epidemiologia**

A incidência de SDRA e LPA vem aumentando. De acordo com o banco de dados de um estudo multicêntrico e randomizado (ARDSNETWORK, 2000) a incidência da SDRA pode chegar a 64,2 casos por 10<sup>5</sup> pessoas-ano em hospitais com mais de 20 leitos de terapia intensiva, independente do *status* acadêmico

destes hospitais (GOSS, 2003). A prevalência da SDRA varia de 2,4% a 19,5%, sendo que esta diferença ocorre apesar dos critérios diagnósticos utilizados terem sido os mesmos em ambos relatos (VINCENT, 2003). Recente estudo realizado em 21 hospitais nos EUA, descreveu que a incidência de LPA chegou a 86 por 100.000 pessoas-ano, quando ajustada para idade (RUBENFELD, 2005).

A taxa de letalidade associada a SDRA está em torno de 50% desde a sua primeira descrição há quase quatro décadas. Naquela época, a alta letalidade estava relacionada a hipoxemia refratária. Atualmente, o óbito induzido por falência respiratória primária ocorre em somente 20% dos casos (MEAD, 2008), sendo a principal causa de morte a falência orgânica múltipla. Na maioria dos casos, a morte dentro de 72 horas de instalação da síndrome está relacionada à doença de base, enquanto o evento fatal tardio (após 72 h) decorre de sepse (MONTGOMERY, 1985). De fato, após o insulto inicial, os determinantes do prognóstico do paciente são: idade, falência orgânica múltipla, principalmente a insuficiência renal, e sepse (LUHR, 1999; VALTA, 1999; ESTEBAN, 2002). Zambom e Vincent analisando os trabalhos publicados na literatura de 1994 a 2006, evidenciaram grande variação na taxa de letalidade (de 15 a 72%, média de 43%) (ZAMBOM, 2008).

### **1.3 Fisiopatologia**

A principal característica da fisiopatologia da SDRA é a alteração da permeabilidade alvéolo-capilar (por quebra da integridade endotelial e epitelial), levando a edema pulmonar rico em proteínas associado à infiltração neutrofílica e disfunção do surfactante. A associação destes eventos acarreta prejuízo na troca gasosa (WEIBEL, 1983). O edema pulmonar resulta aumento do peso do pulmão, promovendo colapso das porções dependentes, que é agravado pelo gradiente

gravitacional formado na posição supina. O colapso das porções basais do pulmão torna-as não funcionais, de modo que apenas o terço mais superior do pulmão permanece com suas funções de troca. Esta pequena porção funcional do pulmão foi denominada *baby lung* (GATTINONI, 2001).

Quando o pulmão sofre uma agressão (seja esta de qualquer natureza) ocorre liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) [IL-1 $\beta$  e IL-8] (MARTIN, 1999). Esses mediadores determinam migração de leucócitos para o pulmão, promovendo liberação de radicais livres de oxigênio e proteases, que acarretam dano ao endotélio capilar e epitélio alveolar induzindo alteração funcional da barreira alvéolo-capilar pulmonar (CALANDRINO, 1988). A partir daí, proteínas saem do espaço vascular para o interstício e para o espaço alveolar levando a formação de um edema alveolar rico em proteínas, sangue e restos celulares. Esse edema alveolar acarreta inativação do surfactante, o que resulta em aumento da tensão superficial e colapso alveolar (WARE, 2001). O colapso alveolar juntamente com o edema alveolar induz distúrbio da relação ventilação–perfusão e aumento do espaço morto fisiológico determinando hipoxemia grave e muitas vezes hipercapnia (NUCKTON, 2002). O colapso alveolar ocasiona também prejuízo no funcionamento das unidades alveolares não comprometidas, já que através do mecanismo da interdependência alveolar as paredes alveolares se estiram devido ao colapso e/ou hiperdistensão de unidades vizinhas. O produto final deste desarranjo é um pulmão com complacência reduzida, aumento na resistência e hipertensão de artéria pulmonar. A SDRA é classicamente subdividida em três fases: exsudativa, proliferativa e fibrótica que apresentam diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e radiológicas (ROCCO, 2001; 2004, 2005, 2008). Na fase exsudativa há aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, lesão de

pneumócitos tipos I e II, desnaturação do surfactante pulmonar com subsequente formação de edema alveolar (WARE, 2000), hemorragia na superfície do parênquima, ductos alveolares dilatados, em contraste com alvéolos edemaciados e colapsados e membranas hialinas eosinofílicas ao longo do ducto alveolar. A fase proliferativa tem sido descrita iniciando-se no terceiro dia, e estendendo-se por sete dias ou mais, sendo o estágio de organização do exsudato intra-alveolar e intersticial adquirido na fase aguda. Os PII 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. Há aumento gradual de tecido intersticial com a evolução temporal da SDRA (WALLACE, 2002). Além disso, foram detectadas algumas fibrilas de colágeno recém-formadas nos espaços alveolares associadas com miofibroblastos (DOS SANTOS, 2006). Vários estudos sugerem que os mecanismos de resolução e reparo da lesão pulmonar em adultos são controlados, em parte, por vias regulatórias importantes na morfogênese e desenvolvimento pulmonar. A alteração na regulação dessas vias pode resultar em amplificação da lesão inicial e reparo desordenado, com ocorrência de fibrose. Muitos pacientes podem ter a SDRA resolvida nesse estágio, alguns, porém, evoluem para o reparo pulmonar, podendo atingir a fase fibrótica. Na fase fibrótica, observam-se alvéolos fibróticos e obliterados, irregularidades nas espessuras das paredes alveolares, associadas com dilatações e estreitamento dos espaços aéreos, além de um epitélio estratificado escamoso cubóide. O exsudato intra-alveolar se organiza, com deposição de fibrinogênio em áreas de membrana hialina, fibronectina em áreas de fibrose intra-alveolar e

queratina no epitélio alveolar, glândulas brônquicas e mesotélio. A organização do exsudato e o colapso alveolar são os principais mecanismos responsáveis pelo remodelamento da arquitetura alveolar e desenvolvimento de fibrose após SDRA (MEDURI, 1991; MENDEZ, 2005).

A natureza do evento determinante da SDRA também tem um papel importante na sua fisiopatologia (ROCCO, 2005, 2008). Gattinoni e colaboradores relataram que a SDRA de etiologia pulmonar apresenta mais consolidação enquanto que a de origem extra pulmonar mais colapso. Desta maneira, dependendo da etiologia da SDRA, a resposta às manobras de recrutamento alveolar pode diferir (GATTINONI, 1998; ROCCO, 2005; RIVA, 2008; ROCCO, 2008).

#### ***1.4 Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica***

Antes da primeira descrição da SDRA, já havia relatos descrevendo o quão nociva poderia ser a ventilação pulmonar artificial (GREENFIELD, 1964). Entretanto, como a ventilação mecânica tornou-se a única ferramenta no tratamento de SDRA, este conceito ficou esquecido. Anos após o aprimoramento das técnicas e das máquinas para ventilação pulmonar artificial a letalidade na SDRA continuava elevada. Em 1974, Webb e Tierney mostraram que pulmões de ratos saudáveis, ventilados com pressão inspiratória de 45 cmH<sub>2</sub>O apresentavam grave lesão da membrana alvéolo-capilar com extravasamento de líquido e células para o interstício e alvéolo e que a adição de uma PEEP de 10 cmH<sub>2</sub>O tinha um efeito protetor (WEBB, 1974). Essa lesão encontrada se assemelhava ao dano alveolar difuso evidenciado na SDRA. A este mecanismo de lesão denominou-se lesão pulmonar induzida (VILI) ou associada à ventilação mecânica (VALI), quando esta ocorre em um indivíduo sem lesão pulmonar prévia à ventilação artificial (DOS SANTOS, 2006).

Dentre os principais mecanismos da VILI podemos citar: o barotrauma desencadeado pelo aumento da pressão; volutrauma causado por uma hiperdistensão dos alvéolos devido aos altos volumes; atelectrauma resultante do fechamento e da abertura cíclica dos alvéolos; além do biotrauma onde a lesão é determinada por liberação de mediadores inflamatórios.

#### **1.4.1 Barotrauma**

O barotrauma é caracterizado por fuga de ar causada pela ruptura da parede dos espaços aéreos, com manifestações clínicas e radiológicas, que incluem pneumotórax, pneumomediastino, pneumoperitônio, embolia gasosa e enfisema intersticial. A comprovação de que altas pressões acarretavam acometimento ao nível celular e fisiológico só ocorreu a partir da década de 70. Vários estudos clínicos e experimentais sugeriram que a ventilação mecânica poderia afetar de maneira adversa a função e estrutura pulmonares (GREENFIELD, 1964; SLADEN, 1968), porém eles eram controversos. Após o estudo de Webb e Tierney, inúmeros estudos ratificaram a existência de dano alveolar difuso induzido pela pressão inspiratória elevada (DREYFUSS, 1984; PARKER, 1984; KOLOBOW, 1987; DREYFUSS, 1988; PARKER, 1990).

#### **1.4.2 Volutrauma**

Evidências experimentais indicaram que o grau de insuflação pulmonar é mais importante em determinar lesão pulmonar do que o nível de pressão inspiratória. Isto porque tocadores de trombeta comumente alcançam pressões de via aérea de 150 cmH<sub>2</sub>O sem causar dano pulmonar (BOUHUYS, 1969). O termo volutrauma nasceu das observações de Dreyfuss e colaboradores (DREYFUSS, 1985), onde ratos ventilados com altos volumes correntes e baixas pressões de pico apresentavam edema e hemorragia pulmonares da mesma maneira que aqueles

ventilados com altas pressões de pico. Já os animais ventilados com altas pressões e baixos volumes tinham menor grau de lesão pulmonar e hemorragia. O volume corrente elevado acarreta alterações da membrana alvéolo-capilar devido ao estresse gerado na parede alveolar. Estes resultados foram confirmados em outras espécies animais (HERNÁNDEZ, 1989; CARLTON, 1990).

### **1.4.3 Atelectrauma**

O atelectrauma é uma lesão resultante do fechamento e abertura cíclicos das unidades pulmonares distais, também chamado de recrutamento/desrecrutamento (DOS SANTOS, 2006). O recrutamento alveolar refere-se à abertura dos alvéolos colapsados e o desrecrutamento decorre do colapso dos alvéolos previamente abertos. O termo “manutenção do recrutamento alveolar” descreve o estado de recrutamento alveolar sustentado, prevenindo o desrecrutamento. Estudos experimentais demonstraram redução do edema pulmonar e do atelectrauma quando os pulmões foram recrutados e uma PEEP administrada (DREYFUSS, 1998). A PEEP evita o colapso alveolar e, conseqüentemente, o estresse de cisalhamento (HAMILTON, 1983; MCCULLOCH, 1988; MUSCEDERE, 1994).

### **1.4.4 Biotrauma**

Ao contrário dos três determinantes da VILI (barotrauma, volutrauma e atelectrauma), o biotrauma descreve um processo de lesão que pode ocorrer no pulmão na ausência de danos ultra-estruturais (DOS SANTOS, 2006). A hipótese proposta para o biotrauma é que forças biofísicas alterem a fisiologia celular normal do pulmão, induzindo a um aumento dos níveis de mediadores inflamatórios, reparo e remodelamento do pulmão e apoptose. Logo, um estímulo mecânico (estresse global e/ou regional) seriam captados por células (mecanosensores) e convertidos em sinais bioquímicos e biológicos. A esse fenômeno denomina-se

mecanotransdução (WIRTZ, 2000; DOS SANTOS, 2000; FREDBERG, 2006). Se o estímulo mecânico alcançar o limiar de estresse, estruturas pulmonares podem se romper (GATTINONI, 2003; PELOSI, 2008). Se a força for inferior a esse limiar de estresse, porém não fisiológica, eventos biológicos intracelulares também poderão ocorrer, resultando na produção e liberação de mediadores inflamatórios (TREMBLAY, 1997; LIU, 1999; DOS SANTOS, 2000, 2006) e na alteração da expressão gênica e síntese protéica de várias moléculas da matriz extracelular pulmonar (XU, 1996; GARCIA, 2004; MASCARENHAS, 2004; FARIAS, 2005; SUKI, 2005; RIVA, 2008).

Os mecanosensores são representados por canais iônicos presentes na membrana celular que estão em íntimo contato com proteíno quinases intracelulares (SACKIN, 1995). A matrix extracelular e as integrinas de membrana celular diretamente conectadas ao citoesqueleto da célula também são vias de mecanosensores bastante conhecidas e estudadas (INGBER, 1991, 1993). A ativação destes sensores vai determinar ativação de proteinoquinases, geração de segundo mensageiro; fosforilação e ativação de moléculas de sinalização; amplificação por cascatas enzimáticas; e modulação de expressão gênica. No núcleo, as forças físicas podem exercer seus efeitos por influenciar a expressão de genes de resposta precoce [c-fos, c-jun, c-myc, JE, ELK-1, AP-1, SP-1, fator nuclear (NF)- $\kappa$ B, Egr-1] (INGBER, 1997). Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA regulando a expressão gênica. Destes, o NF- $\kappa$ B tem recebido uma atenção especial. Vários estudos in vivo e in vitro mostraram que o estresse de cisalhamento supra-regula o NF- $\kappa$ B (KOMURO, 1991; SCHWARTZ, 1996), aumentando a síntese de citocinas (IL-6, IL-8, IL-1- $\alpha$ , e TNF- $\alpha$ ) (SCHWARTZ, 1996).

### **1.5 Estratégia de ventilação protetora**

A ventilação na SDRA foi inicialmente instituída objetivando a normalização das trocas gasosas, ou seja, oxigenação adequada e normocapnia, não importando os níveis de pressão atingidos. Para isso, os pacientes eram ventilados com pressão positiva, geralmente em modos ciclados a volume, com volume corrente de 10 a 15 ml/kg, frequência respiratória elevada (até 24 incursões por minuto) e PEEP para manter a fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ ) menor que 60% e a saturação periférica de oxigênio ( $SpO_2$ ) maior que 90%. A PEEP era aplicada para tentar reduzir a fração inspirada de  $O_2$ , com níveis que não ultrapassavam 15 cmH<sub>2</sub>O.

Em 1992, Lachmann e colaboradores descreveram a estratégia ventilatória denominada “open lung approach”. Com base nos resultados das pesquisas de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica, propuseram uma estratégia de ventilação cujo foco principal era o repouso alveolar (LACHMANN, 1992). A abertura das unidades alveolares colapsadas pelo recrutamento alveolar deveria ser mantida pela aplicação de pressão no final da expiração suficiente para impedir o fechamento das unidades alveolares mais instáveis. Com isso o alvéolo ficaria aberto durante todo o ciclo respiratório impedindo a lesão da parede alveolar pelas forças de cisalhamento promovidas pela abertura e fechamento cíclicos alveolares.

Amato e colaboradores publicaram um estudo clínico e randomizado com 56 pacientes com SDRA ventilados com estratégia convencional ou protetora. No grupo que recebeu estratégia ventilatória protetora, os indivíduos eram recrutados com CPAP, tinham a PEEP titulada pela curva Pressão x Volume e aplicada 2 cmH<sub>2</sub>O acima do Ponto de Inflexão Inferior e ventilados com volume corrente de 6 ml/kg. A

taxa de letalidade após 28 dias foi de 71% para os pacientes em ventilação convencional e 38% naqueles em ventilação protetora (AMATO, 1998). Posteriormente o ARDSnetwork realizou outro estudo multicêntrico, randomizado que evidenciou redução de 9% na letalidade dos pacientes com SDRA ventilados com baixo volume corrente (6 ml/kg) (ARDSNETWORK, 2000).

Uma metanálise que envolveu cinco estudos totalizando 1202 pacientes com SDRA ou lesão pulmonar aguda foi publicada com o objetivo primário de avaliar a modificação da taxa de letalidade com o uso de baixo volume corrente (6 ml/Kg). O objetivo secundário era avaliar se havia diferença entre baixo volume corrente e o convencional caso a pressão de platô usada fosse maior que 30 a 35 cmH<sub>2</sub>O. Os autores observaram que a ventilação com volume corrente reduzido acarretava diminuição da letalidade no final do seguimento de cada estudo: 36% *versus* 42%, risco relativo (RR) 0,85 (intervalo de confiança 0,74 a 0,98). Quando se aplicava um modelo de análise randômica, a intervenção não tinha significado estatístico. A estratégia ventilatória protetora reduziu significativamente a letalidade em 28 dias: RR 0,74 (intervalo de confiança 0,61 a 0,88). Não houve diferença significativa entre a estratégia com baixo volume corrente e a convencional em presença de pressão de platô menor ou igual a 31 cmH<sub>2</sub>O: RR 1,13 (intervalo de confiança 0,88 a 1,45). Os autores concluíram que a heterogeneidade dos estudos impede uma comparação mais efetiva. Existe uma tendência ao benefício clínico da ventilação com baixo volume corrente, entretanto em pacientes com contra-indicação à hipercapnia, não há evidência de benefício da ventilação com baixo volume corrente (PETRUCCI, 2004).

## **1.6 Manobras de Recrutamento Alveolar**

O uso de baixos volumes correntes acarreta colapso alveolar e a necessidade de altos níveis de PEEP (LAPINSKY, 2005). Entretanto, a PEEP alta pode acarretar lesão pulmonar (KIRCHNER, 2005) e as manobras de recrutamento são consideradas estratégias eficazes para abrir os alvéolos colapsados, acarretando uma ventilação mais homogênea. Diversas técnicas de recrutamento alveolar vêm sendo descritas (CPAP, suspiro, PEEP progressivo) com o objetivo de reverter a hipoxemia, reduzir os níveis de PEEP e  $FiO_2$ , minimizando a lesão associada e/ou induzida pela ventilação mecânica (AMATO, 1998; PELOSI, 1999; PELOSI, 2003; BORGES, 2006).

### **1.6.1 Pressão positiva contínua nas vias aéreas**

A manobra de recrutamento alveolar por pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) é freqüentemente utilizada na prática clínica diária e consiste na aplicação de uma pressão de 35 a 40  $cmH_2O$  no paciente sob sedação e paralisação neuromuscular por cerca de 40 segundos.

Em estudo clínico multicêntrico o uso de volumes correntes baixos e de manobra de recrutamento com CPAP em pacientes com SDRA antes da escolha da PEEP ideal e após cada desconexão do respirador acarretou melhora da sobrevida (AMATO, 1998). O nível de pressão e o tempo utilizados para esta manobra de recrutamento variam entre os pesquisadores: 30  $cmH_2O$  por 30 segundos (GREAVES, 1995), 40  $cmH_2O$  por 7 a 15 segundos para reverter atelectasias em pulmões sadios submetidos à anestesia geral (ROTHEN, 1999), 35 a 40  $cmH_2O$  por 20 segundos em pulmões colapsados (LAPINSKY, 1999), 40  $cmH_2O$  por 40 segundos (GATTINONI, 1995) e 55  $cmH_2O$  (SJOSTRAND, 1995). Todos os estudos citados relataram boa tolerância pelo paciente e manutenção dos efeitos benéficos

funcionais por até quatro horas após a manobra de recrutamento. Não houve descrição de instabilidade hemodinâmica significativa ou desenvolvimento de barotrauma. A adição de PEEP após a manobra é fundamental para tais efeitos perdurarem por mais tempo (KO, 2008). Entretanto, estudo experimental utilizando recrutamento alveolar com CPAP em ratos com LPA mostrou indução de estresse mecânico com aumento do RNAm para pró colágeno tipo III (FARIAS, 2005). Neste mesmo estudo, a aplicação de baixos níveis de PEEP minimizou o estresse gerado pela manobra de recrutamento.

### **1.6.2 Manobra de Recrutamento com Pressão Controlada e aumento progressivo da PEEP**

Esta manobra consiste em um aumento progressivo da PEEP em pacientes ventilados em PCV e com *delta* de pressão de 15 cmH<sub>2</sub>O acima da PEEP. A manobra é iniciada com PEEP de 10 cmH<sub>2</sub>O e a cada dois minutos a PEEP é aumentada em 5 cmH<sub>2</sub>O, até 45 cmH<sub>2</sub>O (pressão total em vias aéreas = 60 cmH<sub>2</sub>O). Em cada passo da manobra é coletado sangue arterial para cálculo da PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>. Se o recrutamento total (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> > 400) for atingido com pressões inferiores a 60 cmH<sub>2</sub>O, a manobra pode ser interrompida pois o objetivo já foi atingido. Borges e colaboradores estudaram pacientes com SDRA submetidos a esta manobra e observaram melhora significativa e sustentada da PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> (BORGES, 2006).

### **1.6.3 Suspiro**

Pelosi e colaboradores estudaram pacientes com SDRA ventilados com três suspiros consecutivos por minuto, com pressão platô de 45 cmH<sub>2</sub>O, durante 1 hora. Os autores observaram aumento da PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> e do volume expiratório final e redução da PaCO<sub>2</sub>. Entretanto, esses benefícios eram perdidos 30 minutos após a interrupção do suspiro (PELOSI, 1999). Ressalta-se, no entanto, que o uso de

suspiros durante a ventilação em posição prona, propicia manutenção dos efeitos benéficos da manobra de recrutamento (PELOSI, 2003). Patroniti e colaboradores constataram que a adição de 1 suspiro por minuto durante ventilação com pressão de suporte em pacientes com SDRA na fase precoce melhorava a troca gasosa e o volume pulmonar, reduzindo o estímulo neuromuscular inspiratório (PATRONITI, 2002). Recentemente, estudo clínico (ANTONAGLIA, 2006) e experimental (ALLEN, 2006) evidenciaram melhora da oxigenação e da mecânica pulmonar após recrutamento alveolar com suspiro.

## 2. JUSTIFICATIVA

O uso de baixos volumes correntes e limitada pressão de platô foi proposto como estratégia de ventilação mecânica na LPA e SDRA reduzindo a VILI/VALI e prevenindo a lesão de órgãos à distância (AMATO, 1998; BROWER, 2000, 2004; VILLAR, 2007; MEAD, 2008; MERCAT, 2008). Entretanto, ventilação com volumes correntes reduzidos pode resultar em desrecrutamento alveolar se níveis de PEEP não forem adequadamente aplicados (PELOSI, 2001). Por outro lado, alto níveis de PEEP podem vir a ser lesivos (KO, 2008). Neste contexto, as manobras de recrutamento vêm sendo usadas para prevenir a hipoventilação causada pelo uso de baixos volumes correntes e reduzir a necessidade de altos níveis de PEEP.

A manobra de recrutamento com CPAP 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos é a forma de recrutamento mais difundida na prática clínica diária. Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram que o uso do CPAP melhora a mecânica e oxigenação de pacientes com SDRA (AMATO, 1998; GRASSO, 2002; FARIAS, 2005). Entretanto, acarreta estresse alveolar (FARIAS, 2005) e seus efeitos benéficos são transitórios (GRASSO, 2002; LIM, 2004, CONSTANTIN, 2008). A manobra de recrutamento com suspiro melhorou a mecânica pulmonar e a oxigenação em pacientes com SDRA (PELOSI, 1999; PELOSI, 2001; ANTONAGLIA, 2006). Todavia, estes benefícios foram transitórios (PELOSI, 1999) e a frequência e o nível de pressão platô inspiratória podem induzir lesão pulmonar (HOTCHKISS, 2000; ALLEN, 2006).

No entanto, até o momento, não foram avaliadas as conseqüências da manobra de recrutamento com suspiro sobre o parênquima pulmonar e órgãos a distância.

