

**Leandro Utino Taniguchi**

**Avaliação imunohistoquímica das alterações do  
citoesqueleto na parede alveolar em modelo  
experimental de lesão pulmonar induzida pela  
ventilação mecânica em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas  
Orientador: Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Taniguchi, Leandro Utino

Avaliação imunohistoquímica das alterações do citoesqueleto na parede alveolar em modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica em ratos / Leandro Utino Taniguchi. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Irineu Tadeu Velasco.

Descritores: 1.Respiração artificial 2.Citoesqueleto 3.Lesão pulmonar induzida por ventilador 4.Ratos 5.Quinase 1 de adesão focal 6.Paxilina

USP/FM/SBD-190/09

## **Agradecimentos**

Venho por meio desta agradecer a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão desta tese.

Agradeço a meus pais Sede e Ireny, que serviram de exemplo de esforço e dedicação, modelos de humanidade em quem me espelho.

Agradeço a minha esposa Keila, pelo carinho, amor e compreensão durante nossa vida juntos.

Agradeço a Elnara, que me orientou na realização, análise e conclusão desta tese.

Agradeço a todos dos diversos laboratórios que percorri, pelo auxílio na compreensão e realização das técnicas, análise dos dados e das imagens, interpretação das informações e, principalmente, pelo companheirismo e paciência.

Agradeço a todos das UTIs da disciplina de Emergências Clínicas pelo apoio e solidariedade no período de experimentos e realização deste manuscrito.

Agradeço a Deus...

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.2. VILI: da descoberta aos determinantes mecânicos.....	02
1.3. Do volutrauma ao biotrauma.....	03
1.4. Diferentes tensões atuam no parênquima pulmonar.....	04
1.5. O citoesqueleto e sua dinâmica na deformação da célula.....	05
1.6. Interação célula-matriz e mecanotransdução.....	07
1.7. O citoesqueleto: dos modelos <i>in vitro</i> para <i>in vivo</i> na VILI.....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Local.....	13
3.2. Animais utilizados.....	14
3.3. Comissão de Ética.....	14
3.4. Anestesia, traqueostomia e canulação arterial e venosa.....	14
3.5. Ventilação mecânica do animal e mecânica respiratória.....	15
3.6. Medidas de pressão arterial média e ressuscitação volêmica.....	17
3.7. Grupos de experimentação.....	17
3.8. Retirada e fixação dos pulmões.....	18
3.9. Preparo dos cortes histológicos e histomorfometria.....	19
3.10. Preparo das lâminas para microscopia confocal.....	21
3.11. Microscopia confocal a laser.....	22
3.12. Microscopia eletrônica.....	23
3.13. Realização de Western Blot.....	24
3.14. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Características gerais dos grupos.....	27

4.2. Dados de mecânica pulmonar.....	28
4.3. Análise histomorfométrica.....	30
4.4. Western Blot.....	33
4.5. Microscopia confocal.....	38
4.6. Microscopia eletrônica.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	53

## Lista de Abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AV</b>	Alto volume
<b>BV</b>	Baixo volume
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>Edin</b>	Elastância dinâmica
<b>FA</b>	“Focal adhesion”
<b>FAK</b>	“Focal adhesion kinase”
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança 95%
<b>MAPK</b>	“Mitogen-activated protein kinase”
<b>MIP-2</b>	“Macrophage-inflammatory protein-2”
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PEEP</b>	Pressão expiratória final positiva
<b>Res</b>	Resistência aérea
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SDRA</b>	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
<b>SF</b>	Soro fisiológico a 0,9%
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	“Tumor necrosis factor” alfa
<b>VILI</b>	“Ventilator-induced lung injury”
<b>V<sub>t</sub></b>	Volume corrente
<b>VM</b>	Ventilação mecânica



## Lista de Figuras

<b>Figura 01</b> - Esquema do respirador para pequenos animais.....	16
<b>Figura 02</b> - Pressão arterial média inicial entre os grupos.....	28
<b>Figura 03</b> - Elastância dinâmica dos grupos.....	30
<b>Figura 04</b> - Área de parênquima entre os grupos.....	31
<b>Figura 05</b> - Índice de infiltrado neutrofílico entre os grupos.....	32
<b>Figura 06</b> - IC 95% do índice de infiltrado neutrofílico entre os grupos.....	32
<b>Figura 07</b> - Índice de edema perivascular entre os grupos.....	33
<b>Figura 08</b> - Membrana de Western Blot para fosfo-FAK.....	34
<b>Figura 09</b> - Densidade óptica do Western Blot para fosfo-FAK.....	34
<b>Figura 10</b> - Membrana de Western Blot para fosfo-paxilina e paxilina total.....	35
<b>Figura 11</b> - Densidade óptica de Western Blot para fosfo-paxilina por paxilina total.....	35
<b>Figura 12</b> - IC 95% da densidade óptica (DO) do Western Blot para fosfo-paxilina por paxilina total.....	36
<b>Figura 13</b> - Western Blot para alfa-actina de músculo liso e alfa-tubulina para os grupos estudados.....	37
<b>Figura 14</b> - Densidade óptica (DO) do Western Blot para paxilina total, alfa-actina de m liso e alfa-tubulina para os grupos estudados.....	38
<b>Figura 15</b> - Microscopia confocal para paxilina total.....	39
<b>Figura 16</b> - Microscopia eletrônica de <i>zonula adherens</i> do grupo controle.....	40
<b>Figura 17</b> - Microscopia eletrônica de <i>zonula adherens</i> do grupo de Baixo Vt.....	41
<b>Figura 18</b> - Microscopia eletrônica de <i>zonula adherens</i> do grupo de Alto Vt.....	41
<b>Figura 19</b> - Microscopia eletrônica de região de lesão de membrana plasmática.....	42

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01</b> – Características gerais dos grupos.....	27
<b>Tabela 02</b> – Dados de resistência inicial e final dos grupos .....	29
<b>Tabela 03</b> – Dados de elastância dinâmica inicial e final dos grupos.....	29
<b>Tabela 04</b> – Dados de histomorfometria para os grupos estudados .....	31
<b>Tabela 05</b> – Dados do Western Blot para fosfo-FAK para os grupos estudados.....	33
<b>Tabela 06</b> – Dados do Western Blot para fosfo-paxilina/paxilina total nos grupos estudados.....	35
<b>Tabela 07</b> – Densidade óptica para paxilina total, alfa-actina de músculo liso e alfa-tubulina para os grupos estudados .....	37

## Resumo

Taniguchi LU. *Avaliação imunohistoquímica das alterações do citoesqueleto na parede alveolar em modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica em ratos* [tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 63p.

**INTRODUÇÃO:** A ventilação mecânica é uma terapia importante, mas com possíveis complicações. Uma das mais relevantes é a lesão pulmonar induzida pelo ventilador (VILI do inglês “Ventilator-induced lung injury”). Devido à hiperdistensão alveolar, o pulmão inicia um processo inflamatório, com infiltrado neutrofílico, formação de membrana hialina, fibrogênese e prejuízo de troca gasosa. Nesse processo, a mecanotransdução do estímulo da hiperdistensão celular se faz através do citoesqueleto da célula e de suas interações com a matriz extracelular e com as células vizinhas. Apesar desse papel fundamental no processo da VILI, não existem estudos *in vivo* sobre as alterações do citoesqueleto e de suas proteínas associadas durante esse processo patológico. O objetivo desse estudo foi descrever as alterações no citoesqueleto e em duas de suas principais proteínas associadas (FAK e paxilina) durante esse processo. **MÉTODOS:** Nesse estudo experimental foram feitos três grupos (n = 4 – 6): um controle e dois ventilados por quatro horas com PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O. Um grupo foi ventilado com volume corrente de 8 ml/kg (BV) e o outro com 24 ml/kg (AV). Dados de mecânica respiratória foram calculados no início e no final do período experimental. Os pulmões foram avaliados por histomorfometria quanto à área proporcional de parênquima, índice de infiltrado neutrofílico e índice de edema perivascular, quanto à quantidade de fosfo-FAK, fosfo-paxilina, paxilina total, actina músculo liso e alfa-tubulina por Western Blot, quanto à imunofluorescência para paxilina total com microscopia confocal a laser e com microscopia eletrônica de transmissão. **RESULTADOS:** os grupos foram

semelhantes nas características basais. Houve aumento da elastância dinâmica (Edin) no grupo BV e redução no grupo AV ( $\Delta$ Edin inicial e final:  $0,76 \pm 0,4$  vs  $-1,02 \pm 0,47$  respectivamente, em  $\text{cmH}_2\text{O/ml}$ ;  $p = 0,001$ ). Não houve diferença na área proporcional de parênquima ou índice de edema perivascular entre os grupos estudados. A ventilação mecânica induziu infiltrado neutrofílico pulmonar nos animais, tanto no grupo BV como no AV em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). O infiltrado foi mais importante no grupo AV que no BV ( $p = 0,003$ ). Houve um aumento de 40% na fosfo-FAK pelo Western Blot no grupo AV em relação ao controle ( $p=0,069$ ) e aumento significativo de fosfo-paxilina no grupo AV em relação ao controle ( $p<0,001$ ) e ao BV ( $p<0,001$ ). Não se observaram diferenças para paxilina total, actina músculo liso e alfa-tubulina. A microscopia confocal demonstrou marcação para paxilina total nos septos alveolares. A microscopia eletrônica sugeriu reorganização do citoesqueleto nas *zonula adherens* do grupo AV.

**CONCLUSÕES:** A ventilação mecânica promove lesão pulmonar com infiltrado neutrofílico numa relação dose-dependente. A ventilação com alto volume corrente promove fosforilação da FAK e de paxilina. As alterações no citoesqueleto em modelo *in vivo* de VILI são possíveis de serem descritas utilizando-se de métodos de microscopia confocal, Western Blot e microscopia eletrônica.

Descritores:

1. Respiração artificial
2. Citoesqueleto
3. Lesão pulmonar induzida por ventilador
4. Ratos
5. Quinase 1 da adesão focal
6. Paxilina

## Summary

Taniguchi LU. *Immunohistochemical evaluation of the cytoskeletal alterations in the alveolar wall in an experimental model of ventilator-induced lung injury in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 63p.

**INTRODUCTION:** Mechanical ventilation is an important therapy, but is associated with complications. One of the most relevant is ventilator-induced lung injury (VILI). Due to alveolar hyperdistension, the lung initiates an inflammatory process, with neutrophilic infiltration, hyaline membrane formation, fibrogenesis and gas exchange impairment. In this process, cellular mechanotransduction of the overstretching stimulus is mediated through the cytoskeleton and its cell-cell and cell-matrix interactions. But, although the cytoskeleton has this important role in the pathogenesis of VILI, there are no *in vivo* models for the research of cytoskeletal and cytoskeleton-associated proteins modifications during this pathological process. Our objective was to describe the immunohistochemical modifications during this process on the cytoskeleton and on two of its associated proteins (FAK and paxillin). **METHODS:** in this experimental study, three groups (n = 4 – 6) were studied: a control group and two ventilated for four hours with PEEP of 5 cmH<sub>2</sub>O. One group was ventilated with tidal volume of 8 mL/kg (LV) and the other with 24 mL/kg (HV). Data of respiratory mechanics were obtained at the beginning and the end of the experimental period. The lungs were evaluated with histomorphometry for parenchymal proportional area, neutrophilic infiltrate and perivascular edema, with Western Blot for phospho-FAK, phospho-paxillin, total paxillin, alpha-smooth muscle actin and alpha-tubulin, with confocal laser scanning microscopy for total paxillin, and with transmission electron microscopy. **RESULTS:** the groups were similar at the baseline. Dynamic elastance (Edin) increased in LV group and decreased in HV group ( $\Delta$ Edin initial to final:  $0.76 \pm 0.4$  vs.  $-1.02 \pm 0.47$  respectively, in cmH<sub>2</sub>O/ml; p = 0.001). There was no difference in the parenchymal

proportional area or the perivascular edema in the three groups. Mechanical ventilation induced pulmonary neutrophilic infiltration, both in the LV group and the HV group in comparison with control ( $p < 0.001$ ). The infiltrate was more important in the HV group than in the LV group ( $p = 0.003$ ). Phospho-FAK increased 40% in the HV group in Western Blot in comparison with control ( $p=0.069$ ). Phospho-paxillin increased significantly in HV group compared with control ( $p<0.001$ ) and with LV ( $p<0.001$ ). Total paxillin, alpha-smooth muscle actin and alpha-tubulin did not show any differences. Confocal microscopy showed total paxillin labeling at alveolar septa. Electron microscopy suggested cytoskeleton reorganization at the *zonula adherens* in the AV group. **CONCLUSIONS:** Mechanical ventilation induces pulmonary injury with neutrophilic infiltrate in a dose-dependent relationship. Ventilation with high tidal volume promotes FAK and paxillin phosphorylation. The alterations in cytoskeleton in an *in vivo* model of VILI are possible to be studied with confocal microscopy, Western Blot and electron microscopy.

Descriptors:

1. Respiration, artificial
2. Cytoskeleton
3. Ventilador induced lung injury
4. Rats
5. Focal adhesion kinase 1
6. Paxillin

## **1. Introdução**

A ventilação mecânica é uma terapia amplamente utilizada na Medicina Intensiva. Sua finalidade é fornecer suporte quando a ventilação espontânea não é capaz de sustentar a vida ou quando o controle da ventilação é imperativo para se prevenir o iminente colapso de determinadas funções orgânicas<sup>1</sup>. Apesar de ser uma terapia muitas vezes imprescindível e salvadora, seu emprego está relacionado a diversas complicações possíveis como aumento do risco de pneumonia, alterações hemodinâmicas, distúrbios neuromusculares e barotrauma<sup>2-5</sup>.

Demonstrou-se também que a ventilação é capaz de causar danos diretos ao pulmão, acarretando uma lesão pulmonar induzida pelo ventilador (em inglês “ventilator-induced lung injury” ou VILI)<sup>6-8</sup>. Vista inicialmente apenas como sinônimo de barotrauma, atualmente se sabe que a VILI apresenta alterações inespecíficas do ponto de vista fisiológico e morfológico no parênquima pulmonar. Alteração do balanço de fluidos no pulmão, aumento da permeabilidade endotelial e da epitelial e dano alveolar difuso foram descritos após ventilação em animais, acarretando um padrão muitas vezes semelhante ao encontrado em pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)<sup>9,10</sup>. Assim, a VILI pode não ser distinguida da maioria das patologias pulmonares que levam ao próprio uso da ventilação, além de poder contribuir para a piora do quadro inicial.

## **1.2. VIII: da descoberta aos determinantes mecânicos**

Webb e Tierney foram os primeiros autores a descrever as alterações pulmonares induzidas por ventilação mecânica com altos volumes correntes. Eles estudaram ratos ventilados com zero de pressão expiratória final positiva (PEEP) e pressões de pico inspiratório de 14, 30 ou 45 cmH<sub>2</sub>O. Animais controle não-ventilados e os submetidos a 14 cmH<sub>2</sub>O de pressão inspiratória não apresentaram alterações patológicas no pulmão. Os do grupo 30 cmH<sub>2</sub>O tiveram edema perivascular sem edema alveolar. Já no grupo de 40 cmH<sub>2</sub>O houve edema perivascular e alveolar, hipoxemia severa e redução da complacência dinâmica, com óbito em uma hora de experimento<sup>11</sup>.

