

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

LILIANE MARLENE NARDELLI

TAMPONAMENTO DA ACIDOSE HIPERCÁPNICA
MODULA O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO PULMÃO E
ÓRGÃOS À DISTÂNCIA EM MODELO EXPERIMENTAL
DE LESÃO PULMONAR AGUDA

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

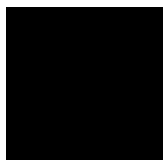
Milhares de livros grátis para download.

LILIANE MARLENE NARDELLI

**TAMPONAMENTO DA ACIDOSE HIPERCÁPNICA
MODULA O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO PULMÃO E
ÓRGÃOS À DISTÂNCIA EM MODELO EXPERIMENTAL
DE LESÃO PULMONAR AGUDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadora: Patrícia Rieken Macedo Rocco



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009**

TAMPONAMENTO DA ACIDOSE HIPERCÁPNICA MODULA O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO PULMÃO E ÓRGÃOS À DISTÂNCIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)

APROVADA POR:

Prof^a. Patricia Rieken Macedo Rocco, Ph.D - Orientadora
Prof^a. Associada, IBCCF^o, UFRJ

Prof^a. Marcelo Einicker Lamas, Ph.D
Prof^a. Adjunto III, IBCCF^o, UFRJ

Prof^a. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, Ph.D
Prof^a. Titular, IBCCF^o, UFRJ

Dr^a. Patrícia Torres Bozza, Ph.D
Pesquisadora Titular, IOC, Fiocruz

Prof^o. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves, Ph.D - Revisora
Prof^o. Adjunto, UFRJ

Rio de Janeiro
Julho de 2009

Nardelli, LM

Tamponamento da acidose hipercápnica modula o processo inflamatório no pulmão e órgãos à distância em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

116 f:Il.

Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, 2009

Orientadora: Patrícia Rieken Macedo Rocco

1. Lesão Pulmonar Aguda, 2. Hipercapnia, 3. Tamponamento, 4. Inflamação. I. Patrícia Rieken Macedo Rocco. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia). III. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ). Durante o período como aluna da pós-graduação, recebeu Bolsa CAPES.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me proteger todos os dias.

Aos meus amados pais, pelo carinho, amor, incentivo permanente ao estudo e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

Ao meu querido e único irmão, pelas palavras sempre de carinho e presença constante na minha vida.

Ao meu amor, companheiro de todos os momentos, pela paciência e tolerância e acima de tudo pelo incentivo. Amo você.

A toda a minha família por tanta admiração, suporte e confiança, em especial a minha vovó Alzira, exemplo de vida para mim.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer a algumas pessoas, em especial, que contribuíram para a realização deste estudo e para muitas das minhas conquistas ao longo deste período.

- Prof^a. Patricia Rocco, minha orientadora, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa. Obrigada pelo incentivo e pela confiança que sempre depositou em mim sem deixar de lado as demonstrações de carinho. Obrigado!
- Prof^a. Cristiane Baez Garcia, minha co-orientadora, pelas discussões sempre relevantes em relação ao estudo.
- A mais nova mamãe Andréia, amiga querida e companheira para todas as horas.
- Ao sempre alegre Johny, colaborador especial deste estudo. Tornou-se um grande amigo, querido companheiro de laboratório.
- Débora, Tatiana e Humberto, pelo brilhante trabalho de toda a biologia molecular deste estudo, e acima de tudo, pela paciência aos meus pedidos de resultados.
- Prof^a. Vera Capelozzi, pela realização da análise da microscopia confocal e apoptose do pulmão e órgãos à distância deste estudo.
- Ao Prof^o. italiano Paolo Pelosi, pela contribuição preciosa e pontual na discussão deste estudo