### 3. OBJETIVOS

#### **3.1 Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que as elevadas frequências e pressões de platô inspiratórias geradas pelo suspiro podem induzir e/ou intensificar o estresse celular na lesão pulmonar aguda.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a resposta do suspiro em presença de diferentes frequências e pressões de platô sobre os seguintes parâmetros:

- Elastância estática do pulmão,
- Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial,
- Morfometria pulmonar,
- Microscopia eletrônica do pulmão,
- Apoptose de células epiteliais do rim, fígado, intestino delgado e pulmão,
- Expressão de RNAm para procolágeno tipo III.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos Wistar machos, oriundos do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pesando entre 250 a 300 g. Os animais receberam 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). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 4.2 Caracterização dos grupos experimentais

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 12 grupos experimentais com 8 animais cada. Todos os ratos foram ventilados em modo volume controlado, com fluxo de 6 ml/s, frequência respiratória de 80 ipm, relação inspiração:expiração 1:2, volume corrente de 4 ml/kg e pressão positiva expiratória final de 5 cmH<sub>2</sub>O. Os grupos foram classificados da seguinte forma: (Figura 1)

Grupo CTRL-NV: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) não ventilados mecanicamente;

Grupo CTRL-NR: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) sem manobra de recrutamento;

Grupo CTRL-CPAP: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) recrutados com CPAP 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos no início da ventilação;

Grupo CTRL-S180: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) recrutados com três suspiros consecutivos de 40 cmH<sub>2</sub>O por minuto durante uma hora;

Grupo CTRL-S10/40: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) recrutados com um suspiro de 40 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante uma hora;

Grupo CTRL-S10/20: animais sadios (injeção de 1 ml de salina, intraperitonealmente) recrutados com um suspiro de 20 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante uma hora;

Grupo LPA-NV: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) não ventilados mecanicamente;

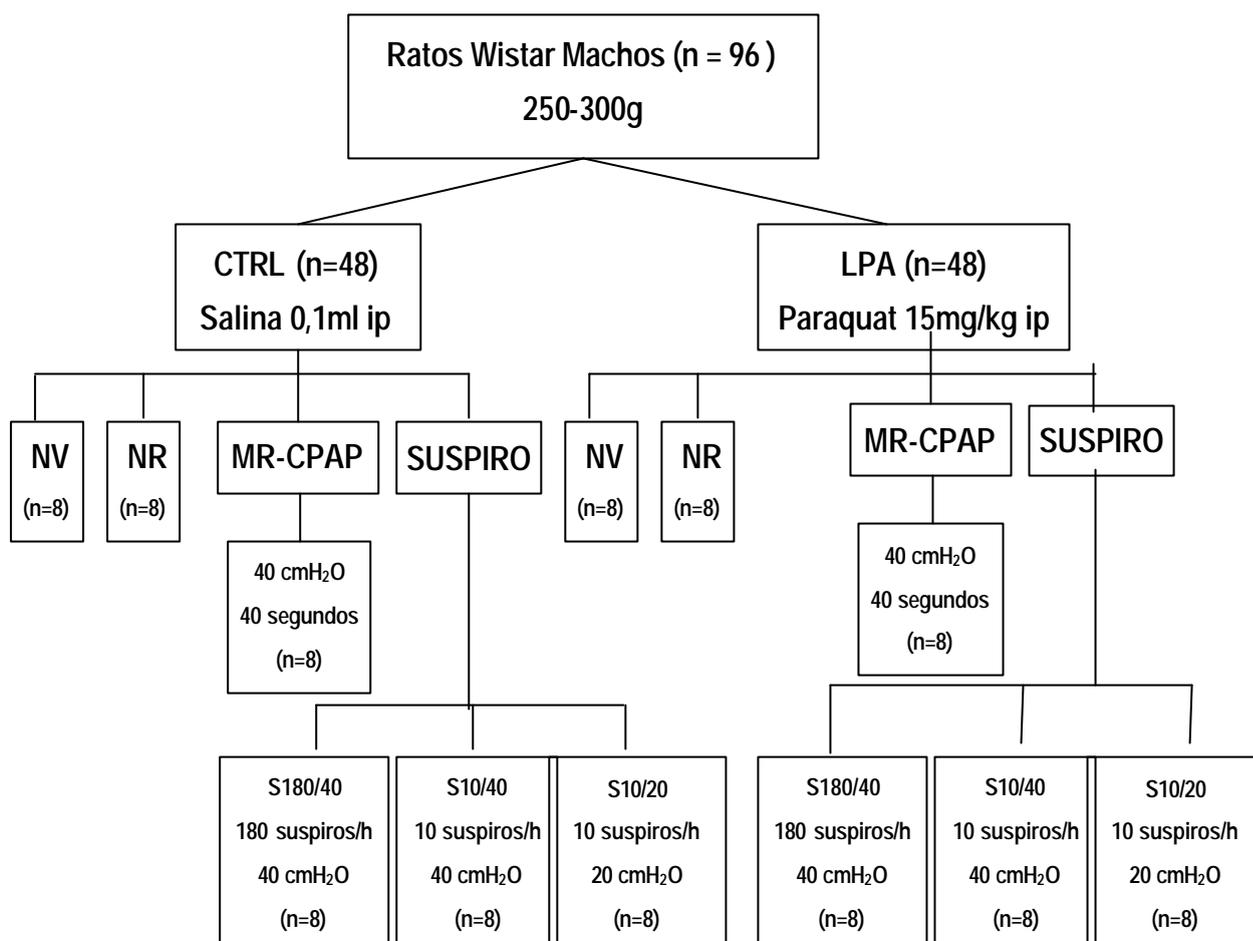
Grupo LPA-NR: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) sem manobra de recrutamento;

Grupo LPA-CPAP: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) recrutados com CPAP 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos no início da ventilação;

Grupo LPA-S180: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) recrutados com três suspiros consecutivos de 40 cmH<sub>2</sub>O por minuto durante 1 hora;

Grupo LPA-S10/40: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) recrutados com 1 suspiro de 40 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante 1 hora;

Grupo LPA-S10/20: animais LPA (injeção de paraquat, 15mg/kg de peso, intraperitonealmente) recrutados com 1 suspiro de 20 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante 1 hora;



**Figura 1.** Desenho experimental. CTRL: grupo controle; LPA: lesão pulmonar aguda; NV: grupo não ventilado; NR: grupo não recrutado; MR-CPAP: grupo recrutado com CPAP com 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos; S180/40: grupo recrutado com três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora; S10/40: grupo recrutado com um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora; S10/20: grupo recrutado com um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô de 20 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora.

A medida da mecânica respiratória, dos gases sanguíneos arteriais e a análise da histologia por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. A análise ultraestrutural do parênquima pulmonar por microscopia eletrônica e a quantificação da apoptose foram feitas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). A análise da expressão de RNAm para procolágeno tipo III foi realizada no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do IBCCF/UFRJ.

### **4.3 Preparo dos animais**

Vinte e quatro horas após a administração de salina ou paraquat, os animais foram sedados com diazepam (5 mg i.p.), pesados (balança Filizola, modelo BR, fabricado por Indústrias Filizola AS, SP, Brasil) e, em seguida, anestesiados com tiopental sódico [Sodium Pentothal<sup>®</sup>, Laboratório Abbott, Chicago, Illinois, EUA (20 mg/kg, i.p.)].

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa em decúbito dorsal, e seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada uma pequena incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm de extensão no pescoço dos animais, seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, pela traqueotomia, uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic, Clay-Adams Inc., Nova York, EUA) com 1,5 mm de diâmetro interno (DI) e 7,5 mm de comprimento foi introduzida na traquéia, sendo esta fixada na porção proximal por meio de fios de algodão.

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (MORTOLA, 1983), para medida do fluxo aéreo ( $V'$ ). O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno de 1,5 mm e comprimento de 4,2 cm e distância entre as saídas laterais de 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão [SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as

dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo pode ser medido de acordo com a Lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao  $V'$ . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor de diferencial de pressão [SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá] para medida da pressão traqueal (Ptr). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito da traquéia até a extremidade da tubulação evita erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG, 1981; LORING, 1982). O volume ( $V_T$ ) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo. A montagem experimental está esquematizada na Figura 2.

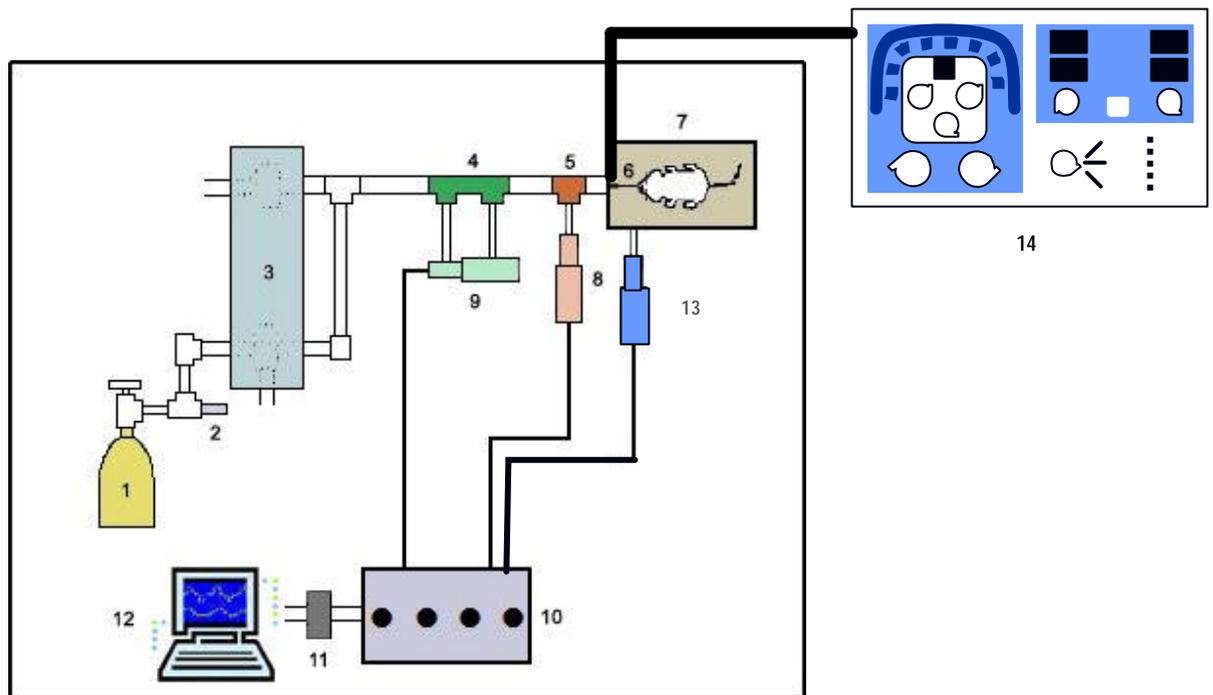
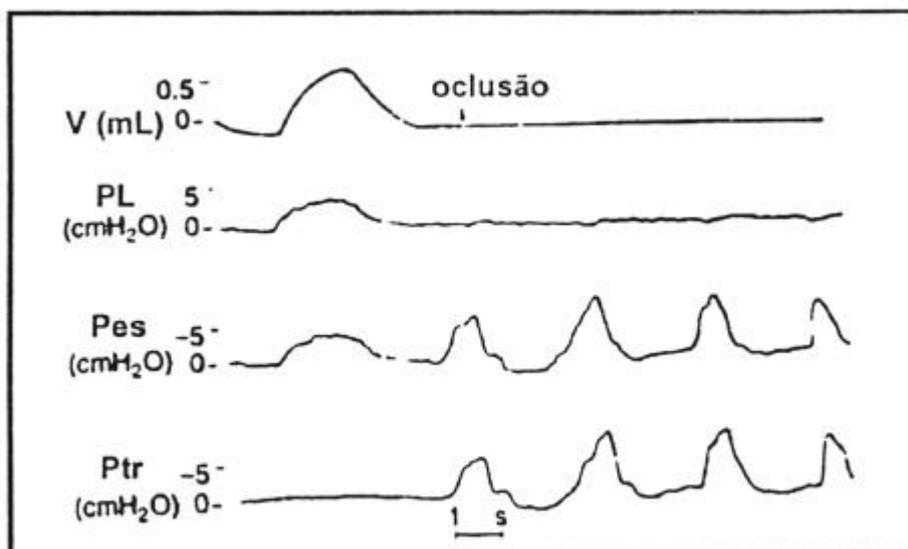


Figura 2. Montagem experimental consistindo de: 1 - Cilindro de ar comprimido; 2 - Rotâmetro de agulha; 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides; 4 - Pneumotacógrafo; 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas; 6 - Cânula traqueal; 7 - Mesa cirúrgica; 8 - Transdutor de pressão traqueal; 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo; 10 - SCIREQ (SC-24); 11 - Conversor analógico-digital de 12 bits; 12 - Microcomputador; 13 - Transdutor de pressão esofágica; 14 - Ventilador microprocessado (Inter-3).

No esôfago dos animais foi introduzido um cateter de polietileno (PE 200) de 20 cm de comprimento e 1,7 mm de diâmetro interno, com pequenos orifícios em sua extremidade distal, preenchido com água deionizada. O cateter foi introduzido até o estômago e retrocedido lentamente até atingir o terço inferior do esôfago. Sua extremidade proximal estava conectada a um transdutor diferencial de pressão [SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá] para medida da pressão esofagiana (Pes), já que as variações da pressão no terço inferior do esôfago refletem as variações da pressão intrapleural (Ppl) e, portanto, da pressão da parede torácica (Pw) (MILLIC-EMILI, 1964). A medida da pressão esofagiana foi realizada para decompor o sistema respiratório em pulmão e parede torácica. O correto posicionamento do cateter esofagiano foi determinado pelo “teste de oclusão”, conforme proposto por Baydur e colaboradores em 1982 (BAYDUR, 1982) com o animal respirando espontaneamente.

O “teste da oclusão” consiste na oclusão das vias aéreas ao término de uma expiração espontânea, mantendo-as ocluídas por um ciclo respiratório e registrando e comparando as variações das pressões traqueal e esofagiana durante o esforço inspiratório subsequente (Figura 3). Nessas condições, foram observadas variações nos traçados de pressão traqueal (?Ptr) que foram acompanhadas pela Pes (?Pes). A diferença entre as duas pressões não deverá exceder 5%. O cateter esofagiano foi lavado periodicamente com água deionizada para evitar que a presença de secreções na luz do cateter comprometa as medidas da pressão.



**Figura 3.** Traçados de volume (V), pressões transpulmonar (PL), pressão esofágica (Pes) e traqueal (Ptr) durante o teste de oclusão ao final da expiração “. A variação de Pes não deve ser superior a 5% da Ptr.

A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em “U”, contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

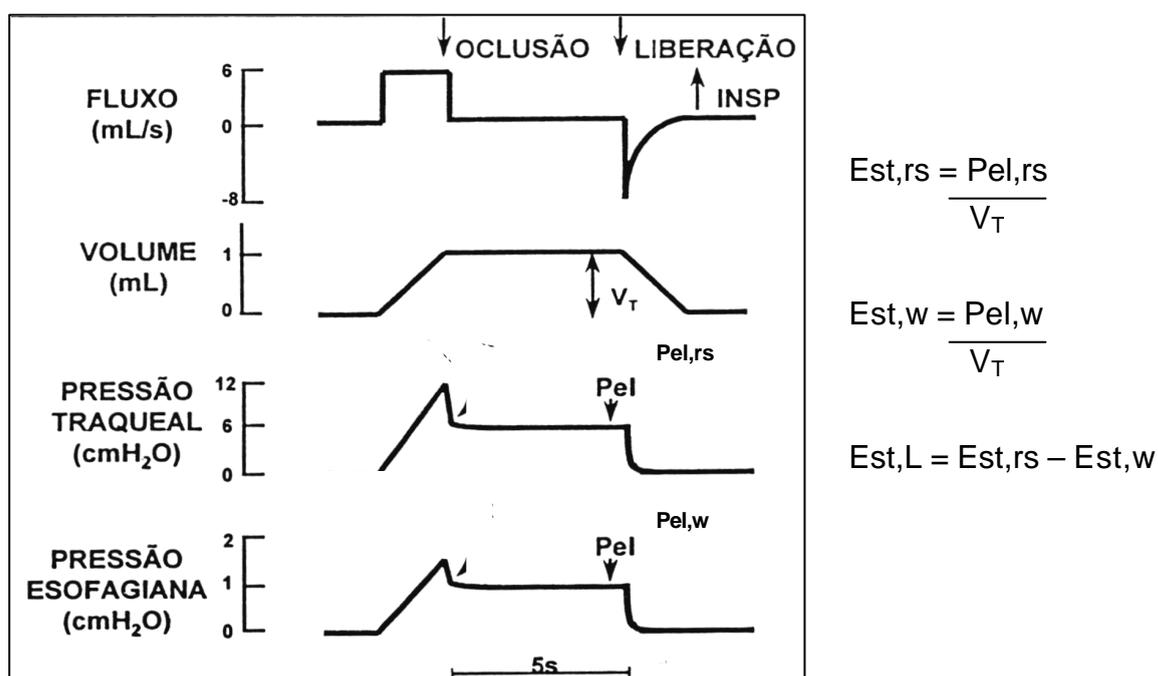
Para computar o espaço morto da montagem, pesou-se o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em “T”, pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permite saber o volume de água e, portanto o volume do espaço morto do sistema. O espaço morto da montagem foi de 0,1 ml.

Os animais tiveram a sua musculatura paralisada após a administração de brometo de pancurônio [Pavulon®, Organon International Incorporation, Nova Jersey, EUA (2 mg/kg, intravenosamente (i.v.)], e a ventilação artificial foi instituída com um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Em seguida, a artéria femoral direita dos animais foi puncionada

com uma seringa de insulina (BD 1cc com agulha curta), coletando-se 0,1 mL de sangue para análise da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial, antes e após 1 hora de ventilação mecânica. O sangue arterial coletado foi instilado em cartuchos específicos (biosensor EG7<sup>+</sup>®, Laboratório Abbott, Illinois, EUA), que foram introduzidos no analisador de gases iSTAT<sup>®</sup> [Abbott Point-of-care (POC), Illinois, EUA], para determinação da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO<sub>2</sub>).

#### 4.4 Elastância estática do pulmão

A elastância estática do pulmão (Est,L) foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração, após insuflação com fluxo constante (BATES, 1985; BATES, 1988; KOCHI, 1988; SIMIŁOWSKI, 1989). (Figura 3)



**Figura 4.** Método de oclusão ao final da inspiração. Pel= pressão de retração elástica; Est= elastância estática; V<sub>T</sub> = volume corrente; rs= sistema respiratório; L= pulmão e w= parede torácica.

Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da pressão traqueal até um ponto a partir do qual o decaimento da pressão

assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Essa fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório ( $P_{el,rs}$ ). Os mesmos procedimentos foram aplicados para pressão esofageana, obtendo-se os valores de  $P_{el,w}$ .

A elastância estática do sistema respiratório, pulmão e parede torácica ( $Est_{rs}$ ,  $Est_L$  e  $Est_w$ , respectivamente) foram calculadas dividindo-se  $P_{el,rs}$ ,  $P_{el,L}$  e  $P_{el,w}$ , respectivamente pelo volume corrente ( $V_T$ ). A elastância estática do pulmão foi calculada a partir da diferença dos valores da parede torácica daqueles do sistema respiratório (Figura 4).

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

Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo, ao tubo traqueal e o cateter esofágico registraram os sinais de  $V'$ ,  $P_{tr}$  e  $P_{es}$ , respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da  $P_{tr}$  e  $P_{es}$  são estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados, filtrados [SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá], convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801A, *Data Translation*, Malboro, MA, EUA) e amostrados a uma freqüência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador para posterior análise, através do programa ANADAT (*RHT-InfoData*, Montreal, Canadá).

A aspiração traqueal foi cuidadosamente realizada apenas em presença de excesso de secreção e sempre antes da medida mecânica respiratória.

#### **4.5 Manobra de Recrutamento com CPAP ou Suspiro**

Os animais foram ventilados por 60 minutos, em modo volume controlado com volume corrente de 4 ml/kg de peso, com fluxo de 6 ml/s, relação inspiratória:expiratória 1:2, frequência respiratória de 80 ciclos por minuto, fração inspirada de oxigênio de 0,21 e PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O.

Os suspiros e o CPAP foram realizados no ventilador mecânico (Inter 3, Intermed, São Paulo, Brasil) conectado ao circuito do ventilador utilizando-se uma torneira de três vias. A relação I:E do suspiro foi 1:2 (Figura 2).

#### **4.6 Remoção dos Pulmões**

Após a análise da mecânica pulmonar e da PaO<sub>2</sub>, 1 mL de heparina diluída (0,5 mL de heparina em 0,5 mL de solução fisiológica) foi injetada na veia cava inferior e, após 1 minuto, os animais foram exangüinados por seção cirúrgica direta da aorta e veia cava inferior em suas porções abdominais. A traquéia era, então, ocluída ao final da expiração com linha de algodão. A porção abdominal do esôfago era identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço eram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago era suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia era seccionada acima do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, o esôfago e o coração eram separados dos pulmões e vias aéreas por leve tração. Os brônquios fontes direito e esquerdo eram ocluídos por um fio de algodão e, após uma seção acima do fio, os pulmões direito e esquerdo eram separados, sendo mantidos no volume expiratório final.

## **4.7 Histologia Pulmonar**

Os pulmões direitos foram fixados para análise por microscopia óptica (NAGASE, 1992). Três pedaços de 2x2x2 mm foram cortados de diferentes segmentos do pulmão esquerdo e preparados para análise por microscopia eletrônica de transmissão.

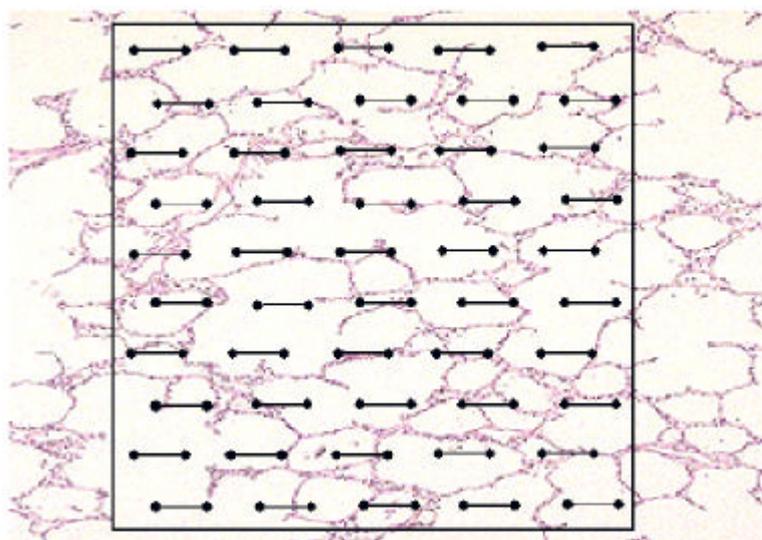
### **4.7.1 Microscopia Óptica**

Os pulmões direitos 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:

- 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 (BX51, Olympus Latin America Inc., Miami, Flórida, EUA) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100x e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos ("point-counting") (WEIBEL, 1990), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 5).



**Figura 5.** Retículo com 100 pontos e 50 linhas para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Em um aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Quantificou-se a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. O resultado é apresentado como fração de área de tecido pulmonar, obtido pela razão entre a média do número de pontos computados nos dez campos analisados pela área total da amostra (10.000  $\mu\text{m}^2$ ).