Os estudos que se seguiram tiveram interesse nos fatores mecânicos desencadeantes dessa lesão, como pressão de pico respiratório e volume corrente<sup>12-15</sup>. Dreyfuss e colaboradores confirmaram os achados de Webb e Tierney e demonstraram que o volume corrente (Vt) era o determinante mais importante no estresse lesivo ao alvéolo e à membrana alvéolo-capilar (o que originou o termo “Volutrauma”)<sup>16,17</sup>. Em um estudo importante, eles compararam ratos ventilados com altos Vt e pressão negativa (através de um ventilador de pressão negativa “iron lung”) com animais ventilados com altas pressões e baixos Vt (com restrição toracoabdominal por enfaixamento). Somente houve edema extravascular pulmonar e aumento da permeabilidade microvascular nos animais com altos Vt. A conclusão do estudo foi que o aumento do Vt foi o responsável pelo edema induzido pela ventilação<sup>16</sup>.



Com base nesses dados, estudos clínicos com estratégias de ventilação protetora foram desenvolvidos com a finalidade de minimizar a lesão pulmonar pela VILI através da redução do Vt. Seu impacto clínico é evidente: redução da morbidade e de 22% da mortalidade em pacientes com SDRA<sup>18,19</sup>.

### **1.3. Do volutrauma ao biotrauma**

Conforme a estratégia ventilatória, o estresse mecânico pode alterar os processos celulares no pulmão<sup>20</sup>. Tremblay e colaboradores foram um dos primeiros a demonstrar em modelo de pulmão isolado de rato que estratégias lesivas com altos volumes correntes induzem a produção de citocinas (TNF $\alpha$ ) e c-fos RNAm<sup>21</sup>. Outros estudos em modelos de culturas de células submetidas a estiramento cíclico também demonstram resposta inflamatória no epitélio<sup>22</sup> e no endotélio<sup>23</sup> quando submetidos à distensão equivalente a mais de 80% da capacidade pulmonar total. Tal produção de citocinas, além de ser evolutiva temporalmente<sup>24</sup>, é potencializada pela concomitância de outra lesão como endotoxinas sistêmicas ou hiperóxia<sup>25,26</sup>.

Com a indução de uma resposta proinflamatória no epitélio pulmonar associada a uma alteração na permeabilidade no endotélio local<sup>17,27</sup>, alguns autores sugerem que poderia haver uma descompartmentalização da inflamação, passando agora para nível sistêmico. Isso desencadearia uma resposta inflamatória à distância, favorecendo a disfunção de múltiplos órgãos, fenômeno esse denominado “Biotrauma”<sup>28-30</sup>.

Em um importante estudo, Imai e colaboradores demonstraram em um modelo experimental que a ventilação mecânica lesiva desencadeia apoptose de

células epiteliais em rim e intestino delgado, mecanismo este parcialmente relacionado à produção de Fas ligante<sup>31</sup>. Também sugeriam que parte da disfunção orgânica que os pacientes apresentam durante o período crítico pode ser desencadeada pela indução de apoptose à distância pela ventilação.

A avaliação dos dados de interleucina-6 (uma citocina pró-inflamatória) no trabalho do ARDSnet corroboram essa idéia. No grupo com SDRA ventilado com Vt baixo houve menores valores de interleucina-6 do que no grupo com Vt habitual, o que sugere uma menor resposta inflamatória decorrente da estratégia ventilatória utilizada<sup>19</sup>.

Entretanto, a teoria do biotrauma apresenta controvérsias quanto à consistência da produção e a importância relativa das citocinas pulmonares<sup>32</sup>. Tal discussão, algumas vezes um tanto quanto acirrada, ainda permanece na literatura<sup>33,34</sup>.

#### **1.4. Diferentes tensões atuam no parênquima pulmonar**

Há vários anos sabe-se que a distribuição das forças de estresse e de distensão sobre o parênquima pulmonar não são uniformes<sup>35</sup>. Em modelos de micromecânica do parênquima, as fibras elásticas e de colágeno, na sua disposição helicoidal no interstício, são as principais estruturas de suporte e resistência ao estresse<sup>36-38</sup>. O septo alveolar, por sua vez, está submetido a diferentes tipos de forças e tensões: as células endoteliais são submetidas à pressão transcapilar e às forças laminares do fluxo sanguíneo, enquanto que as células epiteliais das vias aéreas e dos alvéolos sofrem estiramento e compressão cíclicos do movimento respiratório e da tensão

superficial da interface ar-líquido. Tais forças se tornam ainda mais importantes na vigência de heterogeneidade do parênquima<sup>39</sup>.

Apesar de não contribuírem para a elastância pulmonar, as células pulmonares precisam se adaptar constantemente às mudanças frequentes da tensão do tecido onde se situam. Tanto o epitélio como o endotélio estão sujeitos a diversas forças durante a respiração, resultado dos efeitos interdependentes do volume pulmonar, pressão transpulmonar, tensão superficial e transcapilar na membrana alvéolo-capilar<sup>40,41</sup>. Tais forças, em nível celular, são transmitidas e suportadas pelo citoesqueleto da célula.

### **1.5. O citoesqueleto e sua dinâmica na deformação da célula**

O citoesqueleto celular é constituído de uma rede interconectada de biopolímeros que se associam para formar três tipos de filamentos: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os microfilamentos de actina. Os microtúbulos são polímeros de tubulina, que se organizam a partir da região perinuclear em direção à periferia, condicionando a forma celular e direcionando o transporte intracelular. Os filamentos intermediários se conectam ao envoltório nuclear, às junções periféricas (como os desmossomos) e a outros elementos do citoesqueleto, conferindo resistência à estrutura; são formados por diversas proteínas segundo o tipo celular: nas células musculares são de desmina, nas células epiteliais são de citoqueratina e nas células mesenquimais são de vimentina. Já os microfilamentos de actina determinam a forma da membrana plasmática e participam da geração de forças

contráteis; conectam-se às proteínas das junções de oclusão e de adesão, estabilizando a célula em relação às forças atuantes na membrana<sup>42</sup>.

Como um sistema dinâmico e adaptável, o citoesqueleto é descrito como “trilhas de formigas”: uma mesma trilha pode persistir por horas se necessário, mas cada elemento individual da trilha está em constante atividade. Em caso de uma nova situação, a trilha pode se rearranjar rapidamente devido à sua característica dinâmica<sup>42</sup>. Seguindo essa metáfora, o citoesqueleto está em constante rearranjo para adaptar a célula às diferentes tensões do meio.

Uma vez que as células e seus citoesqueletos são sistemas integrados e em rede, cada elemento isolado não pode ser considerado para a resistência à deformação. Segundo um modelo biomecânico de tensegridade, as células são estruturas pré-estressadas, constituídas de um sistema em rede (o citoesqueleto) composta de microfilamentos de actina sujeitos à tensão acoplados aos microtúbulos resistentes à compressão. Esse modelo é estável, resistente e permite que a célula responda prontamente a estímulos físicos externos<sup>43</sup>.

Porém, como estruturas dinâmicas, as células devem se remodelar ativamente para se adaptarem às diferentes tensões presentes no pulmão durante a respiração. Para tanto, seu citoesqueleto, como estrutura celular responsável por suportar tais deformações e as tensões resultantes, deve ser capaz de se degradar e reorganizar, conferindo plasticidade ao sistema. Descrito como tendo um comportamento amorfo dinâmico semelhante ao vidro<sup>44</sup>, o citoesqueleto está longe da estrutura rígida e estática descrita no passado. Ele é capaz de se reestruturar rapidamente, adaptando-se a diferentes tensões e situações, modificando inclusive a viscosidade da célula para melhor adaptá-la ao meio<sup>45,46</sup>.

## **1.6. Interação célula-matriz e mecanotransdução**

As células do epitélio pulmonar alveolar situam-se sobre uma matriz extracelular especializada chamada lâmina basal. Além de se conectarem a essa matriz, elas estão conectadas umas às outras através de junções especializadas da membrana plasmática, responsáveis por suportar grandes frações do estresse de distensão. Para tanto, os filamentos do citoesqueleto se inserem nessas regiões. Essas junções celulares especializadas são chamadas junções de ancoragem, encarregadas de acoplar mecanicamente as células (e seus citoesqueletos) às vizinhas ou à matriz extracelular<sup>47</sup>.

As integrinas são proteínas transmembranas que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto da célula; fazem parte da estrutura das regiões, placas e complexos de adesão focal. Acredita-se que as forças aplicadas ao pulmão são transmitidas do interstício para a célula através da tensão sobre as integrinas, que as repassa para o citoesqueleto. Sendo assim, essas estruturas seriam responsáveis pela monitorização da tensão do meio externo sobre a célula, desempenhando papel importante no comportamento celular<sup>48,49</sup>.

Porém, os mecanismos pelos quais os sinais mecânicos, transmitidos ao citoesqueleto e às integrinas, são transduzidos para um sinal bioquímico ainda não são bem compreendidos. Já se observou que as integrinas geram segundos mensageiros intracelulares nas junções de ancoragem pela sua associação com outras proteínas como paxilina, talina, vinculina, e algumas quinases como a “focal adhesion kinase” (FAK) e outras enzimas (Proteína-quinase A, Proteína-quinase C, Fosfolipase C, “Mitogen-activated Protein Kinase” – MAPK, Rho-GTPase, tirosina

quinases como c-Src entre outras)<sup>50-52</sup>. Fora esse mecanismo, novos estudos sugerem que o citoesqueleto pode transmitir as tensões diretamente a organelas internas, como as mitocôndrias. Através dessa transmissão, alterações na tensão extracelular geram sinais intracelulares por meio de mecanismos dependentes de radicais livres<sup>53,54</sup>.

Uma parte importante da mecanotransdução está situada em uma região celular de interesse denominada de adesão focal (FA, do inglês “*Focal Adhesion*”). Esses sítios na membrana plasmática são estruturas responsáveis pela adesão da célula à matriz extracelular através das integrinas<sup>47</sup>. Nesses sítios, os feixes de microfilamentos de actina do citoesqueleto se ancoram à face citoplasmática das integrinas através de um complexo multi-molecular de proteínas juncionais. Alguns dos constituintes das FA participam da ligação estrutural entre as integrinas e o citoesqueleto de actina, enquanto outras são moléculas de sinalização<sup>48,49</sup>. Entre as moléculas de sinalização mais importante está a FAK<sup>55</sup>. Sendo uma tirosina quinase de 125 kDa, ela foi inicialmente identificada nas FA. Posteriormente se evidenciou que a partir da ligação das integrinas à matriz extracelular, a FAK passa por uma seqüência coordenada de eventos: é autofosforilada em resíduos de tirosina (especialmente Y397)<sup>56</sup>, associa-se a outras tirosinas quinases da família Src (como pp60<sup>src</sup>), realiza a fosforilação de outras proteínas associadas às FA como p130Cas e paxilina<sup>57</sup>, e se liga a outras proteínas SH2 como Grb2 (de forma a ativar outras vias sinalizadoras como Ras e MAPK)<sup>49</sup>. Sendo assim, a colocalização da FAK na FA e sua fosforilação são eventos importantes no início do mecanismo de mecanotransdução e na formação de novas FA.

Alguns estudos procuraram avaliar as alterações dessa quinase nos processos relacionados à hiperdistensão pulmonar. Bhattacharya e colaboradores estudaram

células endoteliais retiradas de um modelo de pulmão isolado. Nesse estudo, Vt elevado induziu uma resposta pró-inflamatória no endotélio a fim de facilitar a adesão leucocitária pelo aumento de P-selectina, além de aumentar a fosforilação da FAK<sup>23</sup>. Porém, Desai e colaboradores demonstraram dados diferentes quando estudaram pneumócitos II isolados de pulmões submetidos a alto Vt e hiperóxia<sup>58</sup>. Eles verificaram que houve uma redução na fosforilação da FAK nessas células, em comparação com as isoladas de ratos controle ou somente submetidas a Vt elevado sem hiperóxia. Como consequência dessa menor fosforilação da FAK, as células apresentavam menor capacidade de adesão, demonstrando a importância dessa quinase na adesão celular à matriz extracelular<sup>58</sup>. Dessa forma, os diferentes tipos celulares do pulmão podem apresentar respostas distintas ao mesmo estímulo.

Outra proteína importante e muito estudada das FA é a paxilina. Essa proteína de 68 kDa apresenta uma estrutura sem sítios catalíticos, mas rica em regiões de ligação (sítios LD e LIM). Isso sugere uma função estrutural e de ancoragem para ligação com outras proteínas. De fato, a paxilina se localiza em FA já estabelecidas, ligando-se a outras proteínas estruturais como vinculina e actopaxina, e/ou servindo de estrutura de ancoragem para enzimas como FAK<sup>59</sup>. A partir de sua fosforilação, ela está relacionada à estabilização e reciclagem das FA durante a migração e adesão das células à matriz<sup>60,61</sup>. De fato, acredita-se que sua maior ou menor ativação (via fosforilação) relaciona-se com a maior ou menor necessidade da célula em migrar para locomoção ou reparação<sup>59</sup>.

Quanto aos estudos da paxilina com VILI, temos achados semelhantes aos encontrados para FAK (nada surpreendente, uma vez que a ativação da FAK promove a fosforilação da paxilina). Os estudos de Bhattacharya e colaboradores<sup>23</sup>

com endotélio e o de Desai e colaboradores<sup>58</sup> com pneumócito II também demonstraram achados diferentes para fosforilação da paxilina com VILI de forma parecida com os achados para FAK. Observando o comportamento da paxilina e o potencial metastático em diversos tumores, vemos também que o maior comportamento invasivo e disseminativo das células neoplásicas se correlaciona com ativação da paxilina em alguns tipos (como carcinoma renal e de próstata), mas não em outros (como de pulmão)<sup>59</sup>. Sendo assim, a importância dessa proteína é variável em se considerando o tecido em questão.

Em resumo, a hiperdistensão do parênquima pulmonar na VILI parece ser transmitida do tecido extracelular para o interior das células através da conexão matriz extracelular–integrinas–citoesqueleto. Nesse mecanismo, algumas proteínas associadas às FA são importantes, especialmente a FAK e a paxilina.

### **1.7. O citoesqueleto: dos modelos *in vitro* para *in vivo* na VILI**

Como descrito anteriormente, o citoesqueleto e as suas estruturas associadas assumem papel crucial na fisiopatologia da VILI. Os estudos nessa área estão progredindo para melhor compreensão de como a mecanotransdução se faz e como o citoesqueleto responde à distensão pulmonar excessiva.

Porém, esses estudos são basicamente em modelos de culturas de células<sup>52</sup>. Apesar desse modelo reducionista permitir isolar cada um dos componentes nessa resposta complexa, perdem-se as múltiplas interações entre os diversos tipos celulares que compõem o pulmão. Fora isso, os modelos de cultura submetidos à distensão cíclica são essencialmente bidimensionais, sendo que o alvéolo de insufla



em três dimensões. Finalmente, quando se observa a resposta pró-inflamatória das células em modelos *in vitro*, não se sabe o impacto *in vivo*, especialmente quanto à interação com respostas anti-inflamatórias como interleucina-10, receptor solúvel de TNF- $\alpha$  ou receptor solúvel de interleucina-1.

Soma-se a isso o fato que não existe ainda uma descrição em modelo *in vivo* das alterações do citoesqueleto na VILI, nem de suas proteínas associadas (FAK e paxilina). Percebe-se então a necessidade de estudos nessa área com modelos mais integrados, que possam mimetizar mais de perto as modificações que ocorrem nas células pulmonares dos pacientes sob ventilação mecânica, uma vez que elas estão constantemente submetidas a estímulos pró-inflamatórios e pró-apoptóticos, além do estresse mecânico, que influenciam sua estrutura e função.

## **2. Objetivo**

Descrever as alterações imunohistoquímicas que ocorrem com o citoesqueleto e com duas de suas principais proteínas associadas (FAK e paxilina) em um modelo experimental de VILI.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Local**

Os animais foram ventilados no Laboratório de Investigação Médica (LIM-20) da Disciplina de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As lâminas foram preparadas e analisadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM-59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A realização das técnicas de imunofluorescência nas lâminas obtidas foi feita no Setor de imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os Western Blots foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A microscopia confocal a laser foi realizada no núcleo de microscopia confocal/fluorescência da Rede Multiusuários do Sistema FMUSP/HC localizada no INCOR (Projeto Multiusuário FAPESP nº 04/08908-2).

A microscopia eletrônica foi realizada no núcleo de microscopia eletrônica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.2. Animais utilizados**

Foram usados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos machos, com peso entre 300 a 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.3. Comissão de Ética**

O projeto de pesquisa utilizado para a realização dessa tese de doutorado foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em sessão em 09/03/2005 com protocolo nº 089/05.

### **3.4. Anestesia, traqueostomia e canulação arterial e venosa**

Anestesia e bloqueio neuromuscular: os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com tiopental 50 mg/kg de peso. A injeção foi feita de maneira rápida e indolor a fim de minimizar o estresse. Imediatamente após o início da ventilação mecânica, foi administrado por via endovenosa brometo de pancurônio na dose de 0,04 mg em bôlus. A anestesia foi suplementada com 5 mg de tiopental intraperitoneal assim como nova dose de 0,04 mg de pancurônio endovenosa se o animal apresentasse movimentos respiratórios espontâneos durante a ventilação mecânica.

Traqueostomia: após tricotomia adequada, o animal foi colocado em supina. A pele foi aberta com incisão longitudinal sobre a traquéia. Após seu isolamento, foi inserido um cateter tipo jelcro (BD Ind. Cirúrgica<sup>®</sup>) nº 14. A traquéia foi amarrada ao cateter cuidadosamente para se evitar quaisquer vazamentos. A simetria da ventilação foi verificada logo após.

Canulação da artéria e veia femorais: após a traqueostomia, os animais foram submetidos à dissecação da artéria e veia femorais direitas e cateterização com cânulas para implantação em vasos femorais de tubos de Tygon (Crichtey, Austrália). O cateter arterial foi imediatamente conectado a uma coluna de mercúrio para medida da pressão arterial média (PAM). O cateter venoso foi utilizado para administração de drogas endovenosas e infusão de volume na forma de soro fisiológico a 0,9% (Baxter<sup>®</sup>).

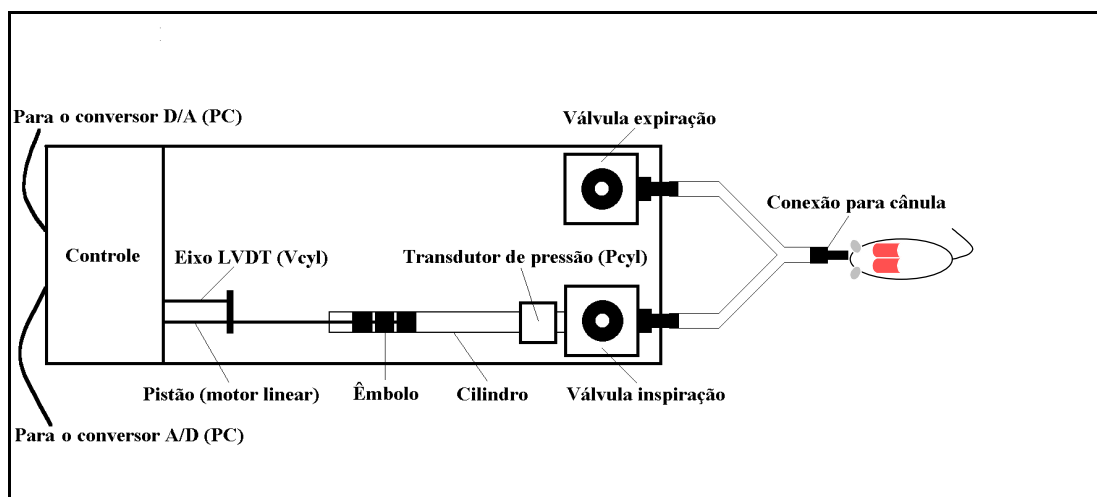
### **3.5. Ventilação mecânica do animal e mecânica respiratória**

Suplementação de oxigênio: Todo o período de ventilação mecânica foi realizado com fração inspirada de oxigênio a 40% (fornecido através de misturador de gases Blender Intermed<sup>®</sup>, São Paulo – Brasil).

Ventilação mecânica: os animais foram ventilados por quatro horas em ventilador para roedores (Harvard Rodent model 683, Califórnia – Estados Unidos). O volume corrente ( $V_t$ ) foi calibrado antes de cada experimento segundo o grupo sorteado. A frequência respiratória foi mantida em 75 incursões por minuto. Uma

pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH<sub>2</sub>O foi colocada na via expiratória do ventilador através de coluna de água durante todo o experimento.

Cálculo da mecânica respiratória: os dados de mecânica respiratória foram obtidos no início do período experimental de ventilação mecânica e ao final deste. Os dados foram obtidos através de um respirador para pequenos animais (FlexiVent – SCIREQ<sup>®</sup>, Montreal – Canadá). Um diagrama esquemático do respirador mecânico utilizado é apresentado na Figura 01.



**Figura 01:** Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-SCIREQ<sup>®</sup>), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória. Figura gentilmente cedida por Fernanda Degobbi Tenório Qurino dos Santos Lopes, pós-graduanda do LIM-20.

O cálculo da resistência (Res) e de elastância dinâmica (Edin) foi feito pelo ajuste à equação do movimento adaptada para o sistema respiratório, utilizando-se da técnica dos mínimos quadrados. A equação utilizada para avaliação do movimento respiratório foi:

$$P_{\text{proximal}} = (E_{\text{din}} \times V_t) + (Res \times V^0) \text{ (no domínio do tempo)}$$

Onde  $V_t$  = volume corrente e  $V^0$  é fluxo respiratório

Utilizou-se da função “Snapshot” do ventilador Flexivent para realização do cálculo da mecânica respiratória, com amostragem em 128 Hz:

- Vt de 10 ml/kg de peso
- Freqüência de 1,5 Hz
- Duração de 2 segundos
- “Onset delay” de 2 segundos
- PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O

### **3.6. Medidas de pressão arterial média e ressuscitação volêmica**

A PAM dos animais foi registrada no início da ventilação mecânica e durante o período do experimento de 30 em 30 minutos.

Logo após a canulação venosa, todos os animais receberam 1 ml de soro fisiológico (SF).

Procurou-se manter a PAM acima de 70 mmHg. Caso ela ficasse abaixo disso, o animal foi expandido com 1 ml de SF.

### **3.7. Grupos de experimentação**

Os animais foram aleatoriamente alocados em três grupos:

- 1. Grupo controle:** o animal foi sedado, instrumentado e colocado no ventilador para medida de mecânica respiratória. Logo em seguida foi sacrificado. O tempo total de ventilação mecânica não ultrapassava 5

minutos. Nesse período, o animal era ventilado com parâmetros semelhantes ao grupo baixo volume.

2. **Grupo baixo volume (BV):** os animais foram ventilados por quatro horas consecutivas com 8 ml/kg de peso de volume corrente.
3. **Grupo alto volume (AV):** os animais foram ventilados por quatro horas consecutivas com 24 ml/kg de peso de volume corrente.

Todos os animais foram ventilados com frequência respiratória de 75 incursões por minuto, com fração de oxigênio de 40%.

### **3.8. Retirada e fixação dos pulmões**

Após quatro horas de ventilação mecânica e medida da mecânica respiratória final, os animais receberam 200 UI de heparina endovenosa. Em seguida, coletava-se 10 ml de sangue arterial, que foi imediatamente colocado em tubos heparinizados e resfriado em gelo para posterior centrifugação e armazenamento de plasma congelado.

O tórax dos animais foi aberto, o ventrículo direito puncionado com scalp Butterfly nº 21 e o átrio esquerdo rompido. Os pulmões foram então perfundidos com 100 ml de SF com uma pressão de perfusão de 30 mmHg. A traquéia foi ligada durante insuflação pulmonar com fio algodão 2-0.

O hilo pulmonar esquerdo foi ligado com algodão 2-0. O pulmão esquerdo foi então retirado para coleta de amostras para microscopia eletrônica a partir da porção anterior do lobo superior. O restante foi imediatamente transferido para frascos eppendorf e congelado em nitrogênio líquido para posterior armazenamento a -70°C.



O material colhido para eletrônica foi imediatamente imerso em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato de sódio 0,1mol/l de pH 7,2 durante 2 horas na geladeira, para conservação apropriada. A seguir o material foi lavado em solução de lavagem (0,6% de cloreto de sódio contendo 7,2% de sacarose).

O pulmão direito foi perfundido com 100 ml de formol a 10% com uma pressão de perfusão de 30 mmHg. Em seguida, foi submerso por 24 horas em formol 10% para fixação completa.

### **3.9. Preparo dos cortes histológicos e histomorfometria**

Preparo das lâminas: após 24 horas em formol, o pulmão direito foi retirado e incluído em parafina segundo técnicas habituais padronizadas pelo LIM-59<sup>62</sup>. Foram preparadas lâminas de 5 µm de espessura e coradas por Hematoxilina e Eosina. Os cortes histológicos foram feitos no eixo sagital do pulmão direito em sua linha média, de forma que cada corte continha todos os lobos simultaneamente a fim de representar a maior área pulmonar. A análise das lâminas foi feita de forma cega ao grupo a que cada animal pertencia.

Estudo histomorfométrico: foram estudados três parâmetros de histomorfometria:

- Índice de infiltrado neutrofílico
- Área proporcional de parênquima
- Índice de edema perivascular

Para tal estudo, utilizamos de técnicas convencionais, com microscópio óptico acoplado a um retículo quadrangular<sup>63</sup>. Para o índice de infiltrado neutrofílico e para a área proporcional de parênquima, foi utilizado um retículo com 225 pontos – 15x15 pontos – abrangendo uma área de 72 900  $\mu\text{m}^2$ . Para o índice de edema perivascular, foi utilizado um retículo contendo 100 pontos e 50 retas, medindo cada reta 25  $\mu\text{m}$  no aumento de 400x.

Índice de infiltrado neutrofílico: foram analisados dez campos aleatórios de parênquima pulmonar por lâmina, no aumento de 400x. Foi contado o número de neutrófilos presentes no septo alveolar e o número de interceptos dos pontos do retículo sobre os septos naquele mesmo campo. O índice de infiltrado neutrofílico de cada campo foi obtido dividindo-se o número de neutrófilos pelo número de interceptos alveolares.

**Índice de infiltrado neutrofílico =  $\frac{\text{número de Polimorfonucleares}}{\text{Número de interceptos alveolares}}$**

Área proporcional de parênquima: foram analisados dez campos aleatórios de parênquima pulmonar por lâmina, no aumento de 400x. Foi contado o número de interceptos dos pontos do retículo sobre o parênquima pulmonar. A área proporcional de parênquima de cada campo foi calculada sabendo-se que 225 pontos representavam a área total do retículo. Os valores foram expressos em porcentagem.

**Área de parênquima(%) =  $\frac{\text{número de interceptos alveolares}}{225} \times 100$**

Índice de edema perivascular: foram analisados cinco vasos pulmonares aleatórios em corte transversal por lâmina, no aumento de 400x. Os vasos foram selecionados quando cortados transversalmente, ou seja, quando a relação entre seus diâmetros perpendiculares entre si era maior que 0,6. O diâmetro do vaso foi estimado a partir das retas do retículo, as quais apresentavam comprimento conhecido. O vaso em questão tinha que estar completamente contido dentro do retículo e não podia estar em contiguidade com brônquios. Foi quantificado o número de pontos que se encontravam no edema perivascular, ou seja, entre o limite externo da camada muscular e o parênquima subjacente, e o número de interceptos das retas do retículo no limite externo da camada muscular. O Índice de Edema Perivascular para cada vaso foi determinado pelo quociente entre a raiz quadrada do número de pontos no edema perivascular e o número de interceptos do limite externo da camada muscular.

$$\text{Índice de edema perivascular} = \sqrt{\frac{\text{número de pontos no edema}}{\text{Número de interceptos}}}$$

### **3.10. Preparo das lâminas para microscopia confocal**

Os pulmões inclusos em parafina foram cortados em espessura de 5 µm para lâminas silanizadas (3-aminopropil-trietoxisilane, Sigma®). Em seguida, foram preparadas segundo protocolo habitual recomendado pelo núcleo de microscopia confocal FMUSP/HC<sup>64, 65, 66</sup>.

Os cortes fixados em lâminas silanizadas foram desparafinizados e hidratados por xilol seguido de álcool sequencialmente mais hidratado. Foram em seguida

incubados em PBS gelado por uma hora. Seguiu-se recuperação antigênica através de panela de pressão – citrato 10mM pH 6.0 durante 4 minutos contados a partir da pressurização total. Após lavagem com PBS, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos com tampão PBS/albumina bovina 1% (Sigma<sup>®</sup>).

A incubação com anticorpo específico primário foi feita por 16-18 horas a 4°C, em câmara úmida. O anticorpo primário utilizado foi anticorpo policlonal de coelho anti-paxilina total (Chemicon<sup>®</sup>) título 1:100, diluído em PBS/albumina bovina. As lâminas foram então lavadas três vezes em PBS com Tween<sub>20</sub> 0,05%.

O anticorpo secundário foi incubado protegido da luz durante 90 minutos a temperatura ambiente, numa diluição 1:150 de anticorpo marcado com fluoresceína (FITC) “anti-rabbit”. As lâminas foram então lavadas 5 x 5 min em PBS com Tween<sub>20</sub> 0,05%. Finalmente, as lâminas foram montadas com lamínulas e com solução de glicerina/PBS (v/v) e guardadas ao abrigo da luz e refrigeradas (em geladeira).

Foram feitas lâminas sem marcação (só BSA 1% nas incubações) para se determinar o grau de auto-fluorescência do tecido e outras para controle negativo de reação (sem a incubação do anticorpo primário).

### **3.11. Microscopia confocal a laser**

As lâminas foram analisadas utilizando-se um microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta/UV com objetiva plan-apocromática 100x/1,4 (óleo de imersão). Foram utilizados laser tipo Argônio (488 nm), Hélio-Neônio verde (543 nm) e Hélio-Neônio vermelho (633 nm). As lâminas sem marcação e controle negativo descritas

anteriormente foram utilizadas como referência para se determinar o nível zero de intensidade do sinal de fluorescência. As imagens foram obtidas em resolução de oito bits, 512 x 512 pixels. Um total de quatro campos aleatórios por lâmina foi obtido.

### **3.12. Microscopia eletrônica**

Após ficar na solução de lavagem durante 16-18 horas, o material foi pós-fixado em uma solução de OsO<sub>4</sub> a 1% em solução de lavagem durante mais uma hora na geladeira, seguido de solução de acetato de uranila 1% em solução de lavagem. O material foi desidratado em gradiente de acetona durante uma hora e 30 minutos (acetona 30% por 10 minutos, acetona 70% por 10 minutos, acetona 95% por 10 minutos e quatro banhos de 15 minutos cada em acetona pura). A etapa de pré-embebição consistiu de passagem em mistura 1:1 de acetona e resina Araldite (durante três horas) e a embebição em resina pura por uma hora em estufa a 40 °C. Após polimerização da resina em estufa a 70 °C por 72 horas, os blocos foram cortados em ultramicrótomo (Leica Ultracut<sup>®</sup>) para obtenção de cortes semifinos (0,5 µm), que foram corados a quente em solução constituída por Azul de Metileno 0,5%, Borato de sódio 0,5% e Azur II 0,5%. Após escolha da área mais adequada para observação, os cortes ultra-finos prateados, com aproximadamente 70nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo e contrastados por acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos, e por citrato de chumbo a 0,5%, durante 10 minutos. Os cortes ultra-finos foram estudados e micrografados em microscópio eletrônico Jeol 1010.