#### 4.7.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise da microscopia eletrônica foram retirados três fragmentos de parênquima pulmonar (0,2 x 0,2 x 0,2 cm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído com tampão fosfato preparado a 2%, por 2h, sendo posteriormente colocados em sacarose. Os espécimes permaneceram em solução de sacarose até o processamento, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 ml de água destilada. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (0,4055 a 1% de água, contendo 106 ou 133 mg de sacarose por ml) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada, as preparações foram colocadas na geladeira em solução aquosa 0,5% de acetato de uranila contendo 106 a 133 mg de sacarose, por um tempo médio que varia de 2 a 24h. A seguir, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo então passado em óxido propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina. Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 ml de araldite (Cy-205), 8ml de DDSA (anidrido de ácido doxecenil succinico), 0,5 ml de acelerador (N-benzil dimetilamina) e 0,1 ml de plastificante (dibutilftaltato).

Após 16 horas, 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 separados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrotomo Porter Blum MT2. Tais cortes, com 0,5 µm de espessura, foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura azul de

metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nesses cortes, foram selecionadas as áreas representativas das lesões. Dois blocos de cada espécime, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise.

Para o estudo ultraestrutural, cortes ultrafinos, com espessura em torno de 90 nanômetros, foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, pelo citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL 1010, Japão). Para cada imagem na microscopia eletrônica (15/animal) foi atribuído um escore de injúria aos seguintes parâmetros: integridade da membrana alvéolo-capilar; lesão das células epiteliais pulmonares, dano das células endoteliais e formação de membrana hialina. Esse escore era baseado na gravidade da lesão, da seguinte forma: 0= parênquima pulmonar normal; 1= alterações em 1 a 25% do tecido examinado; 2= alterações em 26 a 50% do tecido examinado; 3= alterações em 51 a 75% do tecido examinado; 4= alterações em 76 a 100% do tecido examinado (RIVA, 2008).

## **4.8 Apoptose**

### **4.8.1 Detecção *in situ* de células apoptóticas**

Para detecção *in situ* de apoptose das células epiteliais foi usado o método TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end-labeling method*) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). Este método envolve a adição de trifosfato de deoxiuridina (dUTP) marcado com fluorescência nos fragmentos terminais do DNA por ação catalítica do TdT (GAVRIELI, 1992; WIJSMAN, 1993). Todos os experimentos foram realizados dez vezes de modo que os resultados para três amostras de cada tecido, incluindo a próstata do rato, pudessem ser padronizados. Cortes histológicos feitos a partir de blocos de parafina

(4 a 6  $\mu\text{m}$ ) foram depositados em lâminas. A seguir, os cortes foram desparafinados em solução xilol e rehidratados com diluições decrescentes de etanol em água. Os cortes foram lavados quatro vezes com água destilada por 2 minutos e imersos em tampão TdT (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Posteriormente, TdT (0,3 U por microlitro) e marcação fluorescente dUTP em tampão TdT foram adicionados aos cortes e as amostras foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C durante 60 minutos. Para controles negativos, o TdT foi eliminado da mistura reativa. Os cortes foram, então, incubados com anticorpo específico conjugado a peroxidase. Os corantes foram visualizados com um substrato no qual núcleos com fragmentação do DNA se coram de marrom. A reação foi determinada pela lavagem dos cortes em tampão salina fosfato. Os núcleos sem fragmentação do DNA foram corados de azul como resultado da contra-coloração com hematoxilina. Controles positivos consistiram da glândula prostática do rato após castração. Três cortes de cada amostra foram examinados, foram utilizadas amostras de quatro animais por grupo. Os cortes foram inicialmente examinados através de microscopia óptica em pequeno aumento (X100), permitindo a avaliação da área de superfície ocupada por células apoptóticas. A seguir, vários campos foram examinados em aumento de X400 para se discriminar núcleos alveolares com fragmentação e massas de cromatina condensadas. Em adição à técnica de marcação de fragmentos terminais do DNA, cortes adjacentes foram corados com hematoxilina e eosina para quantificação da apoptose.

#### **4.8.2 Expressão de Fas-L por imunohistoquímica**

A expressão de Fas-L foi avaliada por coloração imunohistoquímica utilizando-se a técnica do complexo imunoperoxidase avidina-biotina, usando anticorpo policlonal anti-Fas-L (Clone FSL01; same as 5D1) (Neo Markers,

Westinghouse, CA); diluição 1:20 que reconhece a região N-terminal intracelular do Fas-L humano. A coloração citoplasmática acastanhada caracterizou a expressão Fas-L.

A microscopia óptica foi usada para quantificar apoptose no pulmão, intestino delgado, fígado e rim (detecção *in situ* e imunocoloração). Um escore semi-quantitativo de 5 pontos, baseado na gravidade, foi usado e graduados como negativo = 0 (parênquima pulmonar normal), leve = 1 (1-25%), moderado = 2 (26-50%), alto = 3 (51-75%) e grave = 4 (76-100%). Foram analisados 10 campos microscópicos não-coincidentes, por animal, num total de 4 animais por grupo (aumento 400X).

#### **4.9 RT-PCR semi-quantitativo**

Uma tira de parênquima subpleural de 3x3x10 mm foi cortada da periferia do pulmão esquerdo dos animais de cada grupo. O material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em “criotubo” no freezer a -70°C até o processamento. A expressão de RNAm para procolágeno tipo III (PCIII) do tecido pulmonar de todos os subgrupos de animais foi obtida por Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase Semiquantitativa (RT-PCR). O método de RT-PCR semiquantitativo usado para quantificar o conteúdo tecidual de RNAm para PCIII foi validado em experimentos prévios (GARCIA, 2004; FARIAS, 2005, RIVA, 2008).

##### **4.9.1 Extração de RNA Total do Tecido Pulmonar**

Para a quantificação da expressão do RNA total dos pulmões utilizando a técnica de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram isoladas tiras longitudinais e periféricas do pulmão esquerdo de 3-4 animais de cada grupo com dimensões de 3x3x10 mm. O RNA total foi extraído utilizando-se o

reagente Trizol<sup>®</sup> (Gibco BRL, NY, EUA). O reagente Trizol<sup>®</sup> é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. Após a extração, realizada de acordo com as instruções do fabricante, o RNA foi tratado com DNase I (Gibco BRL, NY, EUA) durante 30 min a 37°C para eliminação da possível contaminação com DNA genômico. O RNAm precipitado foi solubilizado em 20 µL de água tratada com dietil pirocarbonato. A concentração das amostras de RNA-total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). A integridade do RNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi submerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos. A integridade é determinada por uma razão de absorbância 260/280 nm > 1,7.

#### **4.9.2 Transcrição Reversa (RT)**

Para a obtenção da primeira fita de DNA, o RNA-total extraído foi transcrito reversamente com SuperScript (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) em 37°C por 60 min. A primeira fita de DNA complementar (DNAc) foi realizada em 20 µL de reação contendo 1 µg do RNA total, 50 U de transcriptase reversa do vírus murino da eritroleucemia, 20 U de inibidor de RNase, 2,5 µM de oligo(dT)<sub>16</sub>, 2 µL de 5x o banho da primeira fita (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 mM dNTP e água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). A reação foi realizada em um banho com água a 37°C por 80 min e 99°C por 5 min. O controle negativo correspondeu a uma alíquota de 250ng do RNA total utilizado para a síntese de DNAc na ausência de enzima transcriptase reversa, o que foi denominado RT (-). O DNAc obtido foi diluído em 10 µL de água tratada com DEPC e estocado a -20°C até que seja realizada a reação de PCR.

### 4.9.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A seguinte solução foi colocada na reação de PCR: 0,2  $\mu$ mol/L de cada dNTP, 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de Tris-Cl (pH 8,3) e 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> mais 2,5 U de DNA polimerase termoestável (Taq polimerase, Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e 0,2  $\mu$ mol/L de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*) sense e antisense.

Para estes experimentos, foram sintetizados *primers* específicos para os genes do PCIII e do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), utilizado como controle interno positivo em todas as reações. Estes oligonucleotídeos possuem entre 18 a 30 nucleotídeos e composição de G-C entre 50-60%, sendo confeccionados com base na seqüência dos genes em estudos já publicados no GeneBank (BETHESDA, MD, EUA). Para evitar a amplificação inespecífica, os *primers* sintetizados foram posicionados em diferentes exons. Desta forma, foi possível distinguir, pelo tamanho, os produtos do PCR provenientes da amplificação do DNAc. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer – Norwalk, EUA).

Após a transcrição reversa, todo o DNAc foi utilizado nas reações de PCR contendo diferentes pares de *primers*. Para a amplificação, foram utilizados 25 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1,25 mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), 50mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-Cl pH 9.0, 0.1% Triton X-100 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA), em um volume total de 25  $\mu$ L de reação. O programa utilizado consiste de desnaturação a 94°C, por 45 segundos, anelamento a 54°C e extensão a 72°C, por 1 minuto, por 36 ciclos, tanto para procolágeno III, quanto para GAPDH. O último ciclo é seguido por uma extensão a 72°C, por 10 minutos, a 4°C por tempo indeterminado.

Após a reação de PCR, 25 µL de cada amostra, correspondente aos grupos experimentais, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Todas as reações incluíram um controle RT (-). A identificação da amplificação confirmada por determinação do peso molecular na eletroforese em gel de agarose com 100 pb de marcador molecular de DNA (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA).

O gene do GAPDH, por ser um gene abundantemente expresso em todas as células e não sofrer variação da sua expressão com os diferentes estímulos utilizados no presente trabalho, serviu como controle interno de todos os experimentos de RT-PCR. Pares de oligonucleotídeos correspondentes ao GAPDH foram amplificados conjuntamente com o PCIII nas reações de PCR realizadas.

#### **4.10 Análise estatística**

As diferenças entre os grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de dupla entrada considerando-se como fatores: a presença ou não de lesão pulmonar aguda e a manobra de recrutamento. Quando múltiplas comparações foram necessárias, o teste de Tukey foi aplicado.

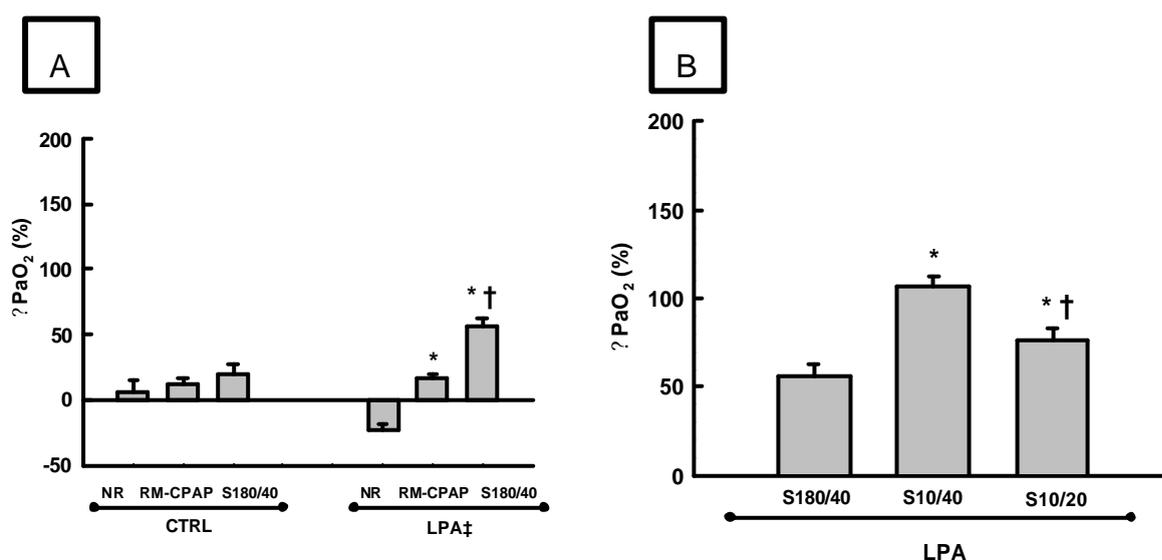
Para comparação do escore semi-quantitativo da microscopia eletrônica e apoptose utilizou-se ANOVA on ranks seguido do teste de Tukey, quando necessário. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

A análise foi feita no Sigmastat 3.1 (Jandel Scientific São Rafael, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

O percentual de variação da  $PaO_2$  ( $\%PaO_2$ ) comparando-se os valores obtidos antes e após 1 hora de ventilação mecânica foram maiores no grupo S180/40 em comparação ao grupo MR-CPAP ( $p < 0,05$ ) (Figura 6A). Os animais NR evoluíram com piora da oxigenação. A redução da frequência dos suspiros independente da pressão utilizada levou a aumento da  $PaO_2$ . Entretanto, a  $\%PaO_2$  foi maior no grupo S10/40 do que no S10/20. (Figura 6B)

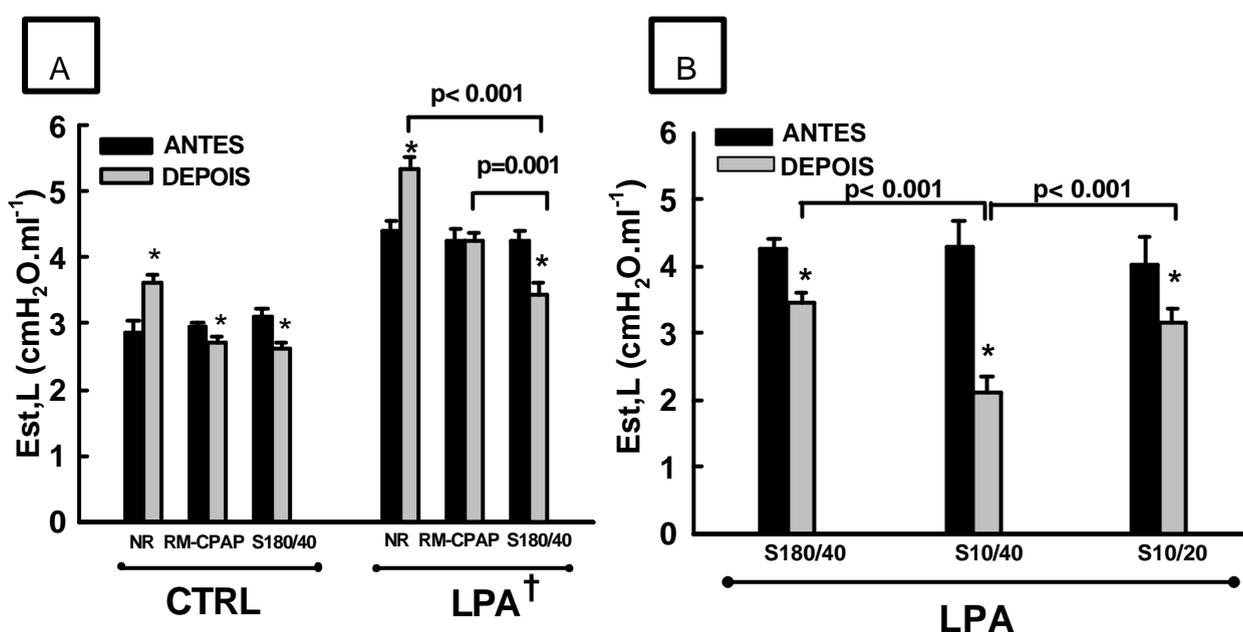


**Figura 6.** Percentual de aumento da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $\%PaO_2$ ) em relação às medidas realizadas antes da ventilação mecânica. No grupo CTRL, salina foi injetada intraperitonealmente (ip, 0,1 ml) e no grupo LPA os animais receberam paraquat (15 mg/kg, ip), 24 horas antes do experimento. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM de 4 animais por grupo. Painel A: os grupos CTRL e LPA foram randomizados da seguinte forma: a) não recrutados (NR), b) a manobra de recrutamento com pressão positiva contínua nas vias aéreas de 40  $cmH_2O$  por 40 segundos (MR-CPAP), e c) três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô de 40  $cmH_2O$  durante 1 hora (S180/40). \*Significativamente diferente do grupo NR ( $p < 0,05$ ). †Significativamente diferente do grupo MR-CPAP ( $p < 0,05$ ). ‡Significativamente diferente do grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). Painel B: Como não houve diferença entre os grupos controle, os dados estão apresentados referentes apenas ao grupo LPA. S10/40: um suspiro de 40  $cmH_2O$  a cada seis minutos durante 1 hora, S10/20: um suspiro de 20  $cmH_2O$  de pressão de platô a cada seis minutos durante 1

hora. \* Significativamente diferente do grupo S180/40 ( $p < 0,05$ ). † Significativamente diferente do grupo S10/40 ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Mecânica pulmonar

A elastância estática do pulmão (Est,L) foi maior no grupo LPA quando comparada com o grupo CTRL (Figura 7). A manobra de recrutamento com CPAP não modificou a Est,L enquanto o suspiro (S180/40, S10/40, and S10/20) reduziu significativamente a Est,L. Entretanto, a Est,L foi menor no grupo S10/40 que no S10/20 e S180/40 (Figura 7).



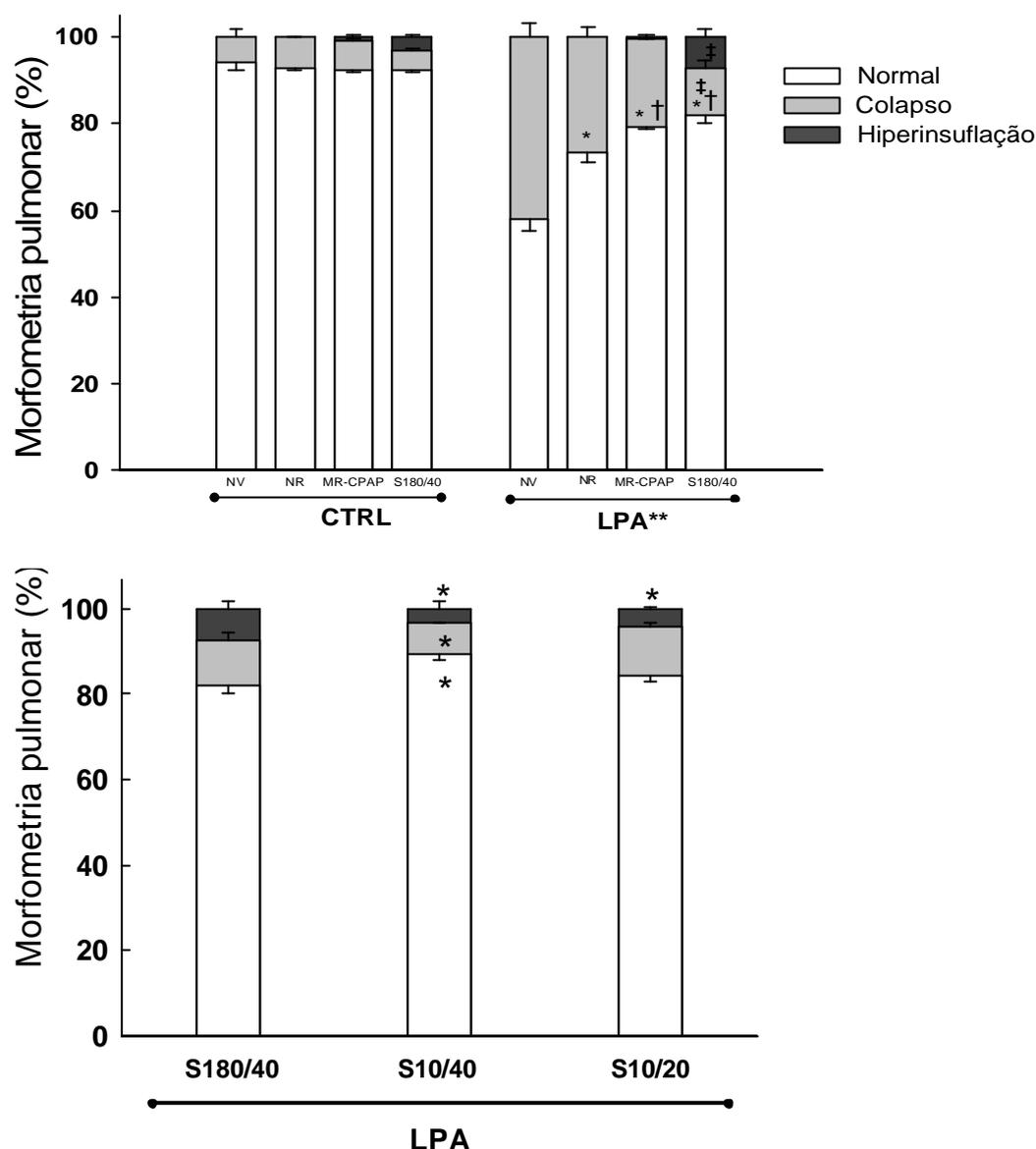
**Figura 7.** A elastância estática do pulmão (Est,L) foi medida imediatamente antes (ANTES) e após 1 hora (DEPOIS) da ventilação mecânica e/ou manobra de recrutamento (MR) nos animais do grupo CTRL e LPA. No grupo CTRL, salina foi injetada intraperitonealmente (ip, 0,1 ml) e no grupo LPA os animais receberam paraquat (15 mg/kg, ip) 24 horas antes do experimento. Painel A: os grupos CTRL e LPA foram randomizados da seguinte forma: a) não recrutados (NR), b) a insuflação pulmonar com pressão positiva contínua nas vias aéreas de 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos (MR-CPAP), e c) três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora (S180/40). Painel B: S10/40: um suspiro de 40 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante 1 hora, S10/20: um suspiro de 20 cmH<sub>2</sub>O de pressão de platô. Valores correspondem à média ± EPM de 8 animais por grupo (sendo 10 aferições por animal). \*Significativamente diferente de ANTES ( $p < 0,05$ ). † Significativamente diferente do grupo CTRL ( $p < 0,05$ ).

### **5.3 Morfometria do parênquima pulmonar**

A fração de área de colapso alveolar foi maior no grupo LPA que no CTRL. O grupo S180/40 apresentou menos colapso alveolar e maiores áreas hiperinsufladas quando comparadas com o grupo RM-CPAP (Figura 8). A redução da frequência do suspiro no grupo S10/40 determinou redução das áreas de colapso alveolar assim como das áreas de hiperinsuflação. Já a redução da pressão do suspiro no grupo S10/20 não ofereceu melhores resultados quando comparada ao grupo S180/40 em relação ao colapso, porém pode-se observar menos hiperinsuflação.

### **5.4 Microscopia eletrônica de transmissão**

A avaliação qualitativa pela microscopia eletrônica mostrou lesão da membrana alvéolo-capilar com degeneração citoplasmática do pneumócito tipo II e dano endotelial no grupo LPA (Tabela 3). No grupo S180/40 observou-se piora na lesão ao pneumócito tipo II e endotélio com desacoplamento do epitélio alveolar e desnudamento da barreira epitelial da membrana basal. Nos grupos S10/40 e S10/20 estas alterações foram minimizadas (Tabela 3).



**Figura 8.** Representação gráfica da fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados (cinza escuro), colapsados (cinza claro) e normais (branco). Valores correspondem à média  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. Todos os valores foram computados em 10 campos randômicos não coincidentes para cada animal. No grupo CTRL, salina foi injetada intraperitonealmente (ip, 1 ml) e no grupo LPA os animais receberam paraquat (15 mg/kg, ip) 24 horas antes do experimento. Painel superior: os grupos CTRL e LPA foram randomizados da seguinte forma: a) não ventilados (NV), b) não recrutados (NR), c) manobra de recrutamento com pressão positiva contínua nas vias aéreas de 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos (MR-CPAP), e d) três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora (S180/40). \*Significativamente diferente do grupo não ventilado (NV) ( $p < 0,05$ ), †Significativamente diferente do grupo NR ( $p < 0,05$ ), ‡Significativamente diferente do grupo MR-CPAP ( $p < 0,05$ ), \*\*Significativamente diferente do grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). Painel inferior: A frequência e a pressão de platô foram reduzidas, S10/40: um suspiro de 40 cmH<sub>2</sub>O a cada seis minutos durante 1 hora, S10/20: um suspiro de 20 cmH<sub>2</sub>O de pressão de platô. \*Significativamente diferente do grupo S180/40 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Análise semi-quantitativa da microscopia eletrônica de transmissão no grupo LPA.