### 3.13. Realização de Western Blot

O pulmão de cada animal foi individualmente lavado em PBS e embebido em 1 ml de tampão de lise (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,4, aprotinina (Sigma<sup>®</sup>) 2 µg/mL e fenilmetilsulfonilfluoreto 1 mM) seguido de homogenização em Politron. Em seguida, o lisado foi submetido à agitação por 15 minutos a 4 °C e o extrato solúvel foi isolado do material precipitado após centrifugação a 13 000 g por 15 minutos a 4 °C. Os extratos foram mantidos a -20 °C até o momento do uso, quando sua concentração protéica foi determinada através de um Kit DC Protein Assay (Bio-rad<sup>®</sup>), que é baseado no método de Folin.

Em uma placa de 96 poços, foram colocados 4 µL de cada amostra a ter sua concentração protéica determinada, 20 µL da solução de tartarato de cobre e 160 µL do reagente de Folin. A placa foi homogenizada vagarosamente e, após 15 minutos a temperatura ambiente, sua absorbância a 655 nm foi determinada e comparada às obtidas em curva de padrão de BSA (0 – 1,44 µg).

As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o protocolo de Laemlli em condições não redutoras. O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375 M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, 0,03% e N,N,N,N tetra-metiletilenodiamina (Sigma<sup>®</sup>). O gel de empilhamento foi feito com Tris 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, persulfato de amônio 0,045% e N,N,N,N tetra-metiletilenodiamina. Os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 0,8%, glicerol 40% e azul de bromofenol

0,02%). A eletroforese foi feita em tampão Tris 25 mM, glicina 0,19 M pH 8.3, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 60V.

Os extratos protéicos separados no gel de poliacrilamida-SDS foram eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (“Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride”) e a transferência foi feita em tampão Tris 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20% por uma hora a 100 V a 4 °C.

Para bloquear os sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em leite desnatado Molico (Nestlé®) 5% em PBS por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Depois de lavada três vezes por 10 minutos com PBS/Molico, a membrana foi incubada por 16 horas a 4 °C com o anticorpo específicos para fosfo-FAK (Upstate®), fosfo-paxilina Tyr118 e paxilina total (Chemicon®), actina de músculo lise, alfa-tubulina e  $\beta$ -actina na diluição de 1:1 000 em PBS/Molico e novamente lavada com PBS/Molico três vezes por 10 minutos. Finalmente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase 1:1 000 diluído em PBS/Molico por uma hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com o Kit de ECL (Amershan®) segundo orientações do fabricante.

### **3.14. Análise estatística**

Os dados foram testados para distribuição normal com teste de Komolgorov-Smirnov e apresentados na forma de média e desvio-padrão.

As características gerais dos grupos, os dados de histomorfometria, de mecânica ventilatória inicial e de Western Blot foram comparados com análise de variância fator único (*one-way ANOVA*). Uma vez que uma diferença

estatisticamente significativa foi estabelecida pelo ANOVA, um teste *post-hoc* de múltiplas comparações tipo Games-Howell (assumindo variâncias diferentes conforme testado pelo teste de Levene) ou de Bonferroni (assumindo variâncias iguais conforme testado pelo teste de Levene) foi aplicado para se determinar a diferença entre os grupos estudados. Os dados de mecânica respiratória no final do experimento foram comparados entre os dois grupos ventilados com teste t-não pareado.

Conforme recomendação da Sociedade Fisiológica Americana, intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados e apresentados para as variáveis estudadas<sup>67, 68</sup>. Além dessa forma de apresentação e quantificação de tamanho de efeito (“Effect Size”), foi também calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para comparação entre dois grupos quando diferença significativa, e o coeficiente ômega quadrado ( $\omega^2$ ) para casos em que o ANOVA foi significativo<sup>69, 70</sup>. Segundo a literatura, cálculo de tamanho de efeito com valor acima de 0,50 sugere presença de efeito relevante<sup>68</sup>.

Toda a análise estatística foi feita bicaudal.

Foi considerado risco alfa de cometer erro tipo I ou de primeira ordem como cinco por cento. Valores de p menores que 0,05 foram então considerados como significativos. Os testes foram realizados usando programa estatístico SPSS 10.0 for Windows.



## 4. Resultados

### 4.1. Características gerais dos grupos

Apesar da elevada taxa de mortalidade dos animais ao protocolo estudado, obtivemos um total de quinze animais (seis no grupo controle, quatro no grupo BV e cinco no grupo AV).

Todos os animais foram semelhantes quanto aos valores de peso, total de volume de SF infundido e pressão arterial média no final do experimento. Observamos que os valores de pressão arterial média no início do experimento foram diferentes entre os grupos ( $p=0,025$  segundo ANOVA, com  $\omega=0,59$ ). Porém, as análises *post-hoc* entre os grupos não identificou diferenças significativas, com intervalos de confiança 95% para seus valores com sobreposição (tabela 01 e figura 02).

**Tabela 01 – Características gerais dos grupos**

	<b>Controle</b>	<b>Baixo Vt</b>	<b>Alto Vt</b>	<b>Valor p</b>
<b>Peso (g)</b>	346 ± 29 (320 – 400)	336 ± 24 (310 – 368)	351 ± 36 (305 – 390)	0,75
<b>SF (ml)</b>	NA	5,9 ± 0,9 (5 – 7)	5,2 ± 0,7 (4 – 6,5)	0,29
<b>PAM inicial (mmHg)</b>	131 ± 13 <sup>(a)</sup> (110 – 145)	148 ± 5 <sup>(b)</sup> (140 – 150)	146 ± 5 <sup>(c)</sup> (138 – 150)	<b><u>0,025</u></b> 0,59 <sup>(d)</sup>
<b>PAM final (mmHg)</b>	NA	133 ± 12 (120 – 145)	135 ± 10 (120 – 145)	0,74

Dados expressos em média ± desvio-padrão; NA = não se aplica; valores entre parênteses representam IC 95%, valor de p significativo sublinhado e em negrito

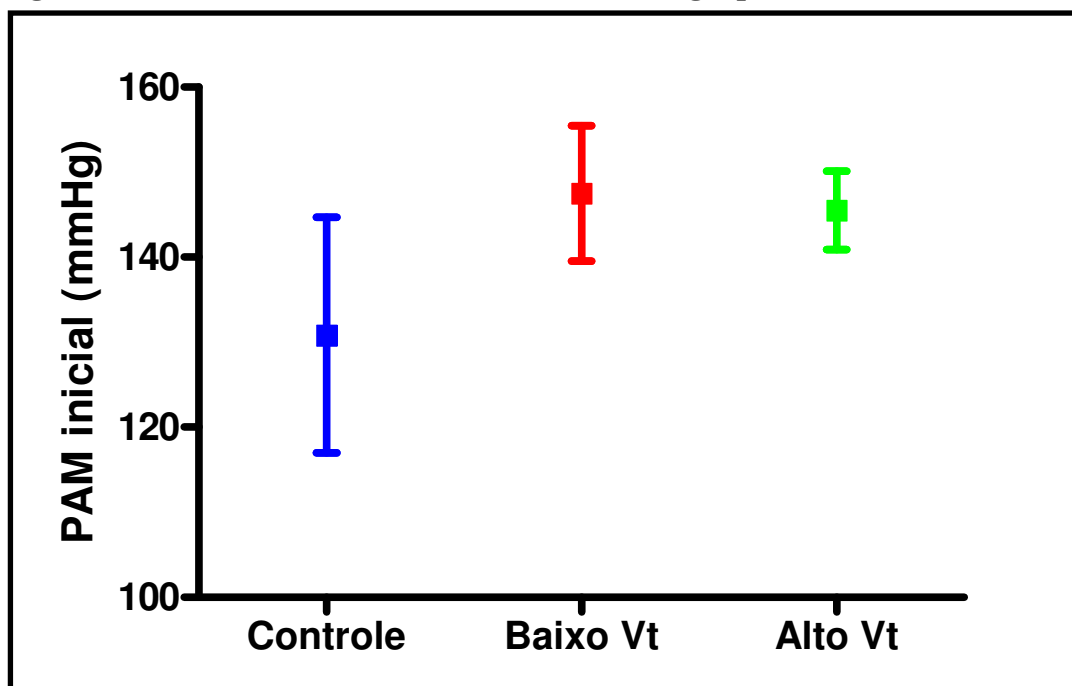
(a)  $p = 0,091$  vs AV pelo teste de Games-Howell

(b)  $p = 0,062$  vs controle pelo teste de Games-Howell

(c)  $p = 0,84$  vs BV pelo teste de Games-Howell

(d) valor de  $\omega$  para mensuração de tamanho de efeito

Figura 02 – Pressão arterial média inicial entre os grupos



Barras verticais representam os limites do intervalo de confiança 95% para os grupos. Quadrado central em cada barra representa o valor da média do grupo. Repare a sobreposição dos intervalos de confiança entre os grupos.

Em geral, observou-se uma tendência à redução da pressão arterial média nos grupos ventilados ao longo do experimento, mas que não foi significativa ( $p > 0,10$  para avaliação pareada).

#### 4.2. Dados de mecânica pulmonar

Os grupos apresentavam valores de mecânica pulmonar no início do experimento semelhante entre si: resistência basal ( $Res_{bas}$ ,  $p = 0,12$ ) e elastância dinâmica basal ( $Edin_{bas}$ ,  $p = 0,32$ ). No final do experimento, não havia diferença entre os grupos ventilados quanto à resistência final ( $Res_{fin}$ ,  $p = 0,60$ , tabela 02), mas houve uma diferença significativa entre os grupos quanto à elastância final ( $Edin_{fin}$ ,

p=0,001), com um aumento da elastância no grupo BV e redução no grupo AV (tabela 03 e figura 03).

**Tabela 02 – Dados de resistência inicial ( $Res_{bas}$ ) e final ( $Res_{fin}$ ) dos grupos**

	<b>Controle</b>	<b>Baixo Vt</b>	<b>Alto Vt</b>	<b>Valor p</b>
<b><math>Res_{bas}</math> (<math>cmH_2O/L/s</math>)</b>	0,15 ± 0,05 (0,098 – 0,192)	0,10 ± 0,02 (0,077 – 0,127)	0,10 ± 0,05 (0,068 – 0,142)	0,12
<b><math>Res_{fin}</math> (<math>cmH_2O/L/s</math>)</b>	NA	0,14 ± 0,06 (0,045 – 0,240)	0,11 ± 0,08 (0,015 – 0,215)	0,60

Dados expressos em média ± desvio-padrão; NA = não se aplica; valores entre parênteses representam IC 95%

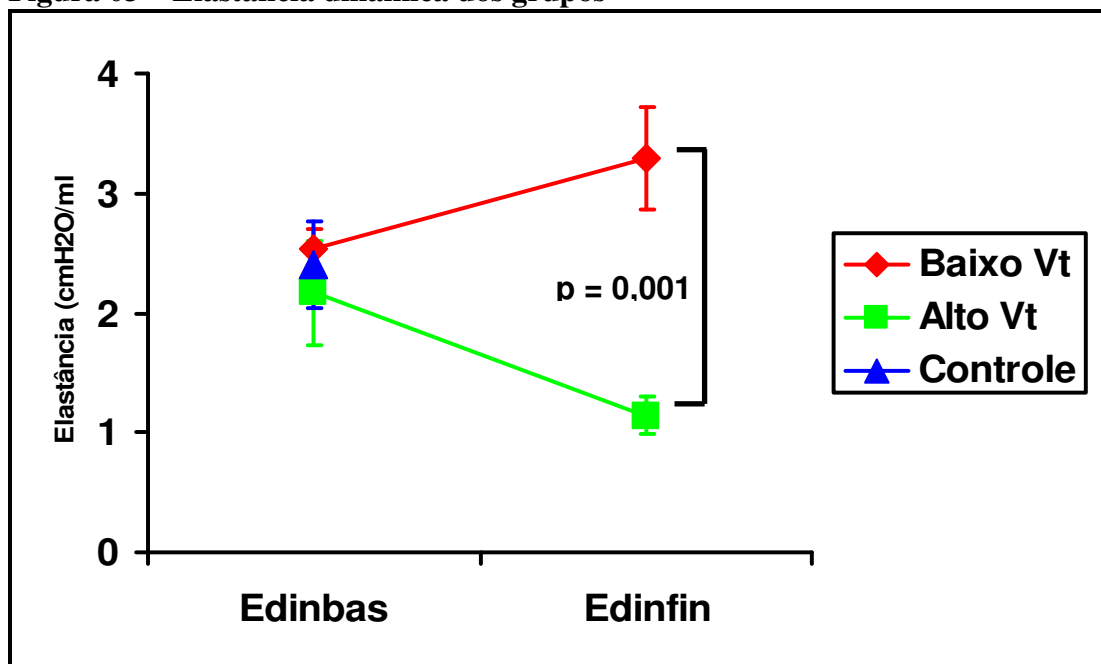
**Tabela 03 – Dados de elastância dinâmica inicial ( $Edin_{bas}$ ) e final ( $Edin_{fin}$ ) dos grupos**

	<b>Controle</b>	<b>Baixo Vt</b>	<b>Alto Vt</b>	<b>Valor p</b>
<b><math>Edin_{bas}</math> (<math>cmH_2O/ml</math>)</b>	2,4 ± 0,36 (2,03 – 2,79)	2,5 ± 0,18 (2,25 – 2,82)	2,17 ± 0,43 (1,63 – 2,71)	0,32
<b><math>Edin_{fin}</math> (<math>cmH_2O/ml</math>)</b>	NA	3,3 ± 0,4 (2,62 – 3,98)	1,14 ± 0,16 (0,95 – 1,34)	<b><u>0,001</u></b> 0,98 <sup>#</sup>
<b><math>\Delta Edin</math> inicial e final</b>	NA	0,76 ± 0,4 (0,12 – 1,41)	- 1,02 ± 0,47 (-1,62 – -0,44)	<b><u>0,001</u></b> 0,91 <sup>#</sup>

Dados expressos em média ± desvio-padrão; NA = não se aplica; valores entre parênteses representam IC 95%; valor de p significativo sublinhado e em negrito

# valor de (r) para mensuração de tamanho de efeito

Figura 03 – Elastância dinâmica dos grupos



Barras verticais representam desvio-padrão dos grupos

### 4.3. Análise histomorfométrica

A análise da área de parênquima pulmonar entre os grupos estudados não evidenciou diferença significativa ( $p=0,30$ ), assim como a avaliação de edema perivascular ( $p=0,88$ ). Porém, o índice de infiltrado neutrofílico foi significativamente diferente ( $p<0,001$ ). Na análise pelo teste de múltiplas comparações, verificamos que os três grupos eram diferentes entre si ( $p < 0,01$  entre os grupos). Os dados de histomorfometria estão apresentados na tabela 04 e representados nas figuras 04 a 07.

Tabela 04 – Dados de histomorfometria para os grupos estudados

	Controle	Baixo Vt	Alto Vt	Valor p
Área de parênquima pulmonar	17 ± 6 (16 – 19)	16 ± 8 (14 – 19)	15 ± 6 (14 – 17)	0,30
Índice de infiltrado neutrofílico	0,18 ± 0,09 <sup>(a)</sup> (0,15 – 0,20)	0,31 ± 0,17 <sup>(b)</sup> (0,26 – 0,37)	0,52 ± 0,4 <sup>(c)</sup> (0,41 – 0,63)	<b>&lt; 0,001</b> 0,51 <sup>(d)</sup>
Índice de edema perivascular	0,5 ± 0,23 (0,4 – 0,6)	0,53 ± 0,23 (0,4 – 0,6)	0,54 ± 0,20 (0,4 – 0,6)	0,88

Dados expressos em média ± desvio-padrão; valores entre parênteses representam IC 95%; valor de p significativo sublinhado e em negrito

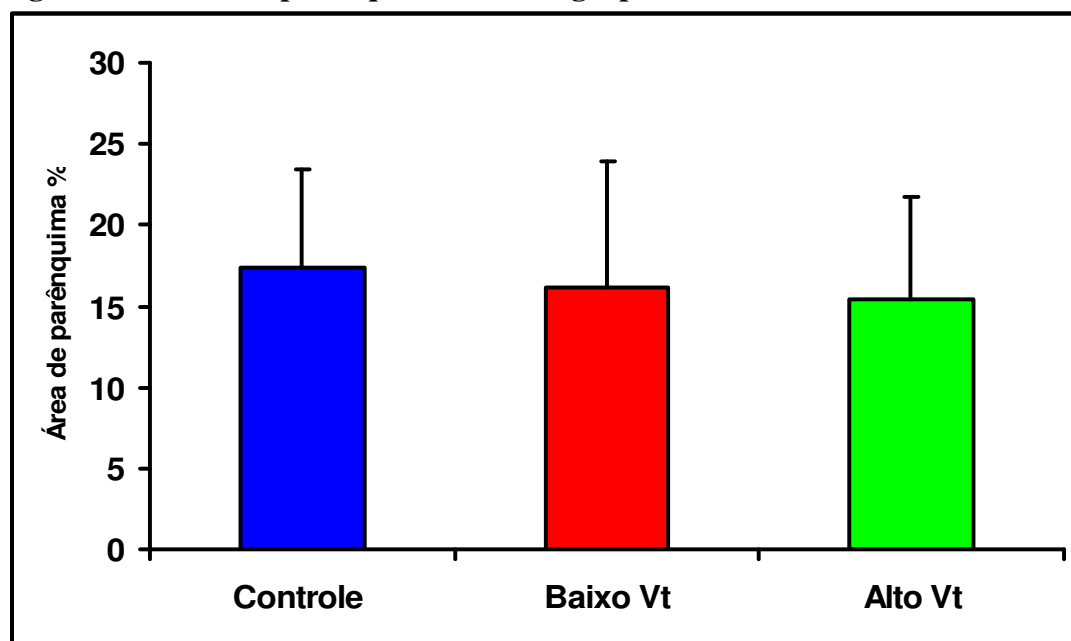
(a)  $p < 0,001$  vs AV pelo teste de Games-Howell

(b)  $p < 0,001$  vs controle pelo teste de Games-Howell

(c)  $p = 0,003$  vs BV pelo teste de Games-Howell

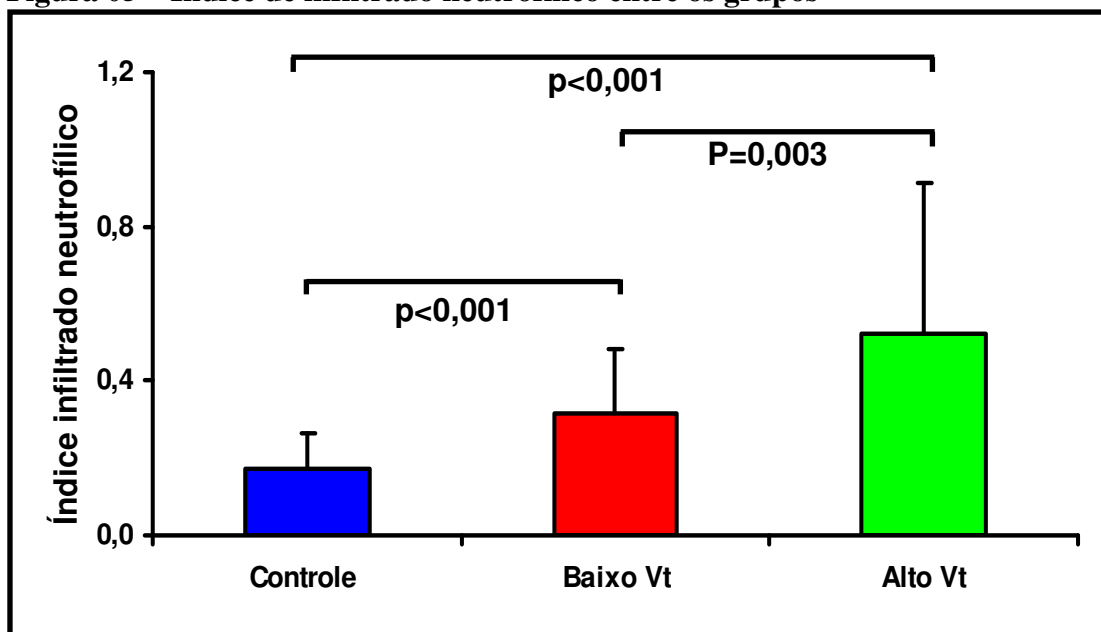
(d) valor de  $\omega$  para mensuração de tamanho de efeito

Figura 04 – Área de parênquima entre os grupos



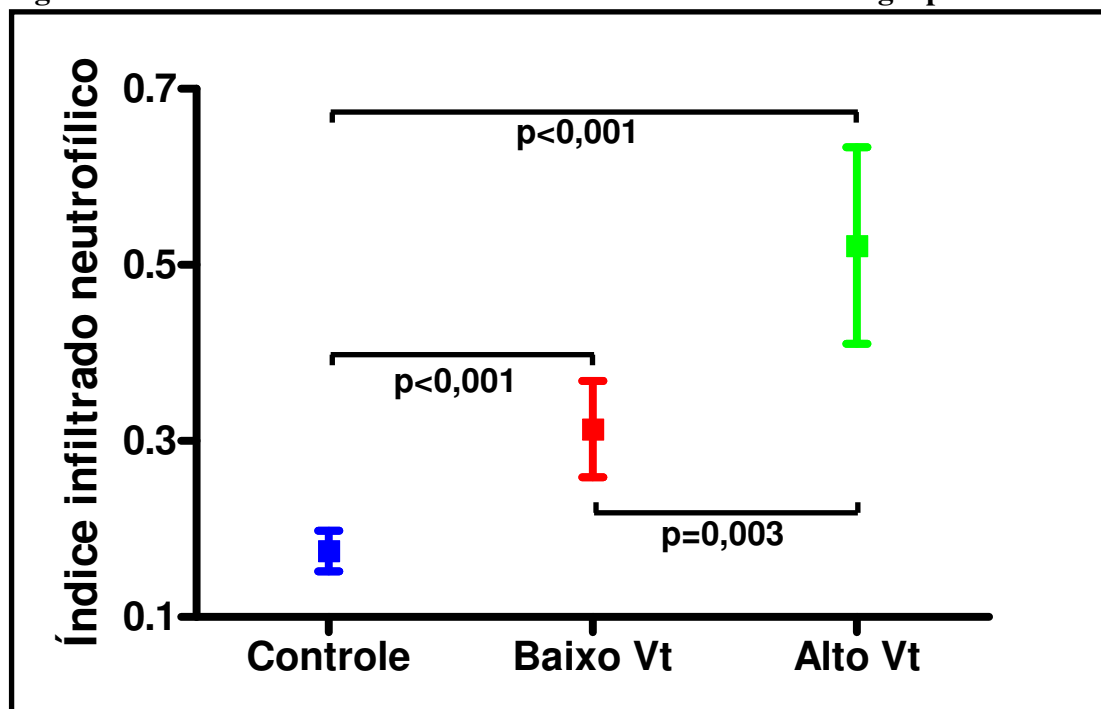
ANOVA entre os grupos ( $p = 0,30$ ). Barras verticais representam desvio-padrão.

Figura 05 – Índice de infiltrado neutrofílico entre os grupos



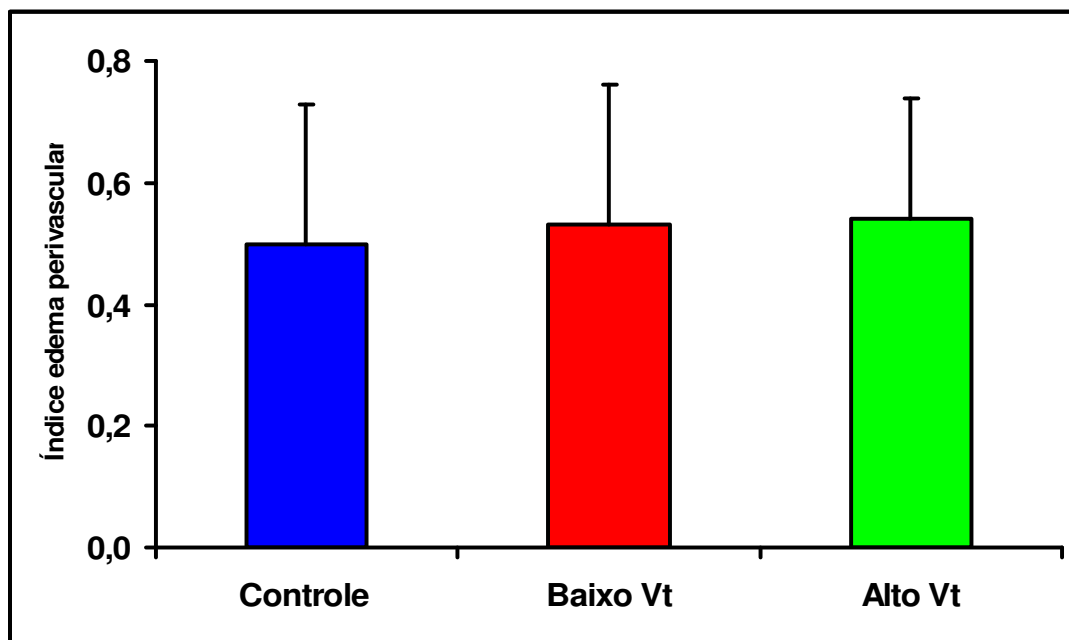
ANOVA entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Diferença entre os grupos descrita na figura foi mensurada pelo teste de múltiplas comparações de Games-Howell. Barras verticais representam desvio-padrão.

Figura 06 – IC 95% do índice de infiltrado neutrofílico entre os grupos



ANOVA entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Diferença entre os grupos descrita na figura foi mensurada pelo teste de múltiplas comparações de Games-Howell. Barras verticais representam os limites do intervalo de confiança 95% para os grupos. Quadrado central em cada barra representa o valor da média do grupo.

Figura 07 – Índice de edema perivascular entre os grupos



ANOVA entre os grupos ( $p = 0,88$ ). Barras verticais representam desvio-padrão.

#### 4.4. Western Blot

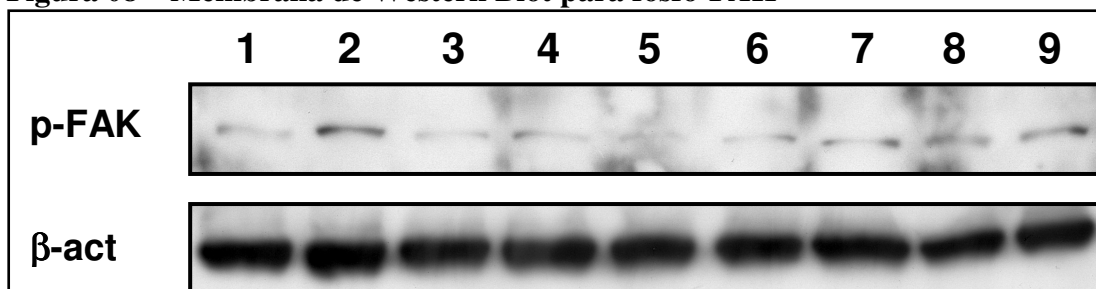
Observamos um aumento de 40% na densidade óptica na banda da FAK do grupo AV em relação ao grupo controle (tabela 05, figuras 08 e 09).

Tabela 05 – Dados do Western Blot para fosfo-FAK para os grupos estudados

	Controle	Baixo Vt	Alto Vt	Valor p
<b>Densidade óptica</b>	0,42 ± 0,08 (0,23 – 0,62)	0,38 ± 0,02 (0,34 – 0,42)	0,59 ± 0,14 (0,24 – 0,96)	0,069

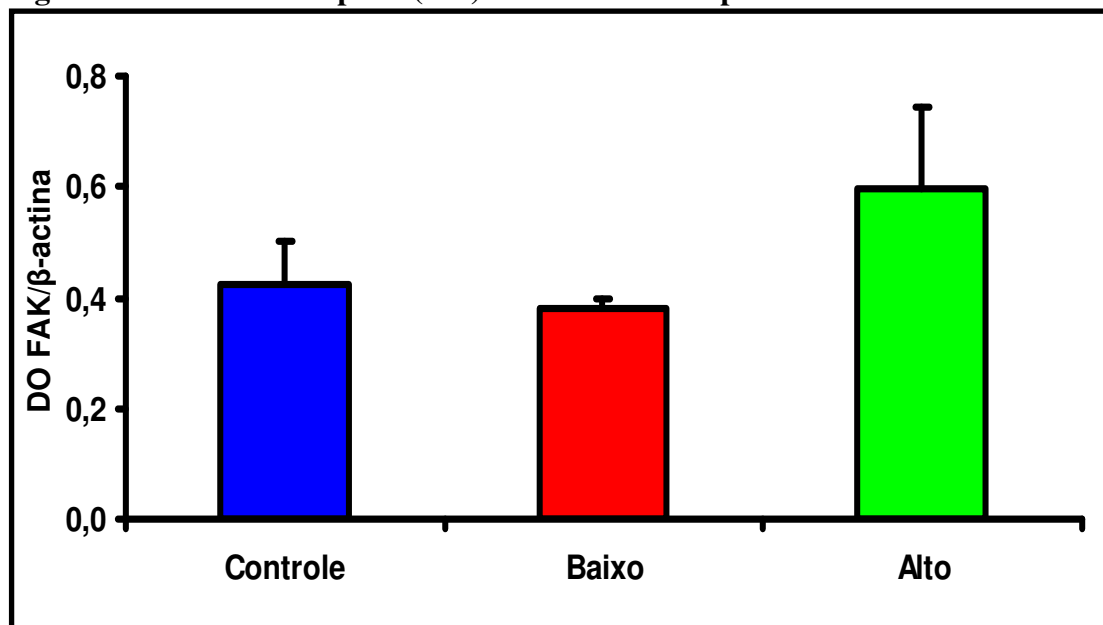
Dados expressos em média ± desvio-padrão;  $n = 3$  para cada grupo; controle interno com beta-actina

**Figura 08 – Membrana de Western Blot para fosfo-FAK**



Controles (1 a 3), Baixo Vt (4 a 6) e Alto Vt (7 a 9). Controle interno com β-actina.

**Figura 09 – Densidade óptica (DO) do Western Blot para fosfo-FAK**



Barras verticais correspondem ao desvio-padrão do grupo. P = 0,069 pelo ANOVA para todos os grupos. Observamos aumento de 40% no grupo Alto Vt em relação ao controle. N = 3 para cada grupo.

Para avaliarmos a ativação da paxilina através de sua fosforilação, comparamos a relação fosfo-paxilina/paxilina total entre os grupos. Observamos um aumento de 100% na relação da fosfo-paxilina/paxilina total no grupo AV em relação ao grupo controle (tabela 06, figuras 10 a 12).