<i>Achados</i>	<i>NR</i>	<i>MR-CPAP</i>	<i>S180/40</i>	<i>S10/40</i>	<i>S10/20</i>
Membrana alvéolo-capilar	2 (1,5-2,5)	2 (2-2)	4 (3,5-4)*	2 (2-3)	2 (1,5-2,5)
Célula epitelial tipo II	2 (2-2,5)	2 (1,5-2,5)	3 (2,5-3,5)*	2 (1,5-2)	1,5 (1-2)
Células endoteliais	1,5 (1-2,5)	2 (2-2,5)	3,5 (2,5-4)*	1,5 (1-2,5)	1 (1-1,5)

O escore de injúria do tecido pulmonar foi atribuído por dois investigadores independentes. Os achados patológicos foram graduados de acordo com um escore semi-quantitativo de cinco pontos, baseado na gravidade da lesão: 0= parênquima pulmonar normal; 1= alterações em 1 a 25% do tecido examinado; 2= alterações em 26 a 50% do tecido examinado; 3= alterações em 51 a 75% do tecido examinado; 4= alterações em 76 a 100% do tecido examinado. NR: Não recrutado, MR-CPAP: Manobra de recrutamento com pressão positiva contínua na vias aéreas com pressão platô de 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos, S180/40: três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora, S10/40: um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô inspiratória de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora, S10/20, um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô inspiratória de 20 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora. Valores são a mediana (percentil 25-75) de 4 animais por grupo.\*Significativamente diferente do grupo NR (p<0,05).

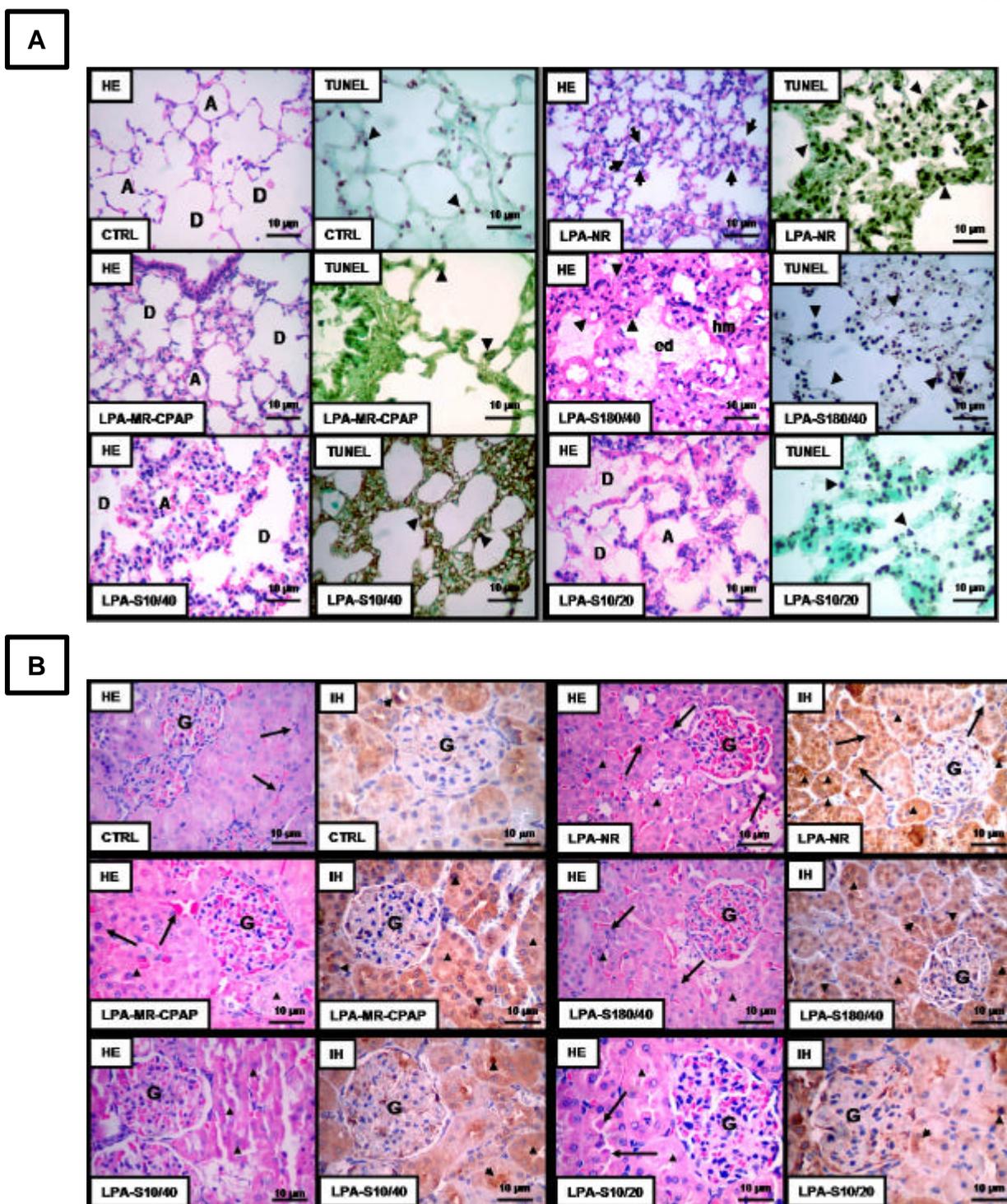
### 5.5 Apoptose de células epiteliais

Constatou-se apoptose de células epiteliais do pulmão, rim, intestino delgado e fígado neste modelo de LPA, sendo que o número de células apoptóticas no rim e no pulmão foi maior no grupo S180/40 em comparação com os demais (Tabela 4 e Figura 9).

**Tabela 4** – Apoptose de células epiteliais no grupo LPA

Órgãos	NR	MR-CPAP	S180/40	S10/40	S10/20
Intestino	1,5 (1-2,5)	2,0 (1,5-3)	2,5 (1,5-3,5)	2,5 (1,5-2,5)	2,0 (1,5-2,5)
Fígado	2,5 (2-3)	2,5 (1,5-3,5)	2,0 (1,5-2,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,0 (1,5-2,5)
Rim	2,0 (2-3)	3,0 (2,5-3,5)	4,0 (3,5-4,0)*	2,5 (1,5-3,0)	2,0 (1,5-2,0)
Pulmão	2,0 (1,5-2,5)	2,0 (1,5-2,5)	3,5 (3-4)*	2,0 (1,5-2)	2,0 (1,5-2,5)

Os valores são a mediana (percentil 25-75) de 4 animais por grupo. O escore semi-quantitativo de gravidade foi computado em 10 campos não coincidentes (400x), com base nos seguintes critérios: 0 = parênquima normal; 1 = 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75%; 4 = 76-100% quantidade de células apoptóticas por campo. NR: Não recrutado, MR-CPAP: Manobra de recrutamento com pressão positiva contínua na vias aéreas com pressão platô de 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos, S180/40: três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô inspiratória de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora, S10/40: um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô inspiratória de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora, S10/20: um suspiro a cada seis minutos com pressão de platô inspiratória de 20 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora. \*Significativamente diferente do grupo NR (p<0,05).

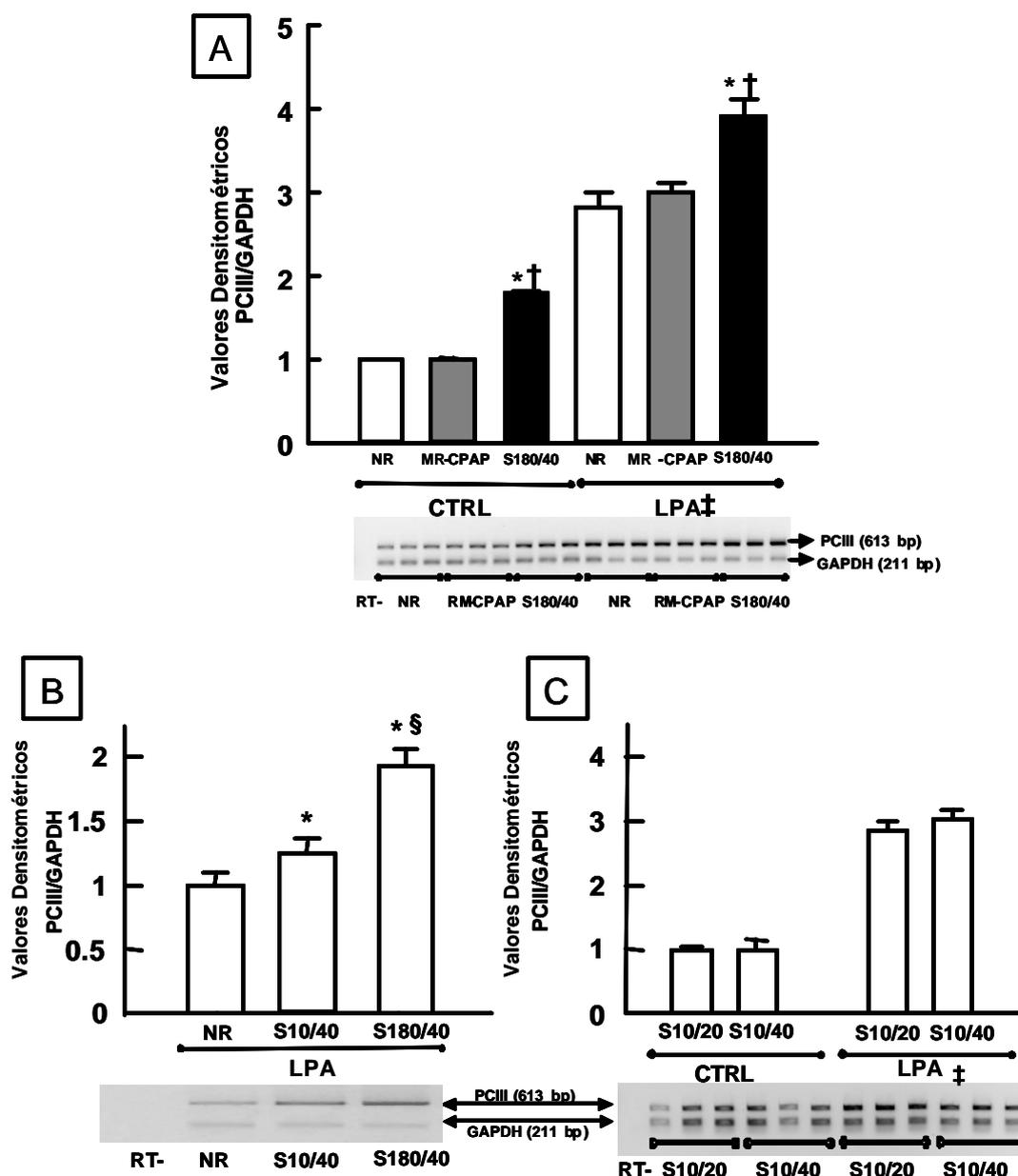


**Figura 9.** Fotomicrografias do pulmão (painel A) e rim (painel B). Painel A: Fotomicrografias do parênquima pulmonar coradas pela HE e técnica de TUNEL. Grupo CTRL mostra arquitetura preservada com ductos (D) e alvéolos (A) normais, e esparsas células epiteliais pulmonares apoptóticas amarronzadas (setas). No grupo LPA observa-se colapso alveolar (setas), edema intra- alveolar (ed), membrana hialina (hm) e presença de inúmeras células epiteliais apoptóticas amarronzadas (setas). Observe que no grupo S10/40 e S10/20 o número de células apoptóticas é menor que no grupo S180/40. Painel B: Fotomicrografias do parênquima renal coradas pela HE e imunohistoquímica para FasL. No grupo CTRL o parênquima renal apresenta-se com arquitetura glomerular (G) e tubular renal (setas) preservados, esparsas células apoptóticas renais amarronzadas podem ser encontradas (setas). No grupo LPA observa-se desarranjo dos túbulos renais com alterações degenerativas do citoplasma (setas) e numerosas células epiteliais apoptóticas

renais amarronzadas (setas). Note que nos rins dos animais da grupo S180/40 há aumento do número de células epiteliais renais apoptóticas. A redução da frequência e da pressão de platô inspiratória dos grupos S10/40 e S10/20, respectivamente reduziu o número de células epiteliais renais apoptóticas observadas.

### **5.6 Expressão do RNAm para pró colágeno tipo III**

A expressão do RNAm para PCIII aumentou no grupo LPA em comparação ao CTRL. No grupo MR-CPAP não houve diferença na expressão do RNAm para PCIII quando comparado ao NR, tanto no grupo LPA quanto no CTRL (Figura 10A). Porém, o suspiro (S180/40) acarretou aumento da expressão de RNAm para PCIII no grupo CTRL e LPA. A redução na frequência do suspiro (S10/40) reduziu significativamente a expressão do RNAm para PCIII (Figura 10B). Entretanto, a redução da pressão do suspiro (S10/20) não promoveu redução adicional na expressão do RNAm para PCIII (Figura 10C).



**Figura 10.** Expressão do RNAm para PCIII obtido pela amplificação do PCIII e do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) pelo método semiquantitativo de transcrição reversa da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) em tecido pulmonar de ratos submetido a diferentes estratégias ventilatórias. No grupo CTRL, salina foi injetada intraperitonealmente (ip, 0,1 ml) e no grupo LPA os animais receberam paraquat (15 mg/kg, ip) 24 horas antes do experimento. Paineis A, B e C: os grupos CTRL e LPA foram randomizados da seguinte forma: a) não recrutados (NR), b) a manobra de recrutamento com pressão positiva contínua nas vias aéreas de 40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos (MR-CPAP), e c) três suspiros consecutivos por minuto com pressão de platô inspiratória de 40 cmH<sub>2</sub>O durante 1 hora (S180/40). A frequência do suspiro foi reduzida para um suspiro a cada seis minutos (S10/40) (Painel B), assim como a pressão de platô para 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20) (Painel C). Os valores são média ± EPM (n = 4) da razão entre os valores densitométricos das bandas do PCIII e do GAPDH obtidos pela técnica do RT-PCR. \*Significativamente diferente do grupo NR (p<0,05). †Significativamente diferente do grupo MR-CPAP (p<0,05).

‡Significativamente diferente do grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). §Significativamente diferente do grupo S10/40 ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No presente modelo de lesão pulmonar aguda moderada induzida por paraquat, o suspiro reduziu a elastância estática pulmonar e aumentou a oxigenação assim como diminuiu as áreas de colapso alveolar. Por outro lado, acarretou a hiperinsuflação, alterações ultraestruturais na membrana alvéolo-capilar, aumento do número de células apoptóticas epiteliais renais e pulmonares e aumento da expressão do RNAm para PCIII. A redução na freqüência do suspiro induziu maior redução da elastância estática do pulmão, acompanhada de redução significativa das áreas de hiperinsuflação alveolar, expressão do RNAm para PCIII e apoptose de células epiteliais pulmonares e renais. A associação de suspiro com baixa freqüência e reduzida pressão de platô inspiratória resultou em aumento da elastância estática do pulmão, piora da oxigenação e colapso alveolar em comparação ao grupo recrutado com baixa freqüência, sem redução na expressão do RNAm para PCIII.

A lesão pulmonar aguda foi induzida pelo paraquat. O paraquat é um herbicida que se acumula principalmente nos pulmões e induz dano epitelial alveolar devido a sua ação no pneumócito tipo II. Este modelo de lesão pulmonar aguda moderada é caracterizado por: colapso alveolar, edema intersticial e formação de membrana hialina sem edema alveolar (DELAVAL, 1985; ROCCO, 2001). O paraquat induz estresse oxidativo e apoptose de pulmão, intestino e rim (FABISIAK, 1997; 1998). A grau de colapso alveolar encontrado neste estudo nos animais não ventilados com LPA foi de 34% (Figura 8) similar ao reportado em outros estudos experimentais (ROCCO, 2001; FARIAS, 2005) e clínicos (GATTINONI, 2006).

A ventilação mecânica com PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O (grupo NR) foi suficiente para reduzir o colapso para 26%. Entretanto, após 1 hora de ventilação mecânica, observamos piora funcional com aumento da elastância estática do pulmão e queda

da PaO<sub>2</sub>. Esses achados podem estar relacionados ao uso de volume corrente baixo (4ml/kg) somado a PEEP insuficiente para abrir e manter aberto os alvéolos colapsados. O volume corrente aplicado foi escolhido com a proposta de minimizar o *strain* (volume insuflado/capacidade residual funcional) e o estresse pulmonar (pressão transpulmonar) já que poderia haver uma interação entre a ventilação mecânica *per se* e as diferentes formas de recrutamento na indução ou amplificação da VILI (GATTINONI, 2003; CHIUMELLO, 2008). A FiO<sub>2</sub> utilizada durante a ventilação mecânica foi de 0,21 com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de atelectasia por reabsorção (ROTHEN, 1995), assim como lesão pulmonar induzida por hiperóxia (KULKARNI, 2007).

A manobra de recrutamento com CPAP (40 cmH<sub>2</sub>O por 40 segundos) é a forma mais amplamente utilizada na prática clínica (STEINBERG, 2007). Entretanto, o sucesso desta manobra está diretamente relacionado à causa da lesão pulmonar aguda (RIVA, 2008), sendo seu efeito na melhora da função pulmonar transitório (GRASSO, 2002; OCZENSKI, 2004). Estudos clínicos demonstraram benefício morfofuncional da MR-CPAP em pacientes com SDRA (AMATO, 1998; CONSTANTIN, 2008). Entretanto, existem evidências experimentais de que a MR-CPAP induz aumento na expressão de RNAm para PCIII (FARIAS, 2005). Nossos resultados não mostraram melhora significativa da elastância estática do pulmão e oxigenação com MR-CPAP, mas não podemos descartar que tenha ocorrido uma melhora destes parâmetros logo após a realização da manobra e que eles tenham sido perdidos ao longo do tempo.

O uso do suspiro como forma de recrutamento demonstrou ser eficaz em estudos clínicos em pacientes com SDRA ventilados tanto em posição supina (PELOSI, 1999) quanto em prona (PELOSI, 2001). No nosso estudo observamos

melhora da elastância estática do pulmão e da troca gasosa nos animais recrutados com suspiro (S180/40). No entanto, pudemos observar aumento da expressão de RNAm para PCIII e da apoptose de células epiteliais pulmonares e renais bem como hiperinsuflação alveolar. O PCIII é um marcador precoce de remodelamento do parênquima pulmonar (GARCIA, 2004; FARIAS, 2005, DE CARVALHO, 2007; RIVA, 2008). O aumento da expressão do RNAm para PCIII nesses animais pode estar relacionado à ativação de fibroblastos e macrófagos para produção de fibras colágenas devido às altas frequência e pressão geradas pelo suspiro (S180/40), resultando em estresse de cisalhamento e *tensil*. Esta hipótese é corroborada por outros estudos onde pulmões submetidos a altas pressões inspiratórias (PARKER, 1997), hiperinsuflação (BERG, 1997; FARIAS, 2005; DE CARVALHO, 2007; RIVA, 2008) ou *strain* (BERG, 1997) apresentavam expressão aumentada de RNAm para PCIII. O suspiro (S180/40) também acarretou aumento no número de células apoptóticas epiteliais renais e pulmonares. Este fenômeno também foi evidenciado em outro estudo experimental com ventilação mecânica lesiva em modelo de SDRA (IMAI, 2003). O alto índice de apoptose de células epiteliais pulmonares encontrado pode também ser explicado pelo elevado estresse de cisalhamento e tensil induzido pelo suspiro. Neste contexto, diversos estudos clínicos (RANIERI, 2000; IMAI, 2003) e experimentais (IMAI, 2003; KUIPER, 2005; KOYNER, 2008) descreveram que a ventilação mecânica lesiva acarreta lesão renal. A lesão renal induzida pela ventilação mecânica pode ser iniciada ou agravada basicamente por três mecanismos: hipercapnia ou hipoxemia comprometendo o fluxo renal; alterações no débito cardíaco levando a comprometimento da hemodinâmica sistêmica e renal; e por biotrauma, determinando liberação de mediadores inflamatórios pulmonares ao nível sistêmico (KUIPER, 2005).

Baseado na premissa que a ativação de mediadores biomoleculares e a promoção da inflamação sistêmica poderiam ser modificadas se a ventilação mecânica instituída fosse menos lesiva, optamos por estudar um grupo de animais com menor frequência de suspiro (S10/40). Neste contexto, Vaporidi e colaboradores demonstraram que a ventilação mecânica convencional pode determinar injúria pulmonar em pulmões normais com aumento de IL-6 no fluido do lavado broncoalveolar, lesão histológica do parênquima pulmonar e que a redução da frequência respiratória promove diminuição do processo inflamatório pulmonar (VAPORIDI, 2008). Outro estudo experimental em pulmões de ratos ventilados *ex vivo* também demonstrou que a redução da frequência respiratória tinha um efeito protetor (CONRAD, 2005). Além disso, a possibilidade de existir uma frequência de suspiro ótima que possibilite promover e manter os alvéolos abertos e minimizar a injúria pulmonar foi recentemente demonstrada (ALLEN, 2006).

No nosso estudo observamos que a redução da frequência do suspiro melhorou a oxigenação e a mecânica pulmonar, quando comparadas com o grupo de frequência alta (S180/40). Ademais, no grupo S10/40, constatou-se diminuição da expressão do RNAm para PCIII, apoptose de células epiteliais renais e pulmonares e hiperinsuflação alveolar. Esses resultados corroboram os trabalhos publicados na literatura (CONRAD, 2005; ALLEN, 2006; GARCIA, 2008; VAPORIDI, 2008). Esses achados podem ser explicados pela redução do estresse de cisalhamento obtido com a diminuição da frequência do suspiro. As altas frequências respiratórias podem levar a injúria pulmonar tanto pela elevação da magnitude do estresse de cisalhamento devido a insuflações pulmonares rápidas, como por alcançar mais rapidamente o número total de ciclos necessários para falência (HOTCHKISS, 2000; CONRAD, 2005; GARCIA, 2008). Assim, haveria pouco tempo para reparo da

membrana alvéolo-capilar pulmonar (ALLEN, 2006). Nós também observamos redução da apoptose de células epiteliais renais e pulmonares, o que pode ser relacionado com redução do processo inflamatório (KO, 2008). Por outro lado, devemos ter em mente que no grupo S10/40 houve melhor oxigenação quando comparado com S180/40 e, assim, a melhora da oxigenação regional também pode ter sido um fator determinante na redução da apoptose de células epiteliais pulmonares e órgãos periféricos. Entretanto, vale ressaltar que não houve equiparação dos valores com os animais não recrutados (NR). Este achado pode ser explicado pelo uso de altas pressões de insuflação promovendo estresse tensil e, perpetuando assim, o estímulo ao remodelamento e inflamação pulmonares.

Com base na assertiva anterior, nós estudamos um grupo de animais recrutados com frequência de suspiro baixa e com pressão de platô reduzida para 20 cmH<sub>2</sub>O. Nossos resultados mostraram que o grupo S10/20 apresentou piora da oxigenação, da mecânica pulmonar e da histobgia sem nenhuma modificação significativa na expressão do RNAm PCIII ou na apoptose de células epiteliais pulmonares e renais. Desta forma, embora a redução da pressão de platô durante o suspiro tenha reduzido o estresse *tensil*, ela não foi capaz de abrir as unidades alveolares colapsadas promovendo então estresse de cisalhamento e manutenção dos níveis altos de RNAm para PCIII. Um ponto importante que é necessário acrescentar a esta discussão diz respeito ao nível da PEEP. Sabe-se que para um recrutamento perfeito é necessário a associação de manobras de recrutamento capazes de abrir os alvéolos colapsados e níveis suficientes de PEEP que mantenham esses alvéolos abertos durante todo o ciclo respiratório (AMATO, 1998; KO, 2008). No presente estudo, apenas um nível de PEEP foi utilizado. Logo, não podemos descartar que com níveis mais elevados de PEEP o uso de suspiro com

pressão de platô mais baixa pudesse ter um comportamento no mínimo semelhante ao suspiro com alta pressão de insuflação. Por outro lado, a aplicação de altos níveis de PEEP podem induzir a altos estresses e *strain* pulmonares, que não podem ser adequadamente aferidos (CHIUMELLO, 2008).