Tabela 06 – Dados do Western Blot para fosfo-paxilina/paxilina total nos grupos estudados

	Controle	Baixo Vt	Alto Vt	Valor p
<b>Densidade óptica</b>	0,18 ± 0,01 <sup>(a)</sup> (0,17 – 0,19)	0,16 ± 0,02 <sup>(b)</sup> (0,12 – 0,20)	0,38 ± 0,01 <sup>(c)</sup> (0,35 – 0,42)	<b><u>&lt;0,001</u></b> 0,99 <sup>(d)</sup>

Dados expressos em média ± desvio-padrão; n = 3 para cada grupo; valores entre parênteses representam IC 95%; valor de p significativo sublinhado e em negrito

(a) p < 0,0001 vs AV pelo teste de Bonferroni

(b) p = 0,26 vs controle pelo teste de Bonferroni

(c) p < 0,0001 vs BV pelo teste de Bonferroni

(d) valor de  $\omega$  para mensuração de tamanho de efeito

Figura 10 – Membrana de Western Blot para fosfo-paxilina e paxilina total

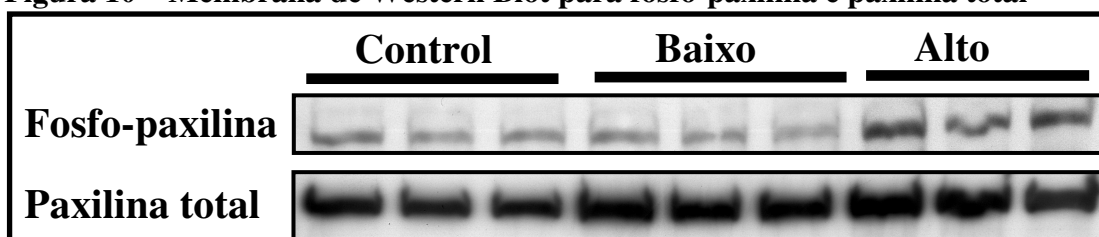
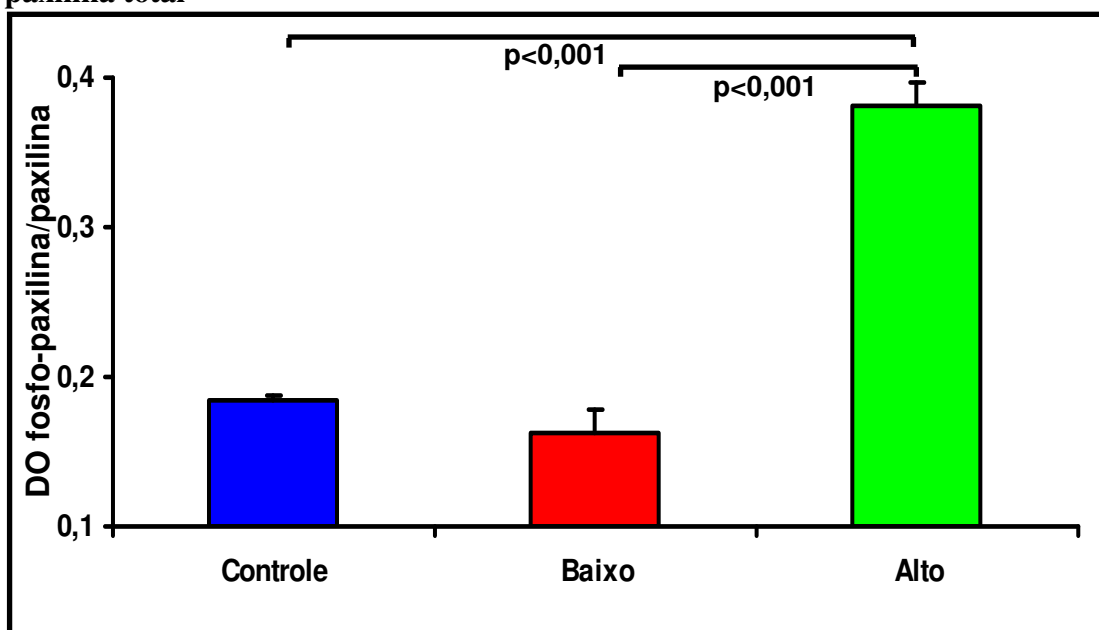


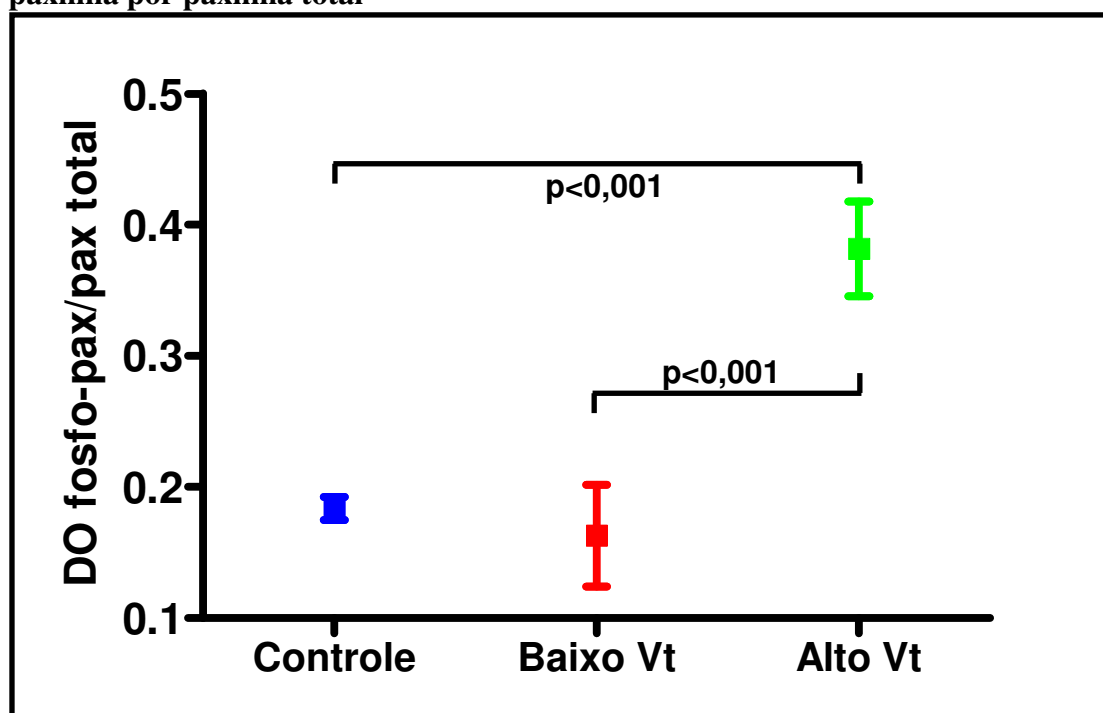
Figura 11 – Densidade óptica (DO) de Western Blot para fosfo-paxilina por paxilina total



Barras verticais correspondem ao desvio-padrão do grupo; p < 0,001 pelo ANOVA para todos os grupos; n = 3 para cada grupo; diferença entre os grupos

descrita na figura foi mensurada pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Figura 12 – IC 95% da densidade óptica (DO) do Western Blot para fosfo-paxilina por paxilina total



ANOVA entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Diferença entre os grupos descrita na figura foi mensurada pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Barras verticais representam os limites do intervalo de confiança 95% para os grupos. Quadrado central em cada barra representa o valor da média do grupo.  $N = 3$  para cada grupo.

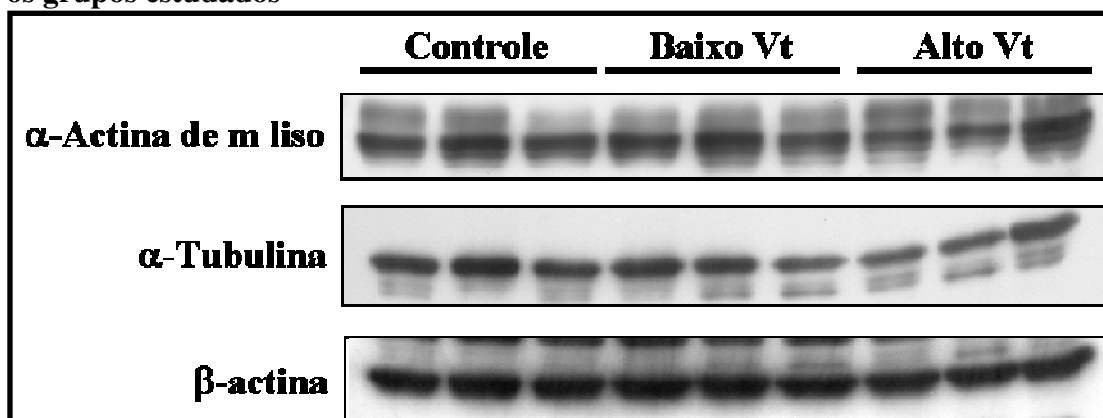
A comparação dos Western Blots para paxilina total, alfa-actina de músculo liso e alfa-tubulina não demonstraram diferenças entre os grupos estudados (tabela 07, figuras 13 e 14).

**Tabela 07 – Dados da densidade óptica (DO) para paxilina total, alfa-actina de músculo liso e alfa-tubulina para os grupos estudados**

<b>DO</b>	<b>Controle</b>	<b>Baixo Vt</b>	<b>Alto Vt</b>	<b>Valor p</b>
<b>Paxilina total</b>	0,77 ± 0,10 (0,53 – 1,01)	0,82 ± 0,10 (0,58 – 1,07)	0,76 ± 0,06 (0,60 – 0,92)	0,65
<b>α-actina m. liso</b>	0,65 ± 0,09 (0,62 – 0,67)	0,71 ± 0,03 (0,65 – 0,77)	0,67 ± 0,07 (0,48 – 0,85)	0,28
<b>α-tubulina</b>	0,61 ± 0,06 (0,46 – 0,76)	0,57 ± 0,06 (0,41 – 0,72)	0,55 ± 0,06 (0,39 – 0,70)	0,45

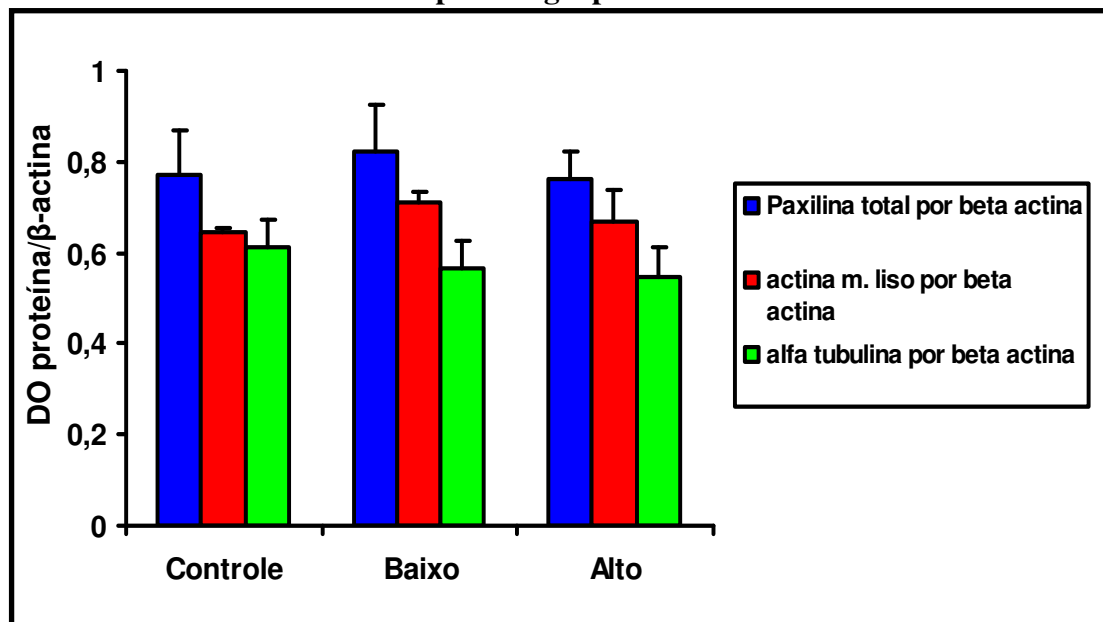
Dados expressos em média ± desvio-padrão; n = 3 para cada grupo; controle interno com beta-actina

**Figura 13 – Western Blot para alfa-actina de músculo liso e alfa-tubulina para os grupos estudados**



Controle interno com β-actina.

**Figura 14 – Densidade óptica (DO) do Western Blot para paxilina total, alfa-actina de m liso e alfa-tubulina para os grupos estudados**

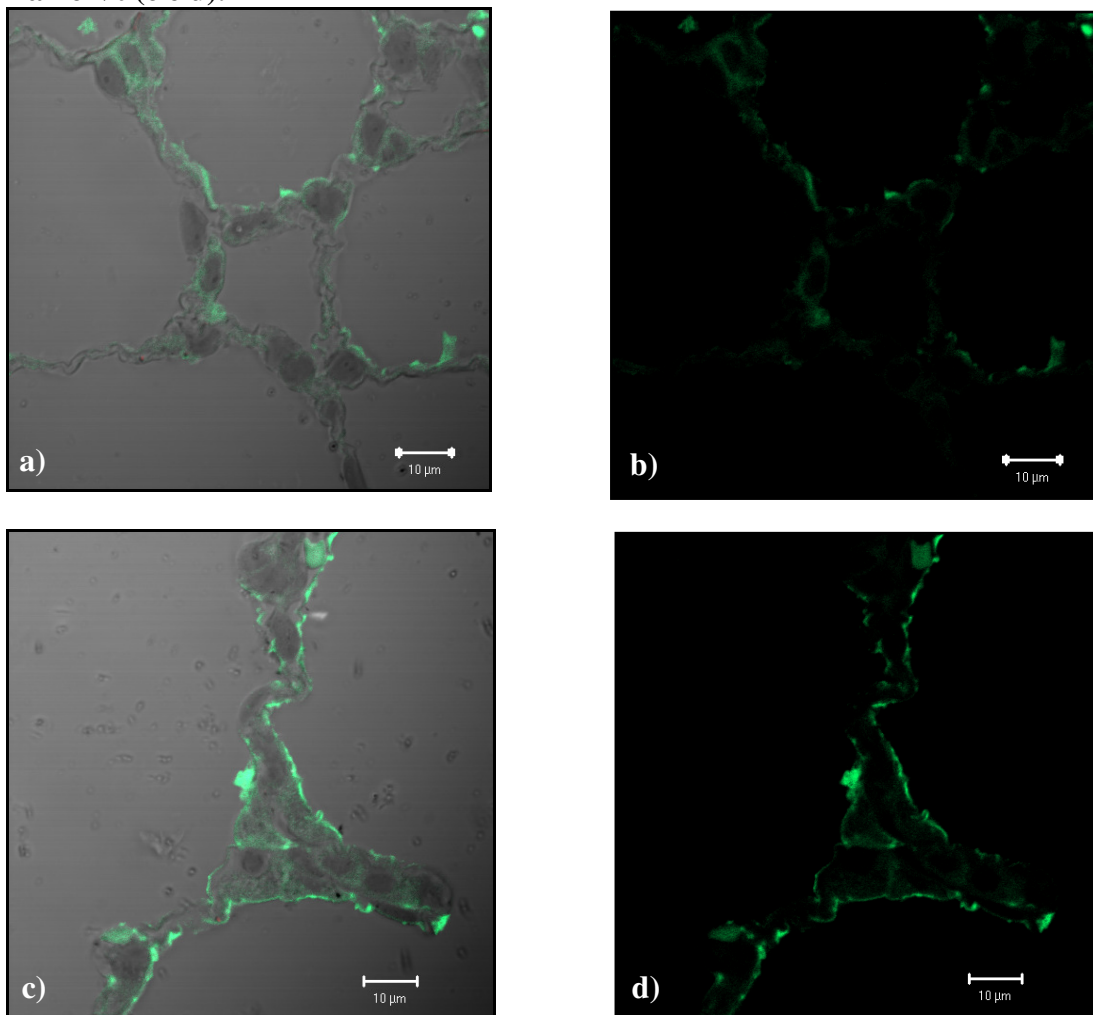


Barras verticais correspondem ao desvio-padrão do grupo; n=3 para cada grupo.

#### **4.5. Microscopia confocal**

A avaliação da microscopia confocal demonstrou que a marcação da paxilina total se apresenta de preferência na periferia dos septos alveolares, justaposta à membrana plasmática celular. Tal padrão não apresentou diferença entre os grupos ventilados estudados (figura 15).

**Figura 15 – Microscopia confocal para paxilina total nos grupos Alto Vt (a e b) e Baixo Vt (c e d).**



**Fotos obtidas com marcação do anticorpo secundário com FITC. Fotos (a) e (c) apresentam septos alveolares representativos. Fotos (b) e (d) são as respectivas fotos sem a imagem de transmissão**

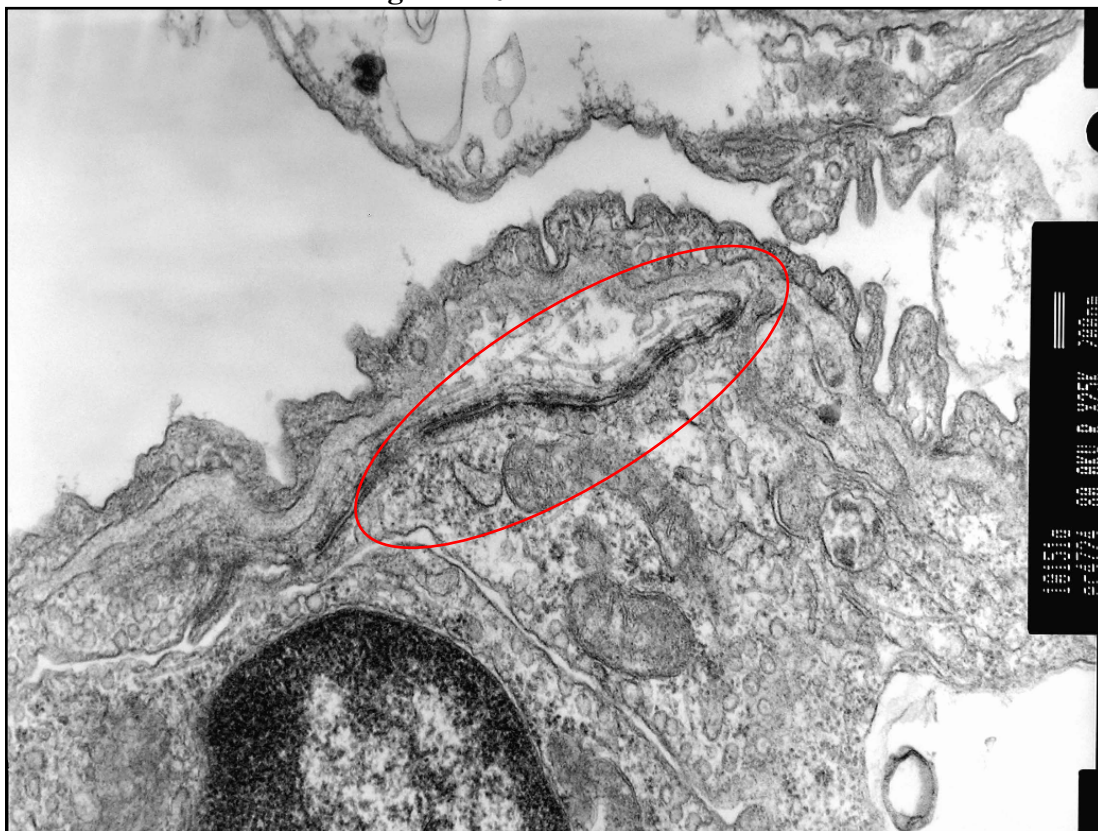
#### 4.6. Microscopia eletrônica

As imagens da microscopia eletrônica foram obtidas para avaliação qualitativa (figuras 16 a 19). Observamos um aparente aumento na arquitetura da *zonula adherens* nos grupos de alto Vt.

**Figura 16 – Microscopia eletrônica do epitélio alveolar de um animal do grupo controle evidenciando região de *zonula adherens***



**Figura 17 – Microscopia eletrônica do epitélio alveolar de um animal do grupo de Baixo Vt evidenciando região de *zonula adherens***



**Figura 18 – Microscopia eletrônica do epitélio alveolar de um animal do grupo de Alto Vt evidenciando região de tight junction e de *zonula adherens***



**Figura 19 – Microscopia eletrônica do epitélio alveolar de um animal do grupo de Alto Vt evidenciando região de lesão de membrana plasmática**





## **5. Discussão**

O presente trabalho procurou avaliar as alterações relacionadas à instalação da VILI no citoesqueleto e nas suas proteínas associadas em pulmões previamente hígidos. Apesar da lesão tecidual e da ativação inflamatória pulmonar estar bem documentada nessa patologia, as alterações intracelulares do citoesqueleto num modelo *in vivo* ainda não foram descritas. Como sítio principal da mecanotransdução nas células<sup>20,45,51</sup>, fica evidente a importância da descrição do processo de modificação e adaptação dessa estrutura à distensão pulmonar durante a ventilação mecânica.

Os animais obtidos foram semelhantes em termos gerais (tabela 01). Observamos uma diferença na PAM inicial entre os grupos detectada pela ANOVA ( $p=0,025$ ). Porém, tal diferença deixou de ser significativa quando os grupos foram comparados entre si através dos testes de múltiplas comparações. Mesmo comparando-se os intervalos de confiança 95% (figura 02), podemos perceber uma grande sobreposição entre eles. Isso sugere que tal diferença não deve ser relevante. Houve uma tendência à redução da PAM durante o experimento nos grupos ventilados, mas que não foi significativa ( $p > 0,10$ ). Dessa forma, a PAM final foi semelhante entre os grupos.

Os animais das estratégias ventilatórias com AV e BV receberam quantidades semelhantes de SF como expansão volêmica ao longo do experimento. O grupo AV recebeu uma quantidade proporcionalmente maior nos primeiros dez minutos de ventilação mecânica em comparação ao grupo BV (dados não mostrados), possivelmente devido à maior repercussão hemodinâmica da estratégia ventilatória<sup>3</sup>.

A PAM respondeu prontamente à expansão, tanto que os valores de PAM final foram semelhantes nos dois grupos ventilados.

Como a quantidade de SF administrado não teve diferença entre os animais, espera-se que a repercussão pulmonar desse volume seja a mesma. Além disso, o mesmo valor de PEEP foi aplicado para todos os animais. Como o PEEP em modelo de edema pulmonar hidrostático redistribui o líquido alveolar para o interstício perivascular e melhora a fração shunt, diferentes pressões expiratórias poderiam ter impactos diferentes na mensuração do parênquima<sup>71</sup>, mas que não foi o caso no nosso estudo. Por fim, com uma volemia estimada em 5,4 ml/100g<sup>72</sup>, os animais receberam em média 30% da volemia em SF, valor semelhante ou até menor proporcionalmente ao utilizado em ressuscitação volêmica em outros estudos semelhantes<sup>24,25</sup>.

A avaliação da mecânica respiratória não demonstrou modificação na resistência aérea (tabela 02). Porém, os efeitos da ventilação foram evidentes na medida de elastância pulmonar (tabela 03 e figura 03). Como os animais receberam anestesia geral e foram instrumentados em decúbito dorsal, esperavam-se atelectasias na região posterior, com conseqüências para a mecânica pulmonar devido à redução na capacidade residual funcional<sup>73</sup>. Inicialmente, os animais foram semelhantes na  $Edin_{bas}$  (ANOVA  $p = 0,32$ ). Tal observação provavelmente se deve à utilização de PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O em todos os animais ventilados, o que deve ter contribuído para minimizar os efeitos iniciais das atelectasias.

Após quatro horas de VM, o grupo AV teve redução na  $Edin$  enquanto o grupo BV apresentou um aumento (tabela 03 e figura 03). Provavelmente o grupo BV desenvolveu atelectasias em região posterior, com progressão durante o período

de estudo devido à curarização e manutenção do decúbito dorsal. Apesar do reconhecido papel da aplicação da PEEP na prevenção de atelectasias, o valor de 5 cmH<sub>2</sub>O deve ter sido insuficiente para preveni-las por completo nesse grupo. Já o grupo AV apresentou melhora da Edin por provável recrutamento por volume. Sabe-se que a hiperdistensão pulmonar cíclica ocasiona lesão do surfactante<sup>74-77</sup>, o que poderia levar a uma piora na Edin nesse grupo. Entretanto, a aplicação de grandes Vt é capaz de ocasionar um “tidal recruitment” que, apesar de ser lesivo a médio prazo pela abertura e fechamento cíclico dos alvéolos e vias aéreas<sup>78-80</sup>, pode ser capaz de melhorar a elastância a curto prazo.

Na avaliação histomorfométrica, podemos observar que houve um aumento significativo no infiltrado neutrofílico dos septos alveolares com a ventilação mecânica lesiva no grupo AV em relação aos outros grupos. Mais ainda, houve um aumento inesperado no infiltrado no grupo BV em relação ao controle (tabela 04 e figuras 05 e 06). Tais dados sugerem que a ventilação mecânica, mesmo em Vt teoricamente adequados, é capaz de induzir uma resposta inflamatória. Além disso, observou-se uma curva dose-resposta: maior distensão, maior infiltrado neutrofílico.

Esses dados sugerindo que a ventilação mecânica em pulmões saudáveis, mesmo com Vt baixos, é capaz de desencadear estímulos pró-inflamatórios não são inéditos. Caruso e colaboradores demonstraram em modelo experimental semelhante ao nosso que ventilação com Vt de 6 ml/kg por uma hora induz infiltrado neutrofílico pulmonar em relação a animais não-ventilados, além de aumentar a expressão de RNAm de interleucina-1 $\beta$  e  $\alpha$ -1 pró-colágeno no pulmão<sup>81</sup>. A utilização de Vt de 24 ml/kg não induziu diferença em relação ao grupo com 6 ml/kg. Sendo assim, a ventilação mecânica, mesmo com baixos Vt, pode produzir inflamação.

No nosso estudo, a presença de um infiltrado neutrofílico maior no grupo AV em relação ao BV difere dos dados de Caruso e colaboradores, que não evidenciaram diferenças nos grupos ventilados estudados<sup>81</sup>. Algumas diferenças nos protocolos são perceptíveis (PEEP = 5 cmH<sub>2</sub>O em todos os grupos e Vt de 8 ml/kg no grupo BV, enquanto Caruso e colaboradores utilizaram zero de PEEP e grupo BV com Vt de 6 ml/kg). Mas a principal diferença que pode justificar os diferentes achados no infiltrado neutrofílico foi o tempo de ventilação: quatro horas no nosso estudo e uma hora no outro. Esse período mais prolongado pode ter resultado numa exposição maior ao estímulo lesivo do alto Vt, o que desencadearia uma maior sinalização aos polimorfonucleares. Outros autores já demonstraram que hiperdistensão estimula a produção de MIP-2 (o equivalente à interleucina-8 em ratos, atuando como fator quimiotático), além de outras citocinas<sup>22,24,32</sup>. Como não dosamos nenhuma citocina, tais suposições são especulativas. Além disso, o infiltrado neutrofílico induzido pela VILI parece ser tempo-dependente, necessitando de um período maior para que possa se manifestar<sup>82</sup>. Apesar dessas considerações, o maior infiltrado neutrofílico induzido pela VILI sugere que o protocolo conseguiu induzir uma resposta inflamatória/quimiotática, validando a presença de lesão pulmonar pela ventilação.

Apesar do maior infiltrado neutrofílico, não se observou aumento na área de parênquima (figura 04) nem no índice de edema perivascular (figura 07). Entretanto, não podemos descartar um maior extravasamento de líquidos nos grupos ventilados em decorrência de aumento da permeabilidade vascular. Edema e aumento da água extravascular pulmonar são achados freqüentes em estudos de VILI, podendo inclusive preceder o infiltrado neutrofílico<sup>9,11,12,26</sup>. Tal edema apresenta uma evolução que se faz inicialmente pelo compartimento intersticial perivascular e

peribrônquico, para depois acometer os septos alveolares<sup>83</sup>. Fora isso, a aplicação da PEEP promove redistribuição do edema pulmonar para as regiões perivasculares do interstício<sup>71</sup>. Dessa forma, esperávamos que a avaliação histomorfométrica conjunta tanto da área proporcional de parênquima como também do índice de edema perivascular pudessem identificar a presença de edema intersticial. Como não se observaram diferenças entre os grupos ventilados e o controle não-ventilado, uma dúvida foi levantada: será que a VILI não desencadeou edema pulmonar, ou será que a técnica utilizada não foi capaz de detectá-la de forma acurada?

O edema pulmonar induzido pela VILI é frequentemente descrito em alguns trabalhos<sup>9,11,12,26</sup>, mas não em todos<sup>23,25,84</sup>. Diferenças entre os estudos podem explicar tais achados: espécies diferentes, protocolos de ventilação discrepantes tanto no  $V_t$  usado como no tempo de ventilação, uso ou não de PEEP, uso de frações inspiradas de  $O_2$  de 100%, técnicas de mensuração de edema diferentes, modelos *in vivo* ou estudos com pulmões *ex vivo*. Mesmo nos estudos que não detectaram aumento do edema, outros parâmetros sugerem lesão pulmonar, como aumento na produção de citocinas ou infiltrado leucocitário, semelhante ao nosso estudo.

Quanto às técnicas usadas, geralmente se utiliza a relação peso pulmonar fresco/seco, ou avaliações mais direcionadas à permeabilidade vascular do pulmão. Usamos um critério histológico de avaliação do edema pela sua facilidade, não necessitando de novas instrumentações no animal, além de permitir avaliação paralela do infiltrado neutrofílico e realização da microscopia confocal e eletrônica. Talvez se tivéssemos realizado estudos mais detalhados para tal avaliação teríamos detectado tal edema. Mesmo assim, tais técnicas apresentam limitações, sendo que alguns defendem seu uso combinado para melhorar as informações obtidas<sup>85</sup>.

Uma vez que a ventilação induziu inflamação nos pulmões dos animais, especialmente nos submetidos a alto Vt, avaliamos as alterações no citoesqueleto e nas proteínas associadas, especialmente na FAK e na paxilina.

Nossos dados sugerem que o estresse da hiperdistensão cíclica pelo alto Vt aumenta a quantidade de fosfo-FAK no pulmão (tabela 05 e figuras 08 e 09). Bhattacharya e colaboradores encontraram dados semelhantes para células endoteliais retiradas de um modelo de pulmão isolado. Nesse estudo, Vt elevado induziu uma resposta pró-inflamatória no endotélio a fim de facilitar a adesão leucocitária pelo aumento de P-selectina, além de aumentar a fosforilação da FAK e paxilina<sup>23</sup>. Porém, Desai e colaboradores demonstraram dados diferentes quando se estudou pneumócitos II isolados de pulmões submetidos a alto Vt e hiperóxia<sup>58</sup>. Eles verificaram que houve uma redução na fosforilação da FAK e da paxilina nessas células, em comparação com as isoladas de ratos controle ou somente submetidas a Vt elevado sem hiperóxia. Como consequência dessa menor fosforilação da FAK, as células apresentavam menor capacidade de adesão<sup>58</sup>. Dessa forma, os diferentes tipos celulares do pulmão podem apresentar respostas distintas ao mesmo estímulo.

Realizamos Western Blot com homogenato de todo o pulmão, de forma que nossos achados poderiam ser diferentes caso avaliássemos separadamente o endotélio do epitélio. Weibel e colaboradores descreveram o pulmão de ratos<sup>86</sup> e de seres humanos<sup>87</sup> quanto à quantidade e representatividade dos diferentes tipos celulares. Em ambas as espécies, há pelo menos o dobro de células endoteliais em relação aos pneumócitos II. Sendo assim, o homogenato de todo o pulmão que realizamos deve ter representado mais o compartimento endotelial, sugerindo o porquê de nossos dados serem mais próximos aos de Bhattacharya e colaboradores.