Nossos dados demonstraram uma grande dissociação entre a melhora de parâmetros clínicos, como oxigenação e elastância estática do pulmão, e alterações biomoleculares e ultraestruturais, como a expressão e RNAm para PCIII e apoptose celular. Embora as medidas de oxigenação e mecânica sejam as mais usadas à beira do leito para otimizar a ventilação mecânica, nossos resultados experimentais sugerem que eles podem não ser os melhores índices para monitorizar os efeitos das manobras de recrutamento.

Ressalta-se que, nossos dados não podem ser extrapolados para o cenário clínico. Na verdade, o presente estudo tem diversas limitações: 1) trata-se de um modelo específico de lesão pulmonar aguda moderada induzida por paraquat. Assim, não sabemos se estes resultados podem ser reproduzidos em outros modelos de LPA; 2) a duração do protocolo foi de apenas 1 hora de ventilação mecânica, de forma que os efeitos ao longo prazo das manobras de recrutamento não foram avaliados; 3) outras formas de suspiro tem sido propostas (LIM, 2003, 2004; CONSTANTIN, 2008), porém no presente estudo apenas a modalidade com aumento da pressão platô inspiratória foi estudada; 4) os níveis de PEEP não foram individualmente titulados, de maneira que não podemos excluir que diferentes resultados poderiam ser obtidos com diferentes níveis de PEEP; 5) o único marcador biomolecular avaliado foi a expressão do RNAm para PCIII. Logo, o comportamento de outros mediadores inflamatórios não pode ser extrapolado; e 6) o efeito das manobras de recrutamento nos parâmetros hemodinâmicos não foi avaliado, o que

limita nosso entendimento e avaliação no papel da hipoperfusão na indução de apoptose em órgãos periféricos.

## 7. CONCLUSÕES

O recrutamento alveolar com 3 suspiros por minuto e pressão de platô inspiratória de 40 cmH<sub>2</sub>O acarretou abertura dos alvéolos colapsados, melhorando a oxigenação e reduzindo a elastância estática do pulmão em modelo de LPA por paraquat; entretanto, induziu hiperinsuflação alveolar, alterações ultraestruturais da membrana alvéolo-capilar, aumento no número de células epiteliais apoptóticas no pulmão e rim, bem como da expressão de RNAm para pró-colágeno tipo III no tecido pulmonar. A diminuição da frequência do suspiro promoveu redução nas áreas de hiperinsuflação alveolar, da apoptose de células epiteliais renais e pulmonares e da expressão do RNAm para PCIII. No entanto, o recrutamento com redução na frequência de suspiro associada à baixa pressão de platô inspiratória determinou aumento na elastância estática do pulmão e piora da oxigenação; porém, não modificou a expressão do RNAm para PCIII ou o número de células epiteliais apoptóticas renais ou pulmonares. Logo, há uma dissociação entre a melhora funcional e as modificações moleculares e ultraestruturais, quando se analisa a resposta a uma determinada manobra de recrutamento. Ademais, parâmetros como pressão de platô e periodicidade devem ser considerados ao selecionar a manobra de recrutamento que será realizada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G.B. et al. **Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006; 91:710-717.

AMATO, M.B. et al. **Effect of a protective ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med 1998; 338:347-354.

ANTONAGLIA, V. et al. **Effects of a sigh on the respiratory mechanical properties in all patients.** J Clin Monit Comput 2006; 20:243-249.

ARDSNetwork. **Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med, 2000; 342:1301-1308.

ARDSNetwork. **Higher versus lower positive end-expiratory pressure in patients with acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med 2004; 351:327-36.

ARTIGAS, A. et al. **The Consensus Committee: The American – European Consensus Conference on SDRA.** Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1332-1347.

ASHBAUGH, D.G. et al. **Acute respiratory distress in adults.** Lancet 1967; 2:319-323.

BATES, J.H.T. et al. **Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog.** J Appl Physiol 1985; 59:732-737.

BATES, J.H.T.; BACONNIER, P.; MILLIC-EMILI, J. **A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics.** J Appl Physiol 1988; 64:2204-2214.

BAYDUR, A. et al. **A simple method for assessing the validity of esophageal balloon technique.** Am Rev Resp Dis 1982; 126:788-791.

BERG, J.T. et al. **High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma.** J Appl Physiol 1997; 83:120-128.

BERNARD, G.R. et al. **The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.** Am J Respir Crit Care Med 1994; 149:818-824.

BORGES, J.B.S. et al. **Reversibility of lung collapse and hypoxemia in early acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:268–278.

BOUHUYS, A. **Physiology and musical instruments.** Nature 1969, 221: 1199 - 1204.

CALANDRINO, F.S. et al. **Pulmonary vascular permeability during the SDRA: a positron emission tomographic study.** Am Rev Respir Dis 1988; 138: 421-428.

CARLTON, D.P. et al. **Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs.** J Appl Physiol 1990; 69:577-83.

CHANG, H.K.; MORTOLA J.P. **Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement.** J Appl Physiol 1981, 51:218-225.

CHIUMELLO, D. et al. **Lung Stress and Strain During Mechanical Ventilation of the Acute Respiratory Distress Syndrome.** Am J Respir Crit Care Med. Disponível em <<http://ajrccm.atsjournals.org/cgi/reprint/200710-1589OCv1>>. Acesso em: 01 de junho de 2008.

CONRAD, S.A. et al. **Protective effects of low respiratory frequency in experimental ventilator-associated lung injury.** Crit Care Med 2005; 33:835-840.

CONSTANTIN, J.M. et al. **Respiratory effects of different recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome.** Crit Care 2008; 12:R50.

D'ANGELO, E. et al. **Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effect of flow, volume and time.** J Appl Physiol 1989; 67:2556-2564.

DE CARVALHO, M.E.P. et al. **Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury.** Crit Care 2007, 11:R23.

DELAVAL, P.M.; GILLESPIE, D.J. **Pulmonary dysfunction during paraquat-induced lung injury: a model of acute alveolar injury.** Crit Care Med 1985; 13: 1056-1060.

DOS SANTOS, C.C.; SLUTSKY, A.S. **Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective.** J App Physiol 2000; 89: 1645-1655.

DOS SANTOS, C.C.; SLUTSKY, A.S. **The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma.** Ann Rev Physiol 2006, 68: 585-618.

DREYFUSS, D.; BASSET, G.; SOLER, P. **Intermittent positive pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats.** Am Rev Respir Dis 1985; 132: 880-884.

DREYFUSS, D.; BASSET, G.; SOLER, P. **High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure.** Am Rev Respir Dis 1988; 137:1159-1164.

DREYFUSS, D.; SAUMON, G. **Ventilator-induced Lung Injury: lessons from experimental studies.** Am J Respir Crit Care Med 1998, 157: 294-323.

ESTEBAN, A.; ANZUETO, A.; FRUTOS, F. **Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study.** JAMA 2002; 287: 345-355.

FABISIAK J.P. et al. **Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis.** Am J Physiol Cell Physiol 1997; 272: C675-C684.

FABISIAK, J.P. et al. **Paraquat-induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2.** Am J Physiol 1998; 274:793-802.

FARIAS, L.L. et al. **Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment.** J Appl Physiol 2005; 98:53-61.

FREDBERG, J.J.; KAMM, R.D. **Stress Transmission in the Lung: Pathways from Organ to Molecule.** Ann Rev Physiol 2006; 68:507-541.

GARCIA, C.S. et al. **What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude?** Respir Physiol Neurobiol 2004; 144:59-70.

GARCIA, C.S. et al. **Pulmonary morphofunctional effects of mechanical ventilation with high inspiratory air flow.** Crit Care Med 2008; 36:232-239.

GATTINONI, L. et al. **Effects of positive end-expiratory pressure on regional distribution of the tidal volume and recruitment in adult respiratory distress syndrome.** Am J Resp Crit Care Med 1995; 151: 1807-1814.

GATTINONI L. et al. **Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes?** Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:1-2.

GATTINONI L. et al. **What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome?** Am J Resp Crit Care Med 2001; 164: 1701-1711.

GATTINONI L. et al. **Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention.** Eur Respir J 2003; 47:15-25.

GATTINONI L. et al. **Lung recruitment in patients with acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med 2006, 354: 1775-1786.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. **Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.** J Cell Biol 1992;119:493-501.

GOSS, H.C. et al. **Incidence of acute lung injury in the United States.** Crit Care Med 2003; 31:1607-1611.

GRASSO, S. et al. **Effects of recruiting maneuvers in patients with acute respiratory distress syndrome ventilated with protective ventilatory strategy.** Anesthesiology 2002; 96:795-802.

GREAVES, I.A. **Micromechanics of the lung.** In: Handbook of Bethesda. Ed Macklem PT, Mead J Bethesda. Am Physiology Society 1995; 217-231.

GREENFIELD, L.J.; EBERT, B.A.; BENSON, D.W. **Effect of positive pressure ventilation on surface tension properties of lung extracts.** *Anesthesiology* 1964; 25: 12-16.

HAMILTON, P.P. et al. **Comparison of conventional and high-frequency ventilation: oxygenation and lung pathology.** *J Appl Physiol* 1983; 55: 131-138.

HERNANDEZ, L.A. et al. **Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits.** *J Appl Physiol* 1989; 66: 2364-8.

HOTCHKISS, J.R. et al. **Effects of decreased respiratory frequency on ventilator induced lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:463-468.

IMAI Y. et al. **Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.** *JAMA* 2003; 289:2104-2112.

INGBER, D.E. **Integrins as mechanochemical transducers.** *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 841-848.

INGBER, D.E. **Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton.** *J Cell Sci* 1993 ; 104: 613-27.

INGBER, D.E. **Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.** *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 575-599.

KIRCHNER, E.A. et al. **Reduced activation of immunomodulatory transcription factors during positive end-expiratory pressure adjustment based on volume-dependent compliance in isolated perfused rabbit lungs.** *Br J Anaesth* 2005; 94: 530-5.

KO, S.C. et al. **Effects of PEEP levels following repeated recruitment maneuvers on ventilator-induced lung injury.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52:514-521.

KOCHI, T. et al. **Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume.** *J Appl Physiol* 1988; 64: 2636-2646.

KOLOBOW, T. et al. **Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. An experimental study.** *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:312-315.

KOMURO, I.; KATOH, Y.; KAIDA, T. **Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation.** *J Biol Chem* 1991; 266: 1265-1268.

KOYNER, J.L.; MURRAY, P.T. **Mechanical ventilation and lung-kidney interactions.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:562-570.

KULKARNI, A.C.; KUPPUSAMY, P.; PARINANDI, N. **Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy.** *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:1717-1730.

KUPIER, J.W et al. **Mechanical ventilation and acute renal failure.** Crit Care Med 2005, 33: 1408-1415.

LACHMANN, B. **Open the lung and keep it open.** Intensive Care Med 1992; 18: 319-321.

LAPINSKY, S.E.; MEHTA, S. **Bench-to-bedside review: Recruitment and recruiting maneuvers.** Crit Care 2005, 9: 60-65.

LAPINSKY, S.F. et al. **Safety and efficacy of a sustained inflation for alveolar recruitment in adults with respiratory failure.** Intensive Care Med 1999; 25: 1297-1301.

LIU, M.; TANSWELL, A.K.; POST, M. **Mechanical force-induced signal transduction in lung cells.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1999; 277: 667-683.

LIM, C. et al. **Effect of alveolar recruitment maneuver in early acute respiratory distress syndrome according to antiderecruitment strategy, etiological category of diffuse lung injury, and body position of the patient.** Crit Care Med 2003; 31:411–418.

LIM, S. et al. **Transient hemodynamic effects of recruitment maneuvers in three experimental models of acute lung injury.** Crit Care Med 2004; 32: 2378–2384.

LORING, S.H.; MEAD J. **Action of the diaphragm on the rib cage inferred from forced-balance analysis.** J Appl Physiol 1982; 53:756-760.

LUHR, O.R.; ANTONSEN, K.; KARLSSON, M. **Incidence and mortality after acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark and Iceland.** Am Resp Crit Care Med 1999; 159:1849-1861.

MARTIN, T.R. **Lung cytokines and SDRA.** Chest 1999; 116: 2s.

MASCARENHAS, M.M. et al. **Low molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances interleukin-8 expression.** Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 30: 51-60.

MCCULLOCH, P.R.; FORKERT, P.G.; FROESE, A.B. **Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillation in surfactant deficient rabbits.** Am Rev Respir Dis 1988; 137: 1185-119.

MILLIC-EMILI, J.; MEAD, J.; TURNER, J.M. **Topography of esophageal pressure as a function of posture in a man.** J Appl Physiol 1964; 19:212-216.

MEADE, M.O. et al. **Lung Open Ventilation Study Investigators. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.** JAMA 2008; 299:637-645.

MEDURI, G.U. et al. **Fibroproliferative phase of ARDS. Clinical findings and effects of corticosteroids.** Chest 1991;100:943-52.

MENDEZ, J.L.; HUBMAYR, R.D. **New insights into the pathology of acute respiratory failure.** *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 29-36.

MERCAT, A. et al. **Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2008 ; 299: 646-55.

MONTEGOMERY, B.A. et al. **Causes of mortality in patients with adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Resp Dis* 1985; 132:485-491.

MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, A. **Two sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurement in small animals.** *J Appl Physiol* 1983; 55:250-53.

MUSCEDERE, J.G. et al. **Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1327-1334.

NAGASE, T.; LEI, M.; ROBATTO, F.M. **Tissue viscance during induced constriction in rabbit lungs: morphological-physiological correlations.** *J Appl Physiol* 1992; 73: 1900-1907.

NUCKTON, J.T. et al. **Pulmonary dead space fraction as a risk factor for death in SDRA.** *N Engl J Med* 2002; 346:1281-86.

OCZENSKI, W. **Recruitment maneuvers after a positive end expiratory pressure trial do not induce sustained effects in early adult respiratory distress syndrome.** *Anesthesiology* 2004; 101:620-625.

PARKER, J. C.; TOWNSLEY, M. I.; RIPPE, B. **Increase microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressure.** *J Appl Physiol* 1984; 57: 1809-1816.

PARKER, J.C. et al. **Lung edema caused by high peak inspiratory pressures in dogs. Role of increased microvascular filtration pressure and permeability.** *Am Rev Respir Dis* 1990;142:321-8.

PARKER, J.C.; BREEN, E.C.; WEST, J.B. **High vascular and airway pressures increase interstitial protein mRNA expression in isolated rat lungs.** *J Appl Physiol* 1997; 83: 1697-1705.

PATRONITI, N. et al. **Sigh improves gas exchange and lung volume in patients with Acute Respiratory Distress Syndrome undergoing pressure support ventilation.** *Anesthesiology* 2002; 96: 788–794.

PELOSI, P.; CADRINGHER, P.; BOTTINO, N. **Sigh in acute respiratory distress syndrome.** *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159: 872-880.

PELOSI, P.; CAIRONI, P.; GATTINONI, L. **Pulmonary and extrapulmonary forms of acute respiratory distress syndrome.** *Semin Respir Crit Care Med* 2001; 22: 259-268.

PELOSI, P. et al. **Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different.** *Eur Respir J Suppl* 2003; 42: 48S-56S.

PELOSI, P. et al. **Sigh in supine and prone position during acute respiratory distress syndrome.** Am J Resp Crit Care 2003; 167: 521-527.

PELOSI, P.; ROCCO, P.R. **Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix.** Intensive Care Med 2008, 34:631–639.

PETRUCCI, N.; IACOVELLI, W. **Ventilation with lower tidal volumes versus traditional tidal volumes in adults for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (Cochrane Review).** In: The Cochrane Library, Issue 1, 2004. Chichester, UK: John Wiley e Sons, Ltd.

RANIERI, V.M.; GIUNTA, F.; SUTER, P.M. **Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome.** JAMA 2000; 284: 43-44.

RIVA, D.R. et al. **Recruitment Maneuver in pulmonary and extrapulmonary experimental acute lung injury.** Crit Care Med 2008; 36:1900-1908.

ROCCO, P.R. et al. **Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury.** Am J Respir Crit Care Med 2001; 164:1067-711.

ROCCO, P.R. et al. **Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury.** Respir Physiol Neurobiol 2004; 143:49-61.

ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. **Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different?** Curr Opin Crit Care 2005; 11:10-7.

ROCCO, P.R.; PELOSI, P. **Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality?** Curr Opin Crit Care. 2008; 14: 50-5.

ROTHEN, H.U. et al. **Prevention of atelectasis during general anaesthesia.** Lancet 1995; 345: 1387-1391.

ROTHEN, H.U. et al. **Dynamics of re-expansion of atelectasis during anesthesia.** Brit J Anest 1999; 82: 551-556.

RUBENFELD, G.D. et al. **Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury.** N Engl J Med 2005; 353: 1685-1693.

SAKIN, H. **Mecanosensitive channels.** Animal Ver Phisyol 1995; 57: 333-353.

SCHARTZ, M.D. et al. **Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome.** Crit Care Med 1996; 24: 1285-1292.

SIMILOWSKI, T. et al. **Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption.** J Appl Physiol 1989; 67:2219-2229.

SJOSTRAND, U.H. et al. **Different ventilatory approaches to keep the lung open.** Intensive Care Med 1995; 21: 308-310.

SLADEN, A.; LAVER, M.B.; PONTOPPIDAN, H. **Pulmonary complications and water retention in prolonged mechanical ventilation.** N Engl J Med 1968; 279: 448-453.

STEINBERG, K.P.; KACMAREK, R.M. **Should Tidal Volume Be 6 mL/kg Predicted Body Weight in Virtually All Patients With Acute Respiratory Failure?** Respir Care 2007; 52:556–564.

SUKI, B. et al. **Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces.** J Appl Physiol 2005, 98:1892-1899.

TREMBLAY, L. et al. **Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model.** J Clin Invest 1997; 99: 944–952.

VALTA, P. et al. **Acute respiratory distress syndrome: frequency, clinical course, and costs of care.** Crit Care Med 1999; 27: 2573-2574.

VAPORIDI, K. et al. **Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO<sub>2</sub> in a mouse model of normal lung.** Crit Care Med 2008; 36: 1277–1283.

VILLAR, J. et al. **An early PEEP/FIO<sub>2</sub> trial identifies different degrees of lung injury in patients with acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 2007; 176:795-804.

VINCENT, J.L. ; SAKR, Y. ; RANIERE, V.M. **Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients.** Crit Care Med 2003; 31: S296-299.

WALLACE, W.A.; DONNELLY, S.C. **Pathogenesis of acute microvascular lung injury and the acute respiratory distress syndrome.** Eur Resp Monogr 2002; 7: 22-32.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. **Acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med 2000; 342:1334-1349.

WARE, L.B.; MATTHAY M.A. **Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1376-1383.

WEBB, H.H.; TIERNEY, D.F. **Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure.** Am Rev Respir Dis 1974; 110: 556-565.

WEIBEL, E.R. **How does lung structure affects gas exchange?** Chest 1983; 83: 657-665.

WEIBEL, E.R. **Morphometry: stereological theory and practical methods.** In: Models of lung disease – microscopy and structural methods. J Gil editor. Vol. 47. New York, 1990. p 199-247.

WIJSMAN, J.H. et al. **A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA.** J Histochem Cytochem 1993; 41: 7-12.

WIRTZ, H.R.; DOBBS, L.G. **The effects of mechanical forces on lung functions.** Respiration Physiology 2000; 119: 1-17.

XU, J.; LIU, M.; LIU, J. **Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells.** J Cell Science 1996; 109: 1605-1613.

ZAMBON, M.; VINCENT, J.L. **Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time.** Chest 2008, 133: 1120-1127.

## 9. ANEXO I

### **Successful Submission Confirmation**      July 29, 2008 13:16

Your manuscript has been successfully uploaded to American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. You will receive future communications via e-mail.

Your manuscript number is: **Blue-200807-11820C**

Please make note of your manuscript number. You will receive an e-mail from Blue within 24 hours of the end of this process, confirming receipt of your submission.

---

**EFFECTS OF FREQUENCY AND INSPIRATORY PLATEAU PRESSURE  
DURING SIGH IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY**

<sup>1</sup>Paula W Steimback, <sup>1</sup>Gisele P Oliveira, <sup>1</sup>Andréia F Rzezinski, <sup>1</sup>Pedro L Silva,  
<sup>1</sup>Cristiane SNB Garcia, <sup>2</sup>Graziela Rangel, <sup>2</sup>Marcelo M Morales, <sup>3</sup>José R Lapa e Silva,  
<sup>4</sup>Vera L Capelozzi,  
<sup>5</sup>Paolo Pelosi, <sup>1</sup>Patricia RM Rocco

<sup>1</sup>Laboratory of Pulmonary Investigation, <sup>2</sup>Laboratory of Cellular and Molecular  
Physiology Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, <sup>3</sup>Department of Pneumology,  
Federal University of Rio de Janeiro, RJ, <sup>4</sup>Department of Pathology, University of São  
Paulo, São Paulo, SP, Brazil, <sup>5</sup>Department of Ambient, Health and Safety, University  
of Insubria, Varese, Italy

Correspondence address: Patricia Rieken Macedo Rocco

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - C.C.S.

Laboratório de Investigação Pulmonar

Ilha do Fundão, 21941-902 - Rio de Janeiro – RJ

Brazil

e-mail: [prmrocco@biof.ufrj.br](mailto:prmrocco@biof.ufrj.br)

tel: (+5521) 2562-6530

fax: (+5521) 2280-8193

Supported by: Centers of Excellence Program (PRONEX-FAPERJ), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro State Research Supporting Foundation (FAPERJ), São Paulo State Research Supporting Foundation (FAPESP).

Running head: Sigh frequency and plateau pressure

Subject of the manuscript: 10 Ventilator-induced lung injury

Word count: 2411

**Scientific Knowledge on the Subject**

Previous studies have reported that sigh improves respiratory function. However, both sigh frequency and the level of inspiratory plateau pressure may yield shear and tensile stresses inducing lung damage.

**What This Study Adds to the Field**

In the present ALI model, the reduction in sigh frequency led to a better morphofunctional and molecular profile, while the combination with reduced inspiratory plateau pressure worsened lung mechanics and histology with no further protective effects.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

**ABSTRACT (250)**

*Rationale:* Sigh improves lung mechanics and oxygenation in acute lung injury (ALI), however it may promote pulmonary damage induced by high frequency and inspiratory plateau pressure (Pplat). *Objective:* To evaluate the role of frequency and Pplat during sigh in ALI. *Methods:* We studied healthy [saline (0.1 ml, intraperitoneally)] and paraquat-induced ALI (15 mg/kg, intraperitoneally) rats. At twenty-four hours, rats were anesthetized and mechanically ventilated with tidal volume=4ml/kg and PEEP=5cmH<sub>2</sub>O in air. Recruitment maneuver (RM) was then applied using continuous positive airway pressure (CPAP) at 40 cmH<sub>2</sub>O for 40 s or sigh using 3 different strategies for 1-hour: a) three sighs/minute, Pplat=40cmH<sub>2</sub>O (S180/40), b) one sigh every 6-min, Pplat=40cmH<sub>2</sub>O (S10/40), and c) one sigh every 6-min, Pplat=20cmH<sub>2</sub>O (S10/20). *Measurements and Main Results:* Lung static elastance (Est,L) and oxygenation (PaO<sub>2</sub>) improved independent of sigh frequency. However, S180/40 showed alveolar hyperinflation, worsening in alveolar epithelium lesion, increased lung and kidney epithelial cell apoptosis, and type III procollagen (PCIII) mRNA expression. S10/40 yielded a further decrease in Est,L, improvement in PaO<sub>2</sub>, and a reduction in hyperinflation, lung and kidney epithelial cell apoptosis, and PCIII mRNA expression. Est,L and alveolar collapse were higher in S10/20 than S10/40, but PCIII mRNA expression remained similar to S10/40. *Conclusion:* The reduction in sigh frequency led to a better lung morphofunctional and molecular profile, while the combination with reduced Pplat worsened lung mechanics and histology with no further protective effects. The frequency and the level of Pplat of sigh are important parameters to improve pulmonary function minimizing lung injury.

**Key Words:** Acute Lung Injury, Recruitment maneuvers, Ventilator-Induced Lung Injury, Transpulmonary pressure, Apoptosis

## INTRODUCTION (276)

The use of low tidal volumes and limited inspiratory plateau pressure has been proposed to ventilate Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Acute Lung Injury (ALI) patients and prevent lung and distal organs injury<sup>(1-6)</sup>. The reduction in tidal volume may result in alveolar derecruitment if not enough positive end-expiratory pressure (PEEP) is applied to prevent alveolar collapse<sup>(7)</sup>. Several Recruitment Maneuvers (RMs) have been used in clinical and experimental ALI/ARDS to open the lung, favoring the use of lower PEEP levels<sup>(8, 9)</sup>. Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) of 40 cmH<sub>2</sub>O for 40 seconds (RM-CPAP) is a well known method of RM since it ameliorates lung function<sup>(10)</sup>. However, RM-CPAP failed to induce a sustained improvement of oxygenation<sup>(11-13)</sup> and may result in lung injury<sup>(14, 15)</sup>. Similarly, sigh showed a beneficial<sup>(7, 16)</sup> but short-lived effect<sup>(17)</sup> on lung mechanics and oxygenation. However, both the level of sigh frequency<sup>(18)</sup> and inspiratory plateau pressure may yield shear and tensile stresses inducing lung damage.

In an experimental model of moderate ALI, we tested the following hypothesis: a) sigh could improve gas-exchange and lung mechanics, opening collapsed alveoli while minimizing lung and distal organs injury; b) the reduction of both sigh frequency and inspiratory plateau pressure could maintain the benefits on lung function with lower alveolar stress.

For this purpose, arterial oxygen partial pressure, lung static elastance and histology (light and electron microscopy), lung, kidney, liver, and small intestine villi epithelial cell apoptosis, and type III procollagen (PCIII) mRNA expression in lung tissue were measured in animals with and without ALI.

Some of the results of this study have been previously reported in abstract form<sup>(19)</sup>.

## **METHODS (489)**

### **Animal Preparation and Experimental Protocol**

Ninety-six Wistar rats (250-300g) were randomly assigned into 2 main groups: Control (CTRL, n=48) and Acute Lung Injury (ALI, n=48), where sterile saline solution (1 ml) or paraquat (15 mg/kg) were intraperitoneally (*ip*) injected, respectively.

Thirty-two rats of each group were used to analyze lung static elastance (Est,L) and post-recruitment histology and the remaining sixteen rats of each group were used for lung histology in non-ventilated animals (NV).

Twenty-four hours after saline or paraquat administration, the animals were sedated (diazepam 1 mg, *ip*), anesthetized (thiopental sodium 20 mg/kg, *ip*), tracheotomized, paralyzed (pancuronium 2 mg/kg, intravenously), and mechanically ventilated (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay) with the following parameters: tidal volume ( $V_T$ )=4 ml/kg, respiratory rate=80 breaths/min, inspiratory:expiratory ratio=1:2, inspired oxygen fraction=0.21, and PEEP=5 cmH<sub>2</sub>O. Arterial oxygen partial pressure (PaO<sub>2</sub>) (i-STAT, Abbott Laboratories, Illinois, USA) and Est,L were measured (BASELINE), after which animals were randomized as follows: 1) Non-recruited (NR); 2) Recruitment maneuver with 40 cmH<sub>2</sub>O pressure inflation for 40-seconds (RM-CPAP), and 3) Sigh. Sighs were applied using three different strategies: 1) three sighs per minute with inspiratory plateau pressure (Pplat) of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40), 2) one sigh every six minutes with Pplat of 40 cmH<sub>2</sub>O (S10/40), 3) one sigh every six minutes with Pplat of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20) (Figure 1). After 1-hr ventilation, PaO<sub>2</sub> and Est,L were analyzed, lungs and distal organs were then prepared for histology, and PCIII mRNA expression in lung tissue was measured (Figure 2).

### **Mechanics**

Airflow, volume, tracheal and esophageal pressures were measured <sup>(20)</sup>. Est,L was calculated by dividing the transpulmonary plateau pressure by the tidal volume using ANADAT data analysis software (RHT-InfoData).

## **Histology**

### *Light Microscopy*

Lungs were removed, fixed, and paraffin embedded. Four-? m-thick slices underwent hematoxylin-eosin staining. The volume fraction of normal, collapsed, and hyperinflated pulmonary areas were determined by point-counting technique <sup>(21)</sup>.

### *Transmission electron microscopy*

Three slices were cut from three different segments of the left lung and fixed for electron microscopy (JEOL 1010 Transmission Electron Microscope, Tokyo, Japan) analysis <sup>(20)</sup>.

### *Apoptosis Analysis*

Lungs, liver, kidney and small intestine villi were fixed and paraffin embedded. The cellular localization of Fas and FasL proteins was studied by the streptavidin-biotin immunoperoxidase method using the anti-Fas-L polyclonal antibody (Clone FSL01; same as 5D1, NeoMarkers, Westinghouse, CA). Ten fields per section from the regions with apoptotic cells were examined to discriminate nuclei with fragmentation of condensed chromatin masses. A semiquantitative system was used to assess the degree of apoptosis.

## **Semi-quantitative reverse-transcription and polymerase chain reaction**

Lung parenchyma strips were cut from left lungs and the relative expression of PCIII was obtained by semi-quantitative Reverse-Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). In the PCIII mRNA detection by RT-PCR, glyceraldehyde-

3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) primers were used as internal positive control<sup>(14, 20)</sup>.

### Statistical Analysis

Differences among the groups were assessed by two-way ANOVA followed by Tukey's test or two-way ANOVA on ranks followed by Dunn's post-hoc test. A p value < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

The percentage of variation of PaO<sub>2</sub> from END to BASELINE ( $\Delta$ PaO<sub>2</sub>,%) was higher in S180/40 than RM-CPAP (p<0.05) (Figure 3). The reduction sigh frequency, independent of inspiratory plateau pressure (S10/40 and S10/20), led to an increase in  $\Delta$ PaO<sub>2</sub>,%. However,  $\Delta$ PaO<sub>2</sub>,% was higher in S10/40 than S10/20. Est,L significantly increased in ALI compared to CTRL (Figure 4). RM-CPAP did not modify Est,L while sigh (S180/40, S10/40, and S10/20) significantly decreased Est,L. Est,L was lower in S10/40 than S10/20 (Figure 4).

The fraction area of alveolar collapse was higher in ALI compared to CTRL, and lower in NV than NR animals. S180/40 showed a reduction of alveolar collapse and increased hyperinflated areas compared to RM-CPAP (Figure 5). The reduction in sigh frequency (S10/40) led to a decrease in alveolar collapse and hyperinflation, while the amount of alveolar collapse was similar in S10/20 and S180/40, with less hyperinflation.

All ALI animals showed cytoplasmic degeneration of type II pneumocyte (PII) and endothelial damage compared to CTRL (Table 1). However, in S180/40 group, type II pneumocyte and endothelial damage increased with a detachment of alveolar epithelium and denudation of epithelial basement membrane. In S10/40 and S10/20 these ultrastructural changes were minimized (Table 1).

The present model of ALI led to lung and distal organ epithelial cell apoptosis. Lung and kidney apoptosis were increased only in S180/40 group (Table 2, Figure 6).

PCIII mRNA expression was higher in ALI than CTRL groups. In both ALI and CTRL, S180/40 increased PCIII mRNA expression (Figure 7A) while RM-CPAP showed no alteration. The drop in sigh frequency (S10/40) significantly reduced PCIII mRNA expression (Figure 7B), but the combination with decreased inspiratory plateau pressure (S10/20) did not lead to a further reduction (Figure 7C).

## **DISCUSSION**

In the present model of paraquat-induced moderate ALI, sigh improved oxygenation and lung static elastance as well as decreased alveolar collapse; however, it yielded hyperinflation, ultrastructural changes in alveolar capillary membrane, increased lung and kidney epithelial cell apoptosis, and PCIII mRNA expression. The reduction in sigh frequency further decreased lung static elastance and improved oxygenation, with a marked decrease in alveolar hyperinflation, PCIII mRNA expression, and apoptosis in lung and kidney epithelial cells. Reduced sigh frequency associated with lower inspiratory plateau pressure worsened lung static elastance, histology and oxygenation, but did not decrease PCIII mRNA expression nor modify epithelial cells apoptosis of distal organs.

To our knowledge this is the first study investigating the role of sigh on lung and distal organs injury in an experimental model of ALI.

Acute Lung Injury was induced by paraquat, a herbicide that accumulates predominantly in the lung and induces alveolar epithelial damage due to its action on type II pneumocytes. This model leads to a well reproducible moderate lung injury characterized by alveolar collapse, interstitial edema, and hyaline membrane, without alveolar edema <sup>(22, 23)</sup>. In addition, the present ALI model induced lung, kidney, liver

and small intestine villi epithelial cells apoptosis <sup>(24)</sup>. In our study the degree of alveolar collapse in non-ventilated ALI (NV) was around 34% (Figure 5) similar to that observed in previous experimental <sup>(14,22)</sup> and human studies in ALI/ARDS <sup>(25)</sup>. Mechanical ventilation with 5 cmH<sub>2</sub>O PEEP, without recruitment (NR) reduced the amount of alveolar collapse to 26%, compared to NV. However, Est,L increased and oxygenation decreased during the 1-hr period of mechanical ventilation. This deterioration may be caused by the use of limited tidal volume and/or an insufficient PEEP level to open collapsed alveoli. We decided to use low tidal volume and 5 cmH<sub>2</sub>O PEEP to minimize the possible interactions between conventional mechanical ventilation and different recruitment strategies on ventilator-induced lung injury (VILI) determined by lung strain (inflated volume to functional residual capacity ratio) and stress (transpulmonary pressure) <sup>(26, 27)</sup>. Besides animals were ventilated in air to prevent reabsorption atelectasis <sup>(28)</sup> and reduce possible hyperoxia-induced lung injury <sup>(29)</sup>.

### **Comparison between RM-CPAP and S180/40**

Sigh was compared with RM-CPAP (40 cmH<sub>2</sub>O for 40 seconds) <sup>(1)</sup> since this is the most frequently used RM in clinical practice <sup>(30)</sup>.

RM-CPAP did not significantly change Est,L, but improved oxygenation and reduced atelectasis after 1 hour mechanical ventilation. We can not rule out the fact that RM-CPAP may lead to an early improvement in Est,L, and its beneficial effects wore off with time. According to our results, several experimental and clinical data showed that RM-CPAP may provide only temporary improvement in lung function <sup>(10, 13)</sup>.

The application of sigh increased Est,L and oxygenation, as well as reduced alveolar collapse more effectively than RM-CPAP. In accordance with these data, sigh improved lung function in ALI/ARDS patients both in supine <sup>(16)</sup> and prone positioning <sup>(7)</sup>. On the other hand, sigh induced alveolar hyperinflation, detachment of alveolar barrier,

type II pneumocyte necrosis, denudation of the basement membrane, endothelium injury (Table 1), associated with an increase in PCIII mRNA expression (Figure 7). The high pressure of sigh used to re-expand and open collapsed lung units may expose the alveoli to tensile and shear stresses stimulating fibroblasts and macrophages to synthesize collagen fibers. PCIII mRNA expression was evaluated since it has been used as an early marker of lung parenchyma remodeling<sup>(14, 20, 31, 32)</sup>. Our results are in accordance with previous reports demonstrating increased procollagen mRNA expression in lungs submitted to high airway pressures<sup>(33)</sup>, high inflation<sup>(14, 20, 32, 34)</sup> or cyclic mechanical strain<sup>(34)</sup>. Additionally, sigh led to higher lung and kidney epithelial cells apoptosis, in line with other studies, which reported epithelial cells apoptosis in distal organs during injurious mechanical ventilation<sup>(35)</sup>. In this context, kidney has been described as the first distal organ to be damaged during injurious mechanical ventilation<sup>(36, 37)</sup>. In our study, the degree of lung stress induced by sigh was probably not high enough to cause small intestine villi and liver epithelial cell apoptosis<sup>(38)</sup>. We also observed an important dissociation between the improvement in the clinical parameters and molecular (Figure 7) and ultra-structural (Table 2) changes in lung parenchyma. Although the measurements of oxygenation and respiratory mechanics are most commonly used to optimize mechanical ventilation at the bedside, our experimental data suggest that they do not necessarily represent the best parameters to monitor the RMs effects<sup>(26, 30, 39)</sup>.

### **Reduction of sigh frequency**

It is unknown the appropriate sigh frequency to keep the lung open avoiding lung injury. In our study, the reduction in sigh frequency led to an improvement in oxygenation associated with a decrease in Est,L, the fraction area of alveolar collapse, and hyperinflation. Higher respiratory frequencies may induce lung injury by both elevating the magnitude of shear stress from more rapid inflations (thereby exceeding the failure limit and reducing the number of cycles required for failure) and

more rapidly achieving the total number of cycles required for failure<sup>(40-42)</sup>. Additionally, the increase in respiratory frequency was associated with the release of inflammatory mediators<sup>(43)</sup>. Therefore lower sigh frequency resulted in less lung epithelial and endothelial damage, leading to reduced PCIII expression and lung epithelial cell apoptosis. It was hypothesized that the reduction of sigh frequency led to an increase in the time necessary to repair alveolar capillary membrane, thus protecting lungs from further damage<sup>(18)</sup>. Therefore, we speculate that there is a sigh frequency threshold beyond which the intrinsic reparative properties of the lung epithelium are overwhelmed. Clearly, the optimal sigh frequency may be different in healthy and ALI animals/patients.

We also observed a reduction in kidney epithelial cells apoptosis that could be related to the attenuation of the overall inflammatory process<sup>(18, 44)</sup>. On the other hand, we cannot rule out the possible improvement of regional perfusion during reduced sigh frequency, leading to better oxygen delivery to peripheral organs.

### **Reduction of plateau pressure during sigh**

Since PCIII mRNA expression remained higher in S10/40 than non-recruited ALI animals, we hypothesized that the reduction in inspiratory plateau pressure, at lower frequency, could yield similar lung function and morphometry with lower degree of pulmonary stress. We found that the association of reduced sigh frequency and inspiratory plateau pressure (S10/20) worsened oxygenation, lung mechanics and histology with no significant modification in epithelial cell apoptosis of the lung and distal organs, and PCIII mRNA expression. Therefore, although lower inspiratory plateau pressure during sigh could reduce the tensile stress, it was unable to open the collapsed alveoli leading to shear stress and maintaining higher PCIII mRNA expression<sup>(14)</sup>.

Our data should not be directly extrapolated to the clinical scenario. In fact, the current study has several limitations: 1) specific experimental model of moderate ALI induced by paraquat. Thus, we do not know if similar results can be obtained in other experimental models of ALI, with different degrees of lung injury and in larger animals; 2) the short duration of the experiment, just 1 hr, which hinders assessment of possible long term effects of RMs; 3) different types of sigh have been proposed, with periodic increase in inspiratory plateau pressure, PEEP or both <sup>(45-47)</sup>. In the present study, we only evaluated sigh performed by periodic changes in inspiratory plateau pressure at different frequencies; 4) PEEP was not individually titrated, although we applied 5 cmH<sub>2</sub>O PEEP. We cannot exclude that different results could have been obtained at higher PEEP levels; 5) we measured only PCIII mRNA expression, thus the impact of RMs on different inflammatory mediators was not evaluated; and 6) the effects of RMs on cardiovascular parameters were not investigated.

In conclusion, under the present experimental conditions, sigh at 40 cmH<sub>2</sub>O inspiratory plateau pressure was effective at opening collapsed alveoli, improving oxygenation and lung mechanics independent of the frequency. The reduction in sigh frequency led to a better lung morphofunctional and molecular profile. However, the combination of lower sigh frequency and inspiratory plateau pressure worsened lung function and histology, with no further protective effects on lung and distal organs. The best method of recruitment maneuver remains uncertain and the optimal inspiratory plateau pressure, duration and periodicity need to be elucidated.

**Acknowledgements**

We would like to express our gratitude to Mr. Andre Benedito da Silva for animal care, Mrs. Miriam Regina Taborda Simone and Ana Lucia Neves da Silva for their help with microscopy, Ms. Jaqueline Lima do Nascimento for her skillful technical assistance during the experiments, and Mrs. Moira Elizabeth Schöttler for assistance in editing the manuscript.

## References

1. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338:347-354.
2. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, Schoenfeld D, Thompson BT; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000; 342:1301-1308.
3. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, Schoenfeld D, Thompson BT; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2004; 351:327-336.
4. Villar J, Pérez-Méndez L, López J, Belda J, Blanco J, Saralegui I, Suárez-Sipmann F, López J, Lubillo S, Kacmarek RM; HELP Network. An early PEEP/FIO<sub>2</sub> trial identifies different degrees of lung injury in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:795-804.
5. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, Davies AR, Hand LE, Zhou Q, Thabane L, Austin P, Lapinsky S, Baxter A, Russell J, Skrobik Y, Ronco JJ, Stewart TE; Lung Open Ventilation Study Investigators. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299:637-645.

6. Mercat A, Richard JC, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl JL, Lefrant JY, Prat G, Richecoeur J, Nieszkowska A, Gervais C, Baudot J, Bouadma L, Brochard L; Expiratory Pressure (Express) Study Group. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299:646-665.
7. Pelosi P, Chiumello D, Calvi E, Taccone P, Bottino N, Panigada M, Cadringer P, Gattinoni L. Effects of different continuous positive airway pressure devices and periodic hyperinflations on respiratory function. *Crit Care Med* 2001; 29:1683-1689.
8. Rimensberger PC, Pristine G, Mullen JB, Cox PN, Slutsky AS. The open lung during small tidal volume ventilation: Concepts of recruitment and "optimal" positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med* 1999; 27:1946-1952.
9. Piacentini E, Villagr a A, L pez-Aguilar J, Blanch L. Clinical review: the implications of experimental and clinical studies of recruitment maneuvers in acute lung injury. *Crit Care* 2004; 8:115-121.
10. Grasso S, Mascia L, Del Turco M, Malacarne P, Giunta F, Brochard L, Slutsky AS, Ranieri M. Effects of recruiting maneuvers in patients with acute respiratory distress syndrome ventilated with protective ventilatory strategy. *Anesthesiology* 2002; 96:795-802.
11. Musch G, Harris RS, Vidal Melo MF, O'Neill KR, Layfield JD, Winkler T, Venegas JG. Mechanism by which a sustained inflation can worsen oxygenation in acute lung injury. *Anesthesiology* 2004; 100:323-330.
12. Villagra A, Ochagavia A, Vatua S, Murias G, Fern andez MM, Aguilar JL, Fern andez R, Blanch L. Recruitment maneuvers during lung protective ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 65:165-170.

13. Oczenski W, Hormann C, Keller C, Lorenzl N, Kepka A, Schwarz S, Fitzgerald RD. Recruitment maneuvers after a positive end expiratory pressure trial do not induce sustained effects in early adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 2004; 101:620-625.
14. Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, Santana MC, Lassance R, Prota LF, Amato MB, Morales MM, Zin WA, Rocco PR. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl Physiol* 2005; 98:53-61.
15. Constantin JM, Cayot-Constantin S, Roszyk L, Futier E, Sapin V, Dastugue B, Bazin JE, Rouby JJ. Response to recruitment maneuver influences net alveolar fluid clearance in acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 2007; 106:944-951.
16. Pelosi P, Cadringer 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* 1999; 159:872–880.
17. Fujino Y, Goddon S, Dolhnikoff M, Hess D, Amato MB, Kacmarek RM. Repetitive high-pressure recruitment maneuvers required to maximally recruit lung in a sheep model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29:1579-1586.
18. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JH. Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 91:710-717.
19. Steimback PW, Silva PL, Oliveira GP, Rangel G, Capelozzi VL, Morales MM, Pelosi P, Rocco PR. Sigh induced lung mechanical stress in acute lung injury [abstract]. *Am J Resp Crit Care* 2007, A22.

20. Riva DR, Oliveira MB, Rzezinski AF, Rangel G, Capelozzi VL, Zin WA, Morales MM, Pelosi P, Rocco PR. Recruitment Maneuver in pulmonary and extrapulmonary experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 2008; 36:1900-1908.
21. Weibel ER. Morphometry: Stereological theory and practical methods. In: *Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods*. Gil J Editor. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 199–247.
22. Rocco PR, 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; 164:1067-1071.
23. Delaval PM, Gillespie DJ. Pulmonary dysfunction during paraquat- induced lung injury: a model of acute alveolar injury. *Crit Care Med* 1985; 13: 1056-1060.
24. Fabisiak JP, Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Lazo JS. Paraquat-induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. *Am J Physiol* 1998; 274:793-802.
25. Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri M, Quintel M, Russo S, Patroniti N, Cornejo R, Bugedo G. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2006; 354:1775–1786.
26. Chiumello D, Carlesso E, Cadringer P, Caironi P, Valenza F, Polli F, Tallarini F, Cozzi P, Cressoni M, Colombo A, Marini JJ, Gattinoni L. Lung Stress and Strain During Mechanical Ventilation of the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 May 1. [Epub ahead of print]
27. Gattinoni L, Carlesso E, Cadringer P, Valenza F, Vagginelli F, Chiumello D. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. *Eur Respir J* 2003; 47:15-25.

28. Rothen HU, Sporre B, Engberg G, Wegenius G, Reber A, Hedenstierna G. Prevention of atelectasis during general anaesthesia. *Lancet* 1995; 345:1387-1391.
29. Kulkarni AC, Kuppusamy P, Parinandi N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:1717-1730.
30. Steinberg KP and Kacmarek RM. Should Tidal Volume Be 6 mL/kg Predicted Body Weight in Virtually All Patients With Acute Respiratory Failure? *Respir Care* 2007; 52:556–564.
31. Garcia CS, Rocco PR, Facchinetti LD, Lassance RM, Caruso P, Deheinzelin D, Romero PV, Faffe DS, Zin WA. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 144:59-70.
32. de Carvalho MEP, Dolhnikoff M, Meireles SI, Reis LF, Martins MA, Deheinzelin D. Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. *Crit Care* 2007; 11:R23.
33. Parker JC, Breen EC, West JB. High vascular and airway pressures increase interstitial protein mRNA expression in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1997; 83:1697-1705.
34. Berg JT, Fu Z, Breen EC, Tran HC, Mathieu-Costello O, West JB. High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1997; 83:120-128.
35. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ

dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.  
*JAMA* 2003; 289:2104-2112.

36. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000; 284:43-44.
37. Koyner JL, Murray PT. Mechanical ventilation and lung-kidney interactions. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:562-570.
38. Martin TR. Interactions between Mechanical and Biological Processes in Acute Lung Injury. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:291-296.
39. Gattinoni L, Eleonora C, Caironi P. Monitoring of pulmonary mechanics in acute respiratory distress syndrome to titrate therapy. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:252-258.
40. Hotchkiss JR, Blanch LL, Murias G, Adams AB, Olson D, Wangenstein OD, Leo PH, Marini JJ. Effects of decreased respiratory frequency on ventilator induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:463-468.
41. Conrad SA, Zhang S, Arnold TC, et al. Protective effects of low respiratory frequency in experimental ventilator-associated lung injury. *Crit Care Med* 2005; 33:835-840.
42. Garcia CS, Abreu SC, Soares RM, Prota LF, Figueria RC, Morales MM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Pulmonary morphofunctional effects of mechanical ventilation with high inspiratory air flow. *Crit Care Med* 2008; 36:232-239.
43. Vaporidi K, Voiloudakis G, Priniannalis G, Kondili E, Koutsopoulos A, Tsatsanis C, Georgopoulos D. Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury

at a constant PaCO<sub>2</sub> in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med* 2008; 36:1277–1283.

44. Ko SC, Zhang H, Haitzma JJ, Cheng KC, Li CF, Slutsky AS. Effects of PEEP levels following repeated recruitment maneuvers on ventilator-induced lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52:514-521.
45. Constantin JM, Jaber S, Futier E, Cayot-Constantin S, Verny-Pic M, Jung B, Bailly A, Guerin R, Bazin JE. Respiratory effects of different recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2008; 12:R50.
46. Lim SC, Adams AB, Simonson DA, Dries DJ, Broccard AF, Hotchkiss JR, Marini JJ. Intercomparison of recruitment maneuver efficacy in three models of acute lung injury. *Crit Care Med* 2004; 32:2371-2377.
47. Lim CM, Jung H, Koh Y, Lee JS, Shim TS, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Kim WD. Effect of alveolar recruitment maneuver in early acute respiratory distress syndrome according to antiderecruitment strategy, etiological category of diffuse lung injury, and body position of the patient. *Crit Care Med* 2003; 31:411-418.

### Figure Legends:

*Figure 1.* A schematic flow chart of study design. Control (CTRL, n=48) and Acute Lung Injury (ALI, n=48) groups were randomized as follows: 1) Non-recruited (NR); 2) Recruitment maneuver with 40 second inflation to a peak airway pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (RM-CPAP), and 3) Sigh. Sighs were applied during one hour with three different strategies: 1) three sighs per minute with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40), 2) one sigh every six minutes with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S10/40), 3) one sigh every six minutes with plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20).

*Figure 2.* Timeline representation of the procedure.

*Figure 3.* Percentage increase in arterial oxygen partial pressure ( $P_{aO_2}$ , %) over BASELINE in Control (CTRL) and Acute Lung Injury (ALI) groups. Values are mean  $\pm$  SEM of 4 animals in each group. *Upper panel:* CTRL and ALI groups were randomized as follows: a) non-recruited (NR), b) a 40-second inflation to a peak airway pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (RM-CPAP), and c) three consecutive sighs per min during 1 hr with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40). \*Significantly different from NR ( $p < 0.05$ ). †Significantly different from RM-CPAP ( $p < 0.05$ ). ‡Significantly different from CTRL ( $p < 0.05$ ). *Lower panel:* Since no differences were found among CTRL groups, we presented the data related to only ALI group. S10/40: one sigh of 40 cmH<sub>2</sub>O every six minutes per hour, S10/20: one sigh of 20 cmH<sub>2</sub>O plateau pressure every six minutes per hour (S10/20). \*Significantly different from S180/40 ( $p < 0.05$ ). †Significantly different from S10/40 ( $p < 0.05$ ).

*Figure 4.* Lung static elastance (Est,L) immediately before (BASELINE) and 1 hour after (END) recruitment maneuver (RM) in Control (CTRL) and Acute Lung Injury (ALI) groups *Upper panel:* CTRL and ALI groups were randomized as follows: a) non-recruited (NR), b) a 40-second inflation to a peak airway pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (RM-CPAP), and c) three consecutive sighs per min during 1 hr with plateau pressure of

40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40). *Lower panel:* Sigh frequency was reduced: one sigh of 40 cmH<sub>2</sub>O every six minutes per hour (S10/40), as well as the plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20). Values are mean  $\pm$  SEM of 8 animals in each group (10 determinations per animal). \*Significantly different from BASELINE (p<0.05). †Significantly different from CTRL group (p<0.05).

*Figure 5.* The volume fraction of the lung occupied by hyperinflated structures (dark gray) or collapsed alveoli (gray) or normal pulmonary areas (white) in Control (CTRL) and Acute Lung Injury (ALI) groups. All values were computed in ten random, non-coincident fields per rat. Values are mean  $\pm$  SEM of 8 animals in each group. *Upper Panel:* CTRL and ALI groups were randomized as follows: a) non-recruited (NR), b) a 40-second inflation to a peak airway pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (RM-CPAP), and c) three consecutive sighs per min during 1 hr with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40). \*Significantly different from non-ventilated (NV) group (p<0.05), †significantly different from NR group (p<0.05), ‡significantly different from RM-CPAP group (p<0.05), \*\*significantly different from CTRL group (p<0.05). *Lower Panel:* Sigh frequency was reduced: one sigh of 40 cmH<sub>2</sub>O every six minutes per hour (S10/40), as well as the plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20). \*Significantly different from S180/40 (p<0.05).

*Figure 6.* Representative photomicrographs of lung (upper panels) and kidney (lower panels). *Upper panels:* Photomicrographs of lung parenchyma stained with hematoxylin-eosin (HE) and TUNEL technique. Control (CTRL) group depicted preserved architecture with normal alveoli (A) and ducts (D) and sparse brownish apoptotic lung cells (arrowheads). In contrast, in Acute Lung Injury (ALI) groups, lungs presented alveolar collapse (arrows), intra-alveolar edema (ed) and hyaline membranes (hm) and numerous brownish apoptotic pneumocytes (arrows). Note that in S10/40 and S10/20 groups, the number of apoptotic epithelial cells was lower than S180/40. *Lower Panel:* Photomicrographs of kidney stained with hematoxylin-eosin

(HE) and immunohistochemistry (IH) for FasL. In CTRL group, kidney shows glomeruli (G) and renal tubules (arrows) with preserved architecture and sparse brownish apoptotic renal cells (arrow). In ALI groups kidneys presented disarrangement of renal tubules with degenerative cytoplasmic changes (arrows) and numerous brownish apoptotic tubular cells (arrows). Note that in kidneys submitted to S180/40 increased number of epithelial cell apoptosis, while the reduction of both frequency and pressure decreased apoptotic cell number.

*Figure 7.* Relative expression of type III procollagen mRNA (PCIII) obtained by amplification of PCIII and glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) by semi-quantitative reverse-transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) of rat lung tissue in Control (CTRL) and Acute Lung Injury (ALI) groups. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 4) of the ratio between the densitometric values of PCIII and GAPDH bands obtained in RT-PCR experiments. *Upper panel:* CTRL and ALI groups were randomized as follows: a) non-recruited (NR), b) a 40-second inflation to a peak airway pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (RM-CPAP), and c) three consecutive sighs per min during 1 hr with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40). Sigh frequency was reduced: one sigh of 40 cmH<sub>2</sub>O every six minutes per hour (S10/40) [*lower panel (right)*], as well as the plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20) [*lower panel (left)*]. \*Significantly different from NR group (p<0.05). †Significantly different from RM-CPAP (p<0.05). ‡Significantly different from CTRL group (p<0.05). §Significantly different from S10/40 (p<0.05).

Table 1. Semi-quantitative analysis of electron microscopy in Acute Lung Injury group

Features	NR	RM-CPAP	S180/40	S10/40	S10/20
Alveolar capillary membrane	2 (1.5-2.5)	2 (2-2)	4 (3.5-4)*	2 (2-3)	2 (1.5-2.5)
Type II epithelial cells	2 (2-2.5)	2 (1.5-2.5)	3 (2.5-3.5)*	2 (1.5-2)	1.5 (1-2)
Endothelial cells	1.5 (1-2.5)	2 (2-2.5)	3.5 (2.5-4)*	1.5 (1-2.5)	1 (1-1.5)

Lung tissue score was done independently by two different investigators. The pathologic findings were graded according to a 5-point semi-quantitative severity-based scoring system: 0=normal lung parenchyma, 1=changes in 1 to 25%, 2= 26 to 50%, 3= 51 to 75%, and 4= 76 to 100% of the examined tissue. Electron microscopy of lung parenchyma in ALI groups. NR: Non-recruited, RM-CPAP: Recruitment maneuver with 40 cmH<sub>2</sub>O pressure inflation for 40-seconds, S180/40: three sighs per minute with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O, S10/40: one sigh every six minutes with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O, S10/20: one sigh every six minutes with plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O. Values are median (25<sup>th</sup> percentile-75<sup>th</sup> percentile) of four to five rats in each group.\*Significantly different from NR group (p<0.05).

Table 2. Epithelial cells apoptosis in Acute Lung Injury group

Organs	NR	RM-CPAP	S180/40	S10/40	S10/20
Lung	2.0 (1.5-2.5)	2.0 (1.5-2.5)	3.5 (3-4)*	2.0 (1.5-2)	2.0 (1.5-2.5)
Kidney	2.0 (2-3)	3.0 (2.5-3.5)	4.0 (3.5-4.0)*	2.5 (1.5-3.0)	2.0 (1.5-2.0)
Villi	1.5 (1-2.5)	2.0 (1.5-3)	2.5 (1.5-3.5)	2.5 (1.5-2.5)	2.0 (1.5-2.5)
Liver	2.5 (2-3)	2.5 (1.5-3.5)	2.0 (1.5-2.5)	3.0 (2.5-3.5)	2.0 (1.5-2.5)

Values are median (25<sup>th</sup> percentile-75<sup>th</sup> percentile) of 4 animals in each group. The apoptotic findings were graded as negative = 0, slight = 1, moderate = 2, high = 3 and severe = 4 in 10 non-coincident microscopic fields (400 x magnification). A mean score was then calculated (0 = normal lung parenchyma; 1 = 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75%; 4 = 76-100% of structures altered). NR: Non-recruited, RM-CPAP: Recruitment maneuver with 40 cmH<sub>2</sub>O pressure inflation for 40-seconds, S180/40: three sighs per minute with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O, S10/40: one sigh every six minutes with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O, S10/20: one sigh every six minutes with plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O. \*Significantly different from NR group (p<0.05).

Figure 1.

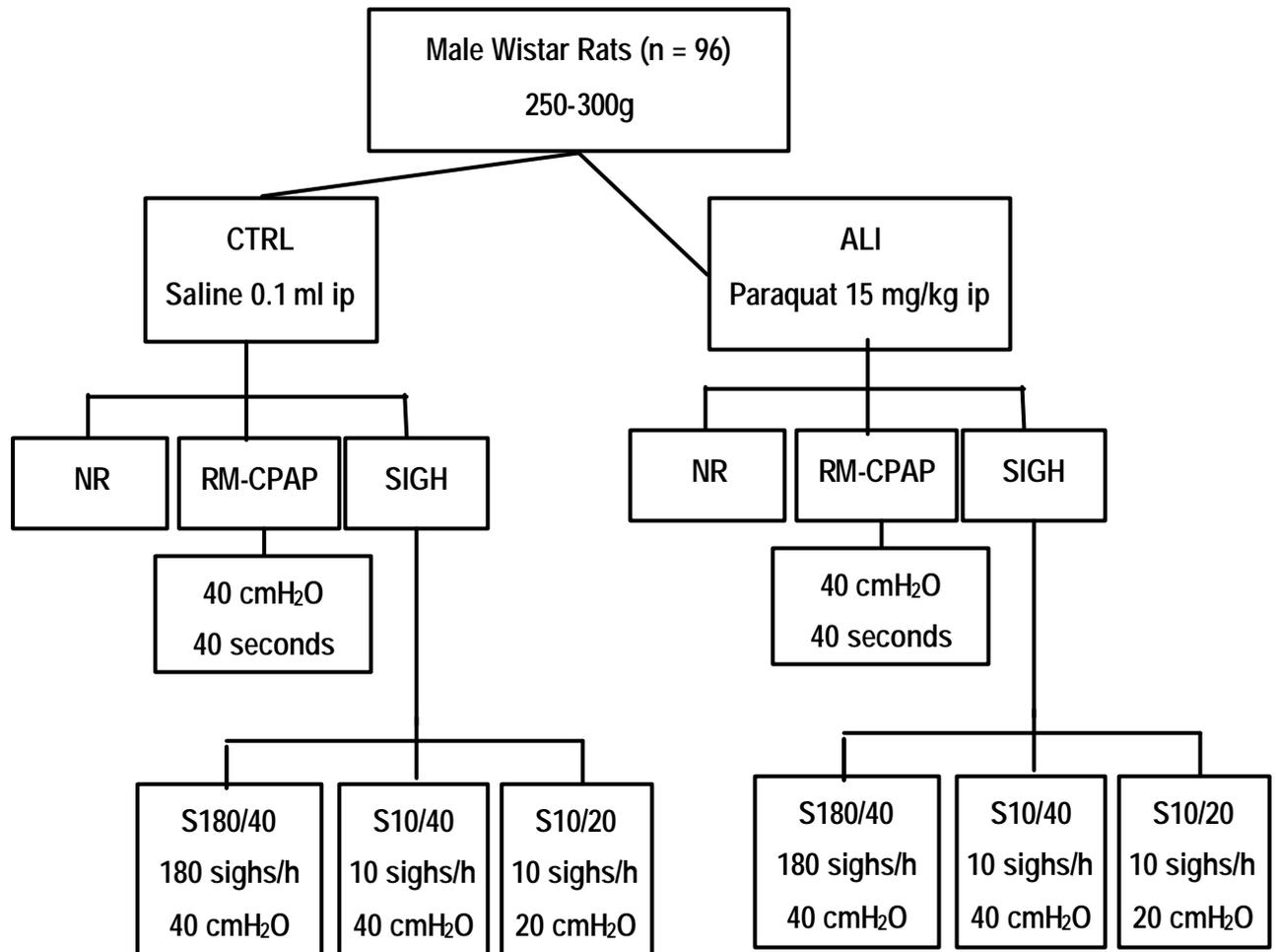


Figure 2.

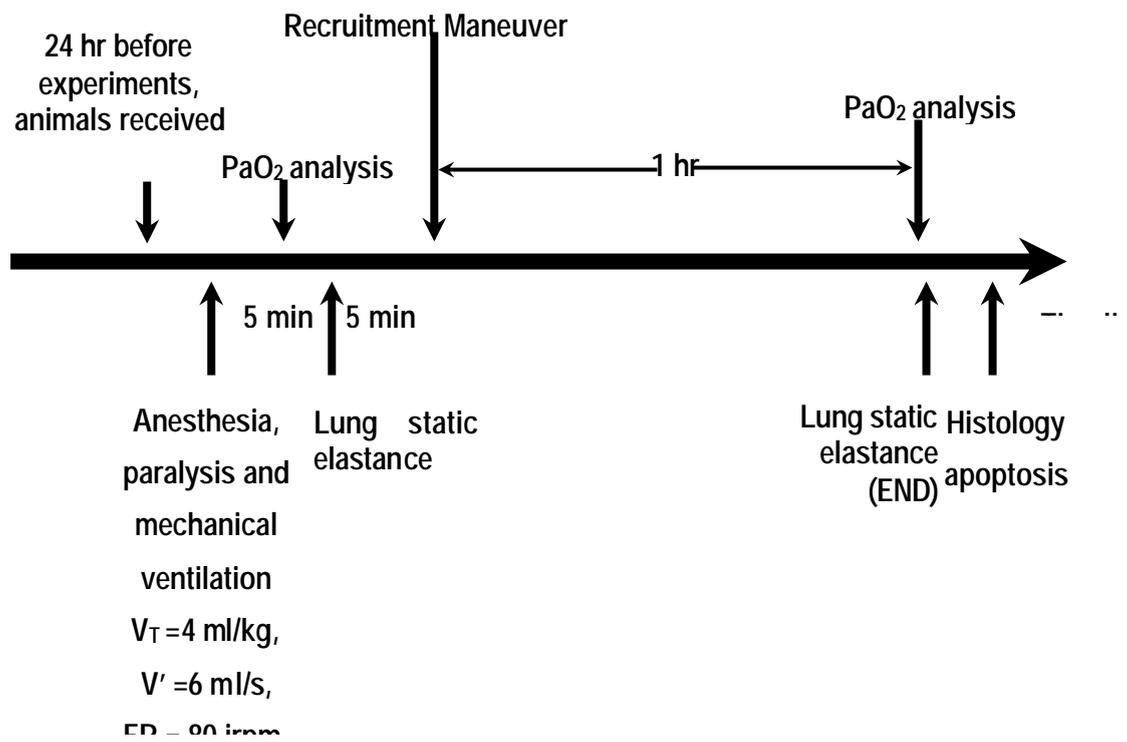
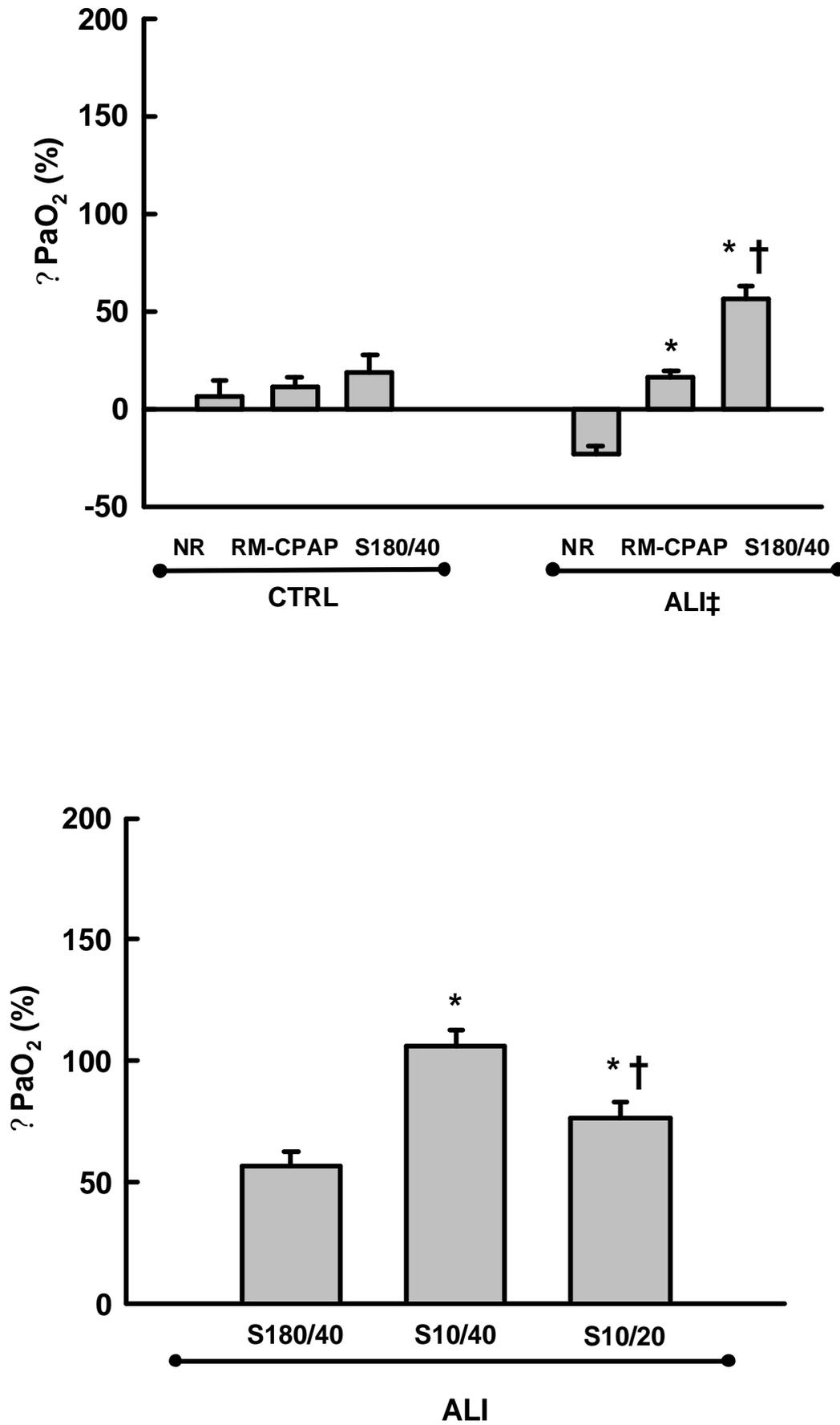


Figure 3



Figure

4.