Também observamos um aumento expressivo na quantidade de fosfo-paxilina (tabela 06 e figuras 10 a 12). Como uma das principais proteínas-alvo de fosforilação pela FAK ativada<sup>49</sup>, seu aumento era esperado seguindo o aumento da fosfo-FAK no grupo AV. Isso sugere que o estiramento cíclico da ventilação mecânica iniciou um processo intracelular de ativação de quinases, levando a uma mecanotransdução do estímulo mecânico para um sinal bioquímico. Sabe-se que a ativação da paxilina está associada, por exemplo, com aumento na expressão de selectinas no endotélio, possibilitando maior adesão leucocitária (talvez explicando em parte o maior infiltrado neutrofílico no grupo AV)<sup>23</sup>. Já se observou também que sua ativação está associada a reorganização do citoesqueleto de actina em células sob estiramento cíclico<sup>88</sup>. Sendo assim, os dados conjuntos da fosfo-FAK e da fosfo-paxilina indicam que a distensão pulmonar induzida pela VM promoveu uma resposta intracelular no parênquima pulmonar.

Na avaliação do Western Blot da forma total da paxilina e de outras proteínas do citoesqueleto (tabela 07 e figura 13 e 14), não observamos alterações. Isso provavelmente se deve ao fato que a mecanotransdução inicial no período estudado se deve primordialmente à sinalização mediada por fosforilação/ativação, como no caso da paxilina. Com isso, a produção *de novo* de proteínas, mecanismo mais demorado e dispendioso do ponto de vista energético, fica para um segundo plano. A observação de manutenção da quantidade de alfa-tubulina nos grupos corrobora a idéia de que o citoesqueleto se reorganiza frente aos estímulos, ao invés de apenas aumentar a produção de seus constituintes<sup>42</sup>.

As imagens obtidas através da microscopia confocal nos permitem observar que a marcação para a paxilina total se fez principalmente no septo alveolar,

especialmente na região perimembrana plasmática. Assim, o sítio principal de localização da paxilina (que, na forma total inclui a fosforilada) no pulmão aparenta ser as células presentes no septo alveolar (endotélio e/ou epitélio pulmonar), e não outras células em trânsito (como os neutrófilos). Com isso, podemos sugerir que o septo alveolar é um dos sítios principais de resposta ao estresse mecânico da VILI.

Uma quantificação das fibras de estresse da actina seria interessante, de forma a demonstrar que o aumento da fosforilação da FAK e da paxilina está ou não associada a um aumento na reorganização do citoesqueleto. Entretanto, a visualização e, principalmente, a quantificação das fibras de estresse da actina em estudos *in vivo* é tecnicamente muito difícil e, até recentemente, não descrita. Damarla e colaboradores<sup>89</sup> foram os primeiros a descrever uma técnica semi-quantitativa para avaliar as alterações dos microfilamentos de actina em resposta a um estresse mecânico em um modelo *in vivo*. Uma complementação dos dados com tal técnica seria necessária.

Outra possível avaliação seria o bloqueio específico da FAK ou da paxilina e seus efeitos no citoesqueleto com a indução de VILI. Porém, não existem bloqueadores específicos para essas proteínas. O bloqueio do citoesqueleto de actina em animais é letal, e embriões FAK (-/-) e paxilina (-/-) não passam do período gestacional. Sendo assim, aguardamos o desenvolvimento de bloqueadores específicos para uma melhor descrição do papel dessas proteínas na VILI.

Quanto às imagens obtidas por microscopia eletrônica, podemos observar algumas alterações sugestivas de uma tentativa de organização do citoesqueleto frente às tensões da ventilação mecânica. As *zonula adherens* estão mais evidentes no grupo AV em relação aos outros, com os microfilamentos de actina mais visíveis



(figura 16 a 19). Interessante observar a figura 19, que demonstra fraturas na membrana plasmática das células presentes no septo alveolar decorrente da ventilação mecânica. Gajic e colaboradores demonstraram em um modelo experimental que os pulmões submetidos a altos  $V_t$  apresentam alterações reversíveis na membrana plasmática<sup>90</sup>. Porém, essas fraturas transitórias na membrana podem desencadear uma sinalização intracelular via c-fos e NF- $\kappa$ B e mediar parte da mecanotransdução de forma independente do citoesqueleto<sup>91</sup>. Seu impacto real ainda merece melhor avaliação<sup>41</sup>.

## **6. Conclusões:**

1. A ventilação mecânica com altos volumes correntes promove lesão pulmonar com infiltrado neutrofílico numa relação dose-dependente.
2. A ventilação com alto volume corrente promove fosforilação da FAK.
3. A ventilação com alto volume corrente promove fosforilação da paxilina;
4. Alterações no citoesqueleto em modelo *in vivo* de VILI são possíveis de serem descritas utilizando-se de métodos de microscopia confocal, Western Blot e microscopia eletrônica.

## **7. Referências**

1. Hubmayr RD, Irwin RS. Mechanical Ventilation: Initiation. In: Irwin RS, Cerra FB, Rippe JM, editors. *Intensive Care Medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 727-41.
2. Kollef MH. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2004; 32: 1396-405.
3. Pinsky MR. Recent advances in the clinical application of the heart-lung interactions. *Cur Opin Crit Care* 2000; 8: 26-31.
4. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, Belcastro A, Powers SK. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1396-74.
5. Slutsky AS, Whitehead T. The pulmonary physician in critical care – 7: Ventilator induced lung injury. *Thorax* 2002; 57: 635-42.
6. Ricard J-D, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Curt Opin Crit Care* 2002; 8: 12-20.
7. Pinhu L, Whitehead T, Evans T, Griffiths M. Ventilator-induced lung injury. *Lancet* 2003; 361: 332-40.
8. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Eur Resp J* 2003; 22: 2s-9s.
9. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. Lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 294-323.

10. Hurley JV. Types of pulmonary microvascular injury. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 384: 269-86.
11. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressure: protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110: 556-65.
12. Parker JC, Townsley MI, Rippe B. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressure. *J Appl Physiol* 1984; 57: 1809-16.
13. Hernandez LA, Peevey KJ, Moise AA, Parker JC. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* 1989; 66: 2364-68.
14. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999; 116: 9S-15S.
15. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993; 21: 131-43.
16. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. 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: 1159-64.
17. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 550-84.
18. Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GPP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CV. Effect of a ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 347-54.

19. Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1301-8.
20. Santos CC, Slutsky AS. Cellular responses to mechanical stress. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol* 2000; 89: 1645-55.
21. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; 99: 944-52.
22. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 21: L167-L173.
23. Bhattacharya S, Sen N, Yiming MT, Patel R, Parthasarathi K, Quadri S, Issekutz AC, Bhattacharya J. High tidal volume ventilation induces proinflammatory signaling in rat lung endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 218-24.
24. Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AG, Takata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1385-93.
25. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, Glenny RW. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L533-L542.

26. Quinn DA, Moufarrej RK, Volokhov A, Hales CA. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* 2002; 93: 517-25.
27. Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, Verin AD, Garcia JGN. Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L758-L797.
28. Haitisma JJ, Uhlig S, Göggel R, Verbrugge SJ, Lachmman U, Lachmman B. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Intensive Care Med* 2000; 26: 1515-1522.
29. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotraumas to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 482-8.
30. Santos CC, Slutsky AS. Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 2000; 26: 638-42.
31. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, 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: 2104-12.
32. Ricard JD, Breyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1176-80.

33. Dreyfuss D, Ricard JD, Saumon G. On the physiologic and clinical relevance of lung-borne cytokines during ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1467-71.
34. Uhlig S, Ranieri M, Slutsky AS. Biotrauma hypothesis of ventilator-induced lung injury [letter]. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 314-16.
35. Agostoni E. Mechanics of the pleural space. In: Geiger SR, editor. *Handbook of Physiology*. Section 3: The Respiratory System. Volume III: Mechanics of Breathing, Part II. Baltimore: Williams and Wilkins Co.; 1986. pp. 531-59.
36. Mercer RR, Crapo JD. Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. *J Appl Physiol* 1990; 69: 756-65.
37. Oldmixon EH, Hoppin Jr FG. Distribution of elastin and collagen in canine lung alveolar parenchyma. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1941-49.
38. Mercer RR, Laco JM, Crapo JD. Three-dimensional reconstruction of alveoli in the rat lung for pressure-volume relationships. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1480-87.
39. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 1970; 28: 596-608.
40. West JB, Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, Prediletto R. Stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 1991; 70: 1731-42.
41. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1328-42.
42. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4a ed. Nova York: Garland Science; 2002. Cap. 16, p. 907-82: The Cytoskeleton.

43. Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Ann Rev Physiol* 1997; 59: 575-99.
44. Trepap X, Deng L, An, SS, Navajas D, Tschumperlin DJ, Gerthoffer WT, Butler JP, Fredberg JJ. Universal physical responses to stretch in living cell. *Nature* 2007; 447: 592-6.
45. Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260: 1124-7.
46. Gunst SJ, Tang DD, Saez AO. Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 137: 151-68.
47. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4a ed. Nova York: Garland Science; 2002. Cap. 19, p. 1065-125: Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix.
48. Petit V, Thiery JP. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 2000; 92: 477-94.
49. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692: 103-19.
50. Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med* 2003; 31[Suppl.]: S200-S206.
51. Han B, Lodyga M, Liu M. Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 181-7.
52. Liu M, Tanswell AK, Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277: L667-L683.



53. Ichimura H, Parthasarathi K, Quadri S, Issekutz AC, Bhattacharya J. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J Clin Invest* 2003; 111: 691-99.
54. Ali MH, Pearlstein DP, Mathieu CE, Schumacker PT. Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L486-L496.
55. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 116: 1409-16.
56. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, pp125<sup>FAK</sup>, directs SH2-dependent binding of pp60<sup>src</sup>. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1680-8.
57. Schaller MD, Hildebrand JD, Parsons JT. Complex formation with Focal Adhesion Kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src Kinases. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3489-505.
58. Desai LP, Sinclair SE, Chapman KE, Hassid A, Waters CM. High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L769-L778.
59. Brown MC, Turner CE. Paxillin: Adapting to change. *Physiol Rev* 2004; 84: 1315-39.
60. Zaidel-Bar R, Milo R, Kam Z, Geiger B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Biol* 2007; 120: 137-48.

61. Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 2001; 20: 6459-72.
62. Caldini EG. *Manual de técnicas em histologia e biologia celular do laboratório de biologia celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002 [verificado em 07 jun 2002]. Disponível em: <http://www.direxlim.fm.usp.br/download/manualtecnicas.pdf>.
63. Negri EM, Omar ED, Mori SS, Rodrigues NRD, Barbas CSV, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. A simple method for the differential characterization of alveoli and alveolar ducts in injured lungs. *Histol Histopathol* 2005; 20: 449-454.
64. Garippo AL. *Imuno-fluorescência para tecidos*. São Paulo: Faculdade de Medicina, USP; 2002 [verificado em 01 de maio de 2009]. Disponível em: [http://www.direxlim.fm.usp.br/lim\\_pagina.php?mpg=06.00.00&id\\_item=3&regreas=sim](http://www.direxlim.fm.usp.br/lim_pagina.php?mpg=06.00.00&id_item=3&regreas=sim).
65. Hibbs AR. *Confocal microscopy for biologists*. Nova York: Springer Science + Business Media Inc; 2004.
66. Pawley JB. *Handbook of biological confocal microscopy*. Nova York: Springer Science + Business Media Inc; 2006.
67. Curran-Everett D, Benos DJ. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *J Appl Physiol* 2004; 97: 457-59.
68. Curran-Everett D, Benos DJ. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society: the sequel. *Adv Physiol Edu* 2007; 31: 295-98.

69. Field A. *Discovering statistics using SPSS*. London: Sage Publications Ltd; 2005.
70. Olejnik S, Algina J. Generalized Eta and Omega Squared statistics: measure of effect size for some common research designs. *Psychological Methods* 2003; 8: 434-47.
71. Malo J, Ali J, Wood LDH. How does positive end-expiratory pressure reduce intrapulmonary shunt in canine pulmonary edema? *J Appl Physiol* 1984; 57: 1002-10.
72. Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Fontelles MJP. Modelo experimental de choque hemorrágico. *Acta Cir Bras* 2003; 18: 465-70.
73. Kavanagh BP. Perioperative atelectasis. *Minerva Anesthesiol* 2008; 74: 285-7.
74. Veldhuizen RAW, Welk B, Harbottle R, Hearn S, Nag K, Petersen N, Possmayer F. Mechanical ventilation of isolated rat lungs changes the structure and biophysical properties of surfactant. *J Appl Physiol* 2002; 92: 1169-75.
75. Pavone LA, Albert S, Carney D, Gatto LA, Halter JM, Nieman GF. Injurious mechanical ventilation in the normal lung causes a progressive pathologic change in dynamic alveolar mechanics. *Critical Care* 2007; 11: R64-R72.
76. Verbrugge SJC, Böhm SH, Gommers D, Zimmerman LJI, Lachmann B. Surfactant impairment after mechanical ventilation with large alveolar surface area changes and effects of positive end-expiratory pressure. *Br J Anaesth* 1998; 80: 360-4.
77. Wyszogrodski I, Kyei-Aboagye K, Tausch HW, Avery ME. Surfactant inactivation by hyperventilation: conservative by end-expiratory pressure. *J Appl Physiol* 1975; 38: 461-6.

78. Bilek A, Dee KC, Gaver III DP. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway opening. *J Appl Physiol* 2003; 94: 770-83.
79. Chu EK, Whitehead T, Slutsky AS. Effects of cyclic opening and closing at low- and high-volume ventilation on bronchoalveolar lavage cytokines. *Crit Care Med* 2004; 32: 168-74.
80. Suh GY, Koh Y, Chung MP, An CH, Kim H, Jang WY, Han J, Kwon J. Repeated derecruitments accentuate lung injury during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 2002; 30: 1848-53.
81. Caruso P, Meireles SI, Reis LFL, Mauad T, Martins MA, Deheinzelin D. Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1808-11.
82. Dolinay T, Wu W, Kaminski N, Hedigbo E, Kaynar AM, Szilasi M, Watkins SC, Ryter SW, Hoetzel A, Choi AMK. Mitogen-activated protein kinases regulate susceptibility to ventilator-induced lung injury. *PLoS One* 2008; 3: e1601.
83. Staub NC, Nagano H, Pearce ML. Pulmonary edema in dogs, especially the sequence of fluid accumulation in lungs. *J Appl Physiol* 1967; 22: 227-40.
84. Sibilla S, Tredici S, Porro GA, Irace M, Guglielmi M, Nicolini G, Tredici G, Valenza F, Gattinoni L. Equal increases in respiratory system elastance reflect similar lung damage in experimental ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med* 2002; 28: 196-203.
85. Parker JC, Townsley Mary I. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L231-L246.

86. Haies DM, Weibel ER. Morphometric study of rat lung cells: Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell population. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 533-41.
87. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 332-337.
88. Yano Y, Geibel J, Sumpio BE. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am J Physiol* 1996; 271: C635-C649.
89. Damarla M, Hasan E, Boueiz A, Le A, Pae HH, Calypso M, Kolb T, Simms T, Myers A, Kayyali ES, Gaestel M, Peng X, Reddy SP, Damico R, Hassoun PM. Mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2 regulates actin polymerization and vascular leak in ventilator associated lung injury. *PloS One* 2009; 4: e4600.
90. Gajic O, Lee J, Doerr CH, Berrios JC, Myers JL, Hubmayr RD. Ventilator-induced cell wounding and repair in the intact lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1057-63.
91. Grembowicz KP, Sprague D, McNeil PL. Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1247-57.

# 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](#)