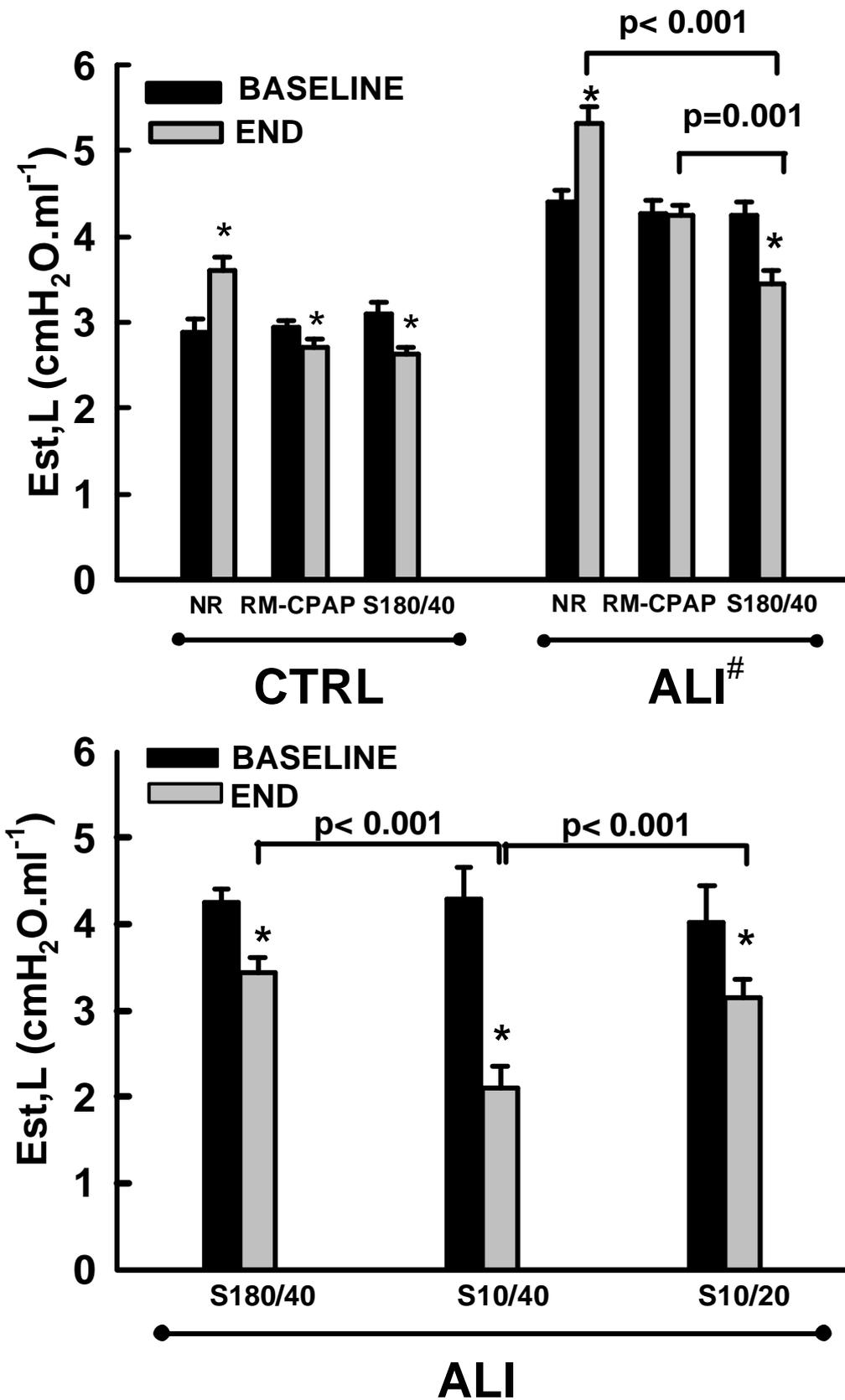


Figure 5

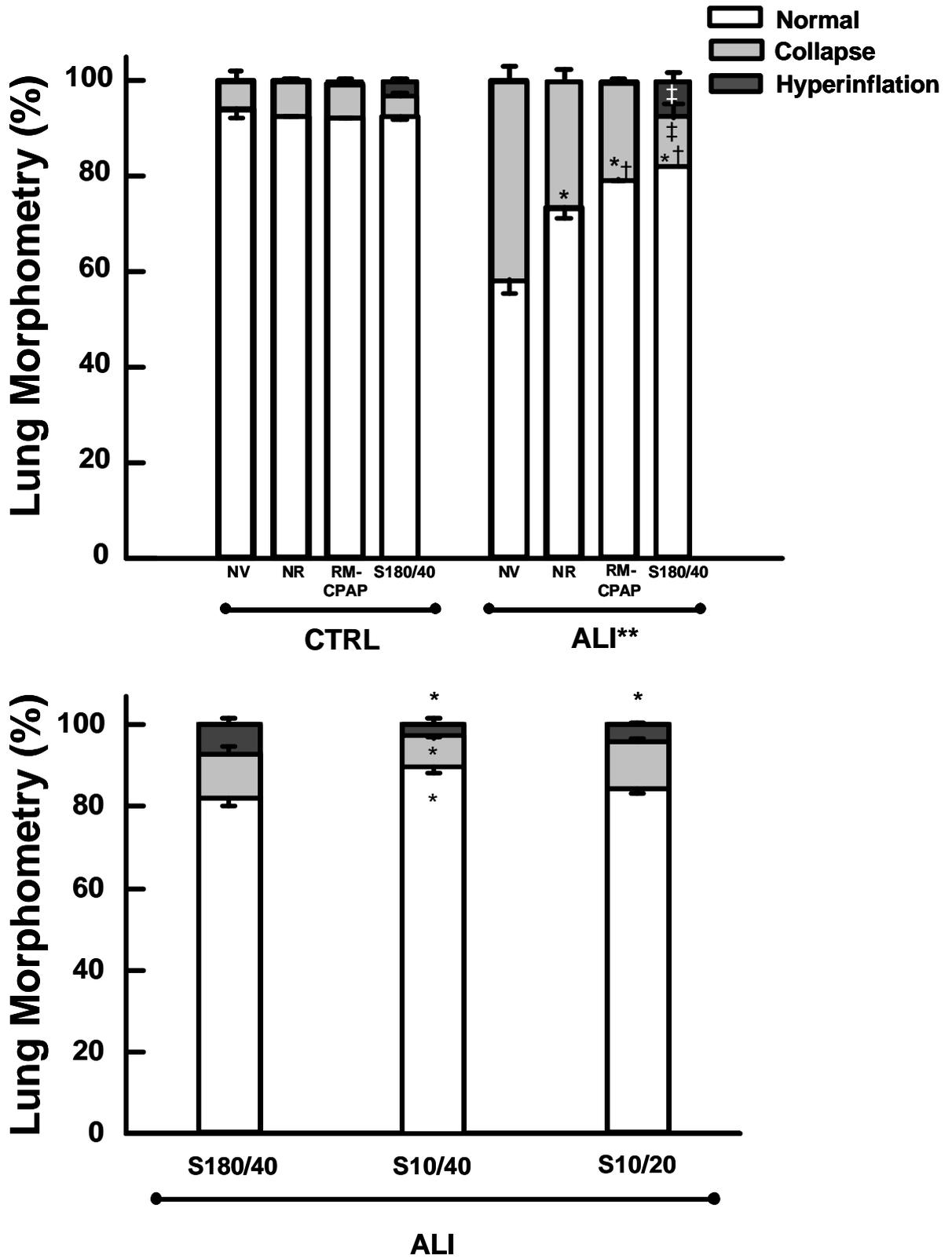
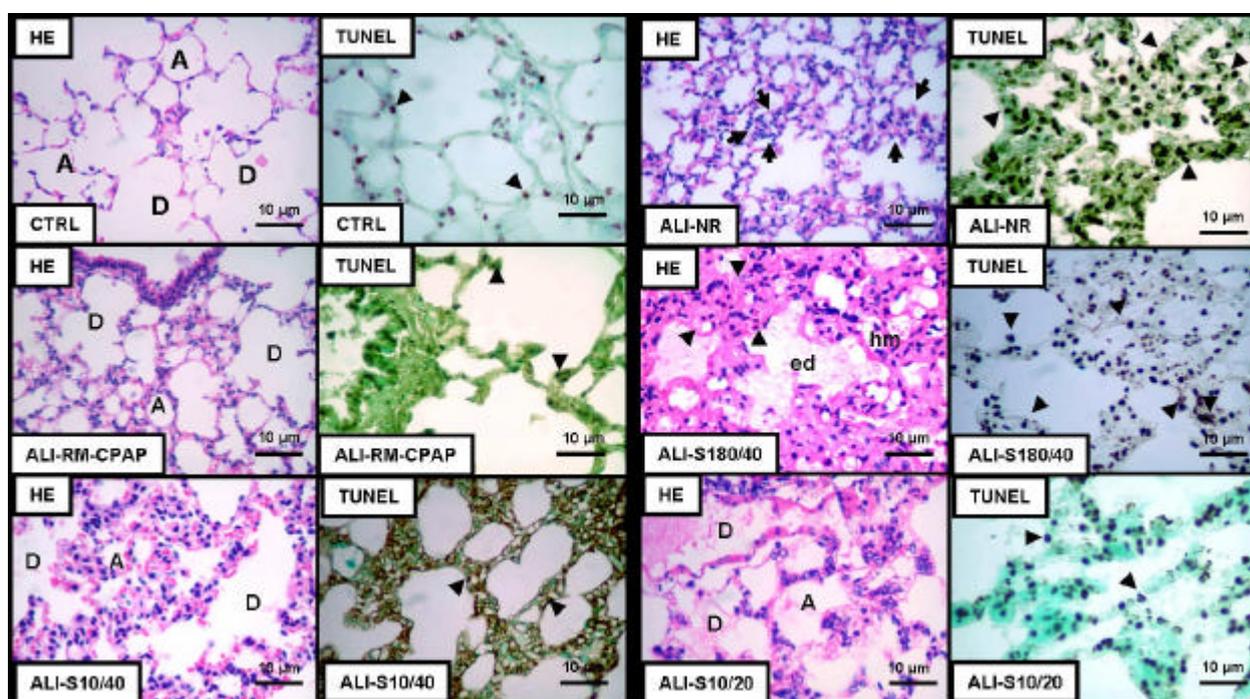


Figure 6

Lung



Kidney

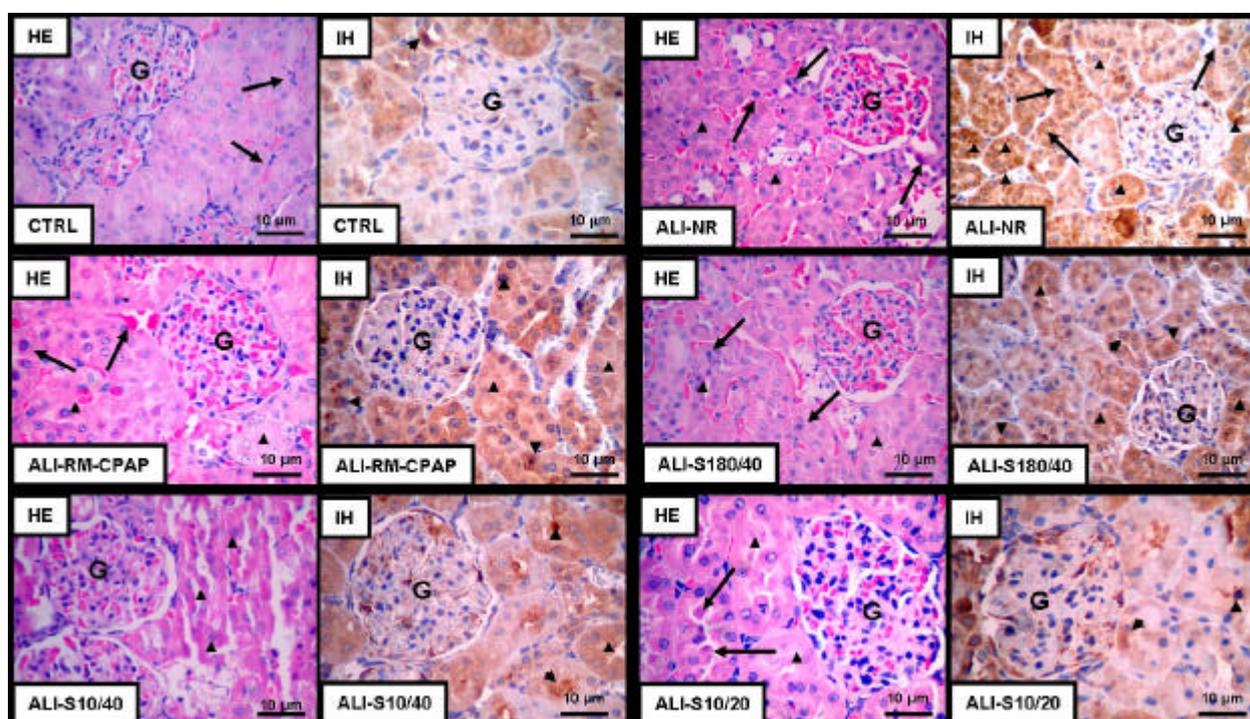
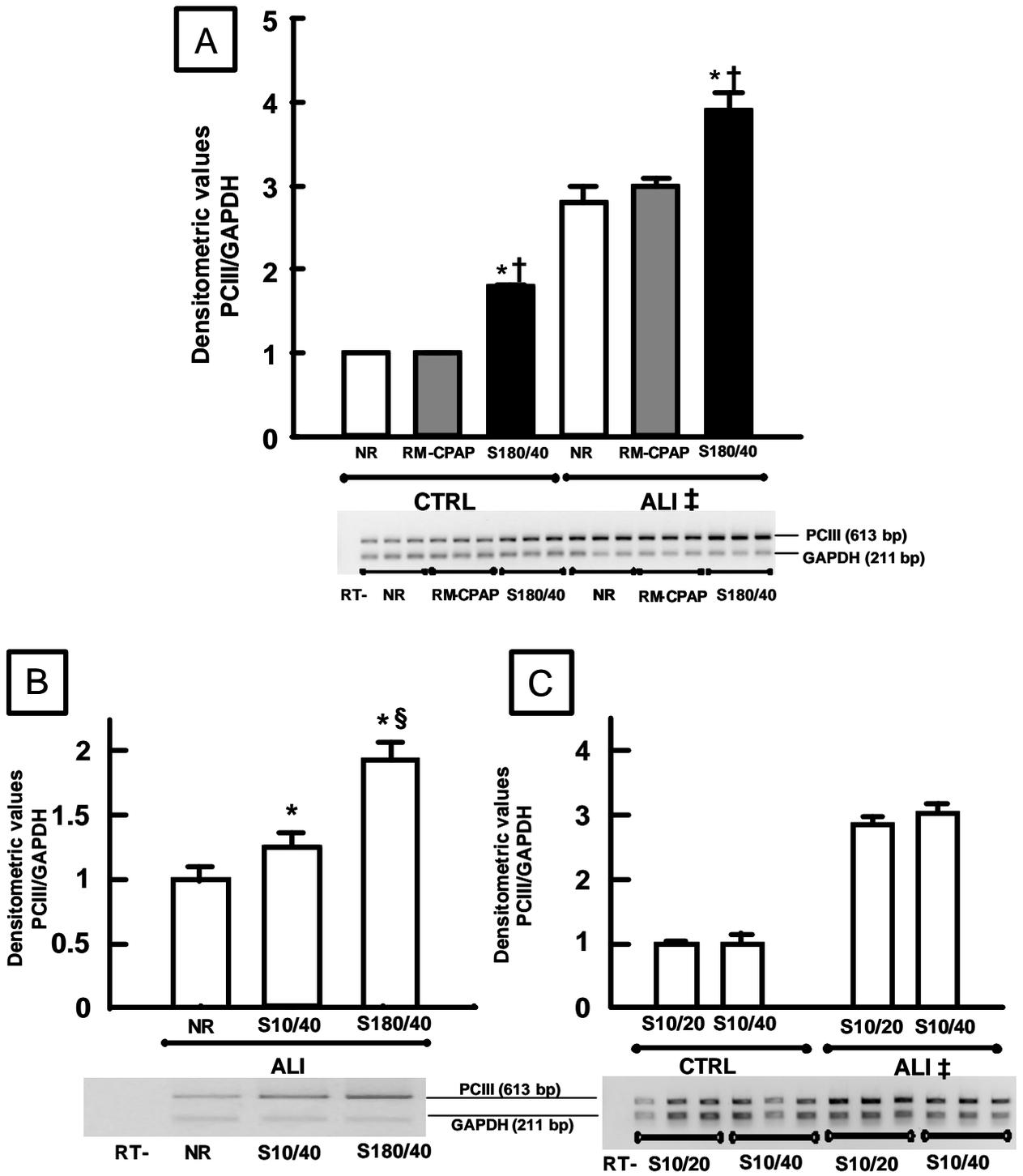


Figure 7



**EFFECTS OF FREQUENCY AND INSPIRATORY PLATEAU PRESSURE  
DURING SIGH IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY**

**ONLINE DATA SUPPLEMENT**

Paula W Steimback, Gisele P Oliveira, Andréia F Rzezinski, Pedro L Silva, Cristiane S NB  
Garcia, Graziela Rangel, Marcelo M Morales, José R Lapa e Silva, Vera L Capelozzi, Paolo  
Pelosi, Patricia RM Rocco

## METHODS

### *Animal Preparation and Experimental Protocol*

This study was approved by the Ethics Committee of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro. All animals received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences, USA.

Ninety-six Wistar rats (250-300 g) were randomly assigned into 2 main groups. In Control (C, n=48), sterile saline solution (0.9% NaCl, 1 mL) was intraperitoneally (ip) injected and in Acute Lung Injury (ALI, n=48), paraquat (15 mg/kg ip) was administered. Thirty-two rats of each initial group were used to analyze lung static elastance and post-recruitment histology and the remaining sixteen rats of each group were used to study non-ventilated histology.

Twenty-four hours after saline or paraquat administration, the animals were sedated (diazepam 1 mg ip), anesthetized (thiopental sodium 20 mg/kg ip), tracheotomized, paralyzed (pancuronium 2 mg/kg intravenously), and mechanically ventilated (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay) with the following parameters: tidal volume ( $V_T$ )=4 ml/kg, airflow=6 ml/sec, respiratory rate (RR)=100 breaths/min, inspiratory to expiratory ratio=1:2, fraction of inspired oxygen ( $FiO_2$ )=0.21, and PEEP=5 cmH<sub>2</sub>O. A polyethylene catheter (PE-10) was introduced into the femoral artery for blood sampling. Blood (300  $\mu$ L) was drawn into a heparinized syringe for arterial oxygen partial pressure ( $PaO_2$ ) (i-STAT, Abbott Laboratories, Illinois, USA). Lung mechanics were then obtained (Baseline) and animals were randomized as follows: 1) non-recruited (NR); 2) Recruitment maneuver with 40 cmH<sub>2</sub>O pressure inflations for 40-seconds (RM-CPAP), and 3)

Sigh. Sighs were applied during one hour with three different strategies: 1) three sighs per min with plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S180/40), 2) one sigh every six minutes with a plateau pressure of 40 cmH<sub>2</sub>O (S10/40), 3) one sigh every six minutes with a plateau pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O (S10/20). Additional Control and ALI groups were non-ventilated (NV) and prepared for lung histology. After 1-hr ventilation period, PaO<sub>2</sub> and lung static elastance were analyzed. At the end of the experiments, lungs and distal organs were prepared for histology and PCIII mRNA expression in lung tissue was measured.

### ***Mechanics***

Airflow, tracheal and esophageal pressures were measured <sup>E1</sup>. V<sub>T</sub> was calculated by digital integration of flow signal. Transpulmonary pressures were calculated by the difference between tracheal and esophageal pressures <sup>E1, E2</sup>. All signals were filtered (100 Hz), amplified in a 4-channel conditioner (SC-24, SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada), sampled at 200 Hz with a 12-bit analog-to-digital converter (DT2801A, Data Translation, Marlboro, MA, USA), and stored on a microcomputer. All data were collected using LABDAT software (RHT-InfoData, Montreal, Quebec, Canada).

Airways were occluded at end-inspiration for 5 seconds until a transpulmonary plateau pressure (Pplat,L) was reached. Est,L was calculated by dividing Pplat,L by the V<sub>T</sub> <sup>E3</sup>. Lung mechanical measurements were performed 10 times in each animal, and analyzed using ANADAT data analysis software (RHT-InfoData).

### ***Histology***

#### Light microscopy

A laparotomy was done immediately after the determination of lung mechanics (End) and heparin (1,000 IU) was intravenously injected in the vena cava. The trachea was clamped at end-expiration with PEEP of 5 cmH<sub>2</sub>O, and the abdominal

aorta and vena cava were sectioned, yielding a massive hemorrhage that quickly killed the animals. The lungs were then removed *en bloc* at the same PEEP in all groups to avoid distortion of lung morphometry. Lungs, liver, kidneys, and small intestine were removed, fixed in 3% buffered formaldehyde, and paraffin embedded. Four-? m-thick slices were cut and underwent hematoxylin-eosin staining.

Two investigators unaware of the origin of the material examined the samples microscopically. The slides were coded and examined only at the end of all measurements.

Lung morphometric analysis was performed with an integrating eyepiece with a coherent system consisting of a grid with 100 points and 50 lines (known length) coupled to a conventional light microscope (Olympus BX51, Olympus Latin America Inc., Brazil). The volume fraction of the lung occupied by collapsed alveoli (alveoli with rough or plicate walls) or normal pulmonary areas (those not presenting overdistended or plicate walls) were determined by the point-counting technique <sup>E4</sup> at a magnification of x200 across 10 random, non-coincident microscopic fields. Briefly, points falling on normal pulmonary areas or collapsed alveoli were counted and divided by the total number of points in each microscopic field <sup>E5</sup>.

#### Transmission Electron Microscopy

Three slices of 2x2x2 mm were cut from three different segments of the left lung and diaphragm. They were then fixed in 2.5% glutaraldehyde and phosphate buffer 0.1 M (pH = 7.4), post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded ethanol solutions and embedded in Epon-Araldite. Ultrathin sections were observed using a transmission electron microscope (JEOL 1010 Transmission Electron Microscope, Tokyo, Japan) after staining with uranyl acetate and lead citrate. For each electron microscopy image (15/animal) an injury score was determined. The following parameters were analyzed concerning lung parenchyma: a) alveolar

capillary membrane, b) epithelial cells lesion, and c) endothelial cell damage. The pathologic findings were graded according to a 5point semi-quantitative severity-based scoring system as: 0=normal lung parenchyma or diaphragm, 1=changes in 1 to 25%, 2=changes in 26 to 50%, 3=changes in 51 to 75%, and 4=changes in 76 to 100% of examined tissue <sup>E1</sup>.

### ***Apoptosis assay of lung and distal organs***

#### **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)**

TUNEL staining was used to assay cellular apoptosis on lung, kidney, liver, and small intestine villi in a blinded fashion by 2 pathologists. Apoptotic cells were detected using In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Boehringer, Mannheim, Germany). Formalin fixed and paraffin embedded lung tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was carried out by incubating tissue slides with protein kinase K (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) for 20 minutes at 15 µg/ml. TUNEL reaction mixture was applied for 1 hour at 37°C. For negative controls the transferase enzyme was omitted. The nuclei without DNA fragmentation stained blue as a result of counterstaining with hematoxylin. Positive controls consisted of rat prostatic gland after castration <sup>E6</sup>.

#### **Immunohistochemical staining for Fas and FasL**

The cellular localization of Fas and FasL proteins was studied by the streptavidin-biotin immunoperoxidase method using a polyclonal rabbit anti-FasL antibody (Chemicon/Millipore, Billerica, MA). Immunoreactivity was detected with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride. Specificity controls consisted of omission of primary antibody and/or preabsorption with blocking peptide, which abolished all immunoreactivity <sup>E7</sup>.

#### **Apoptosis Quantification**

Three sections from each specimen were examined. Sections were initially examined under light microscopy at low magnification (X100), allowing the evaluation of surface area occupied by apoptotic cells. Then, 10 fields per section from the regions with apoptotic cells were examined at a higher magnification (X400). A semiquantitative system was used to assess the degree of apoptosis. A 5-point semiquantitative severity-based scoring system was used. The apoptotic findings were graded as: 0 = normal lung parenchyma; 1 = 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75%; 4 = 76-100% of examined tissue.

### ***Semi-quantitative reverse-transcription and polymerase chain reaction***

Lung parenchyma strips (3x3x10 mm) were longitudinally cut from left lungs. Total RNA was isolated from the frozen lung tissue by Chomczynski and Sacchi's method <sup>E8</sup>. The relative expression of PCIII was obtained by semi-quantitative Reverse-Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). In the PCIII mRNA detection by RT-PCR, the rat glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) primers were used as internal positive control. The semi-quantitative method of RT-PCR was used to quantify the PCIII mRNA expression in the experimental rat lung. All reactions included a negative control RT(-). The identity of the amplification was confirmed by determination of the molecular size on agarose gel electrophoresis with a 100 bp DNA molecular marker (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

### ***Statistical Analysis***

SigmaStat 3.0 statistical software package (Jandel Corporation, San Raphael, CA, USA) was used. Differences among the groups were assessed by Two-way ANOVA followed by Tukey's test was used considering C and ALI and different RMs as the two factor for analysis. Nonparametric data were analyzed using Two-way

ANOVA on ranks followed by Dunn's post hoc test. A p value  $< 0.05$  was considered significant.

## References

- E1 Riva DR, Oliveira MB, Rzezinski AF, Rangel G, Capelozzi VL, Zin WA, Morales MM, Pelosi P, Rocco PR. Recruitment Maneuver in pulmonary and extrapulmonary experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 2008; 36:1900-1908.
- E2 Baydur A, Behrakis PK, Zin WA, Jaeger M, Milic-Emili J. A simple method for assessing the validity of the esophageal balloon technique. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:788-791.
- E3 Bates JHT, Rossi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant flow. *J Appl Physiol* 1985; 58:1840-1848
- E4 Weibel ER. Morphometry: Stereological theory and practical methods. In: *Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods*. Gil J Editor. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 199–247.
- E5 Rocco PR, Souza AB, Faffe DS, Pássaro CP, Santos FB, Negri EM, Lima JG, Contador RS, Capelozzi VL, Zin WA. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:677-684.
- E6 Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol* 2005; 98:1777-1783.
- E7 Baptista AL, Parra ER, Filho JV, Kairalla RA, de Carvalho CR, Capelozzi VL. Structural features of epithelial remodeling in usual interstitial pneumonia histologic pattern. *Lung* 2006; 184:239-244.
- E8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156–159.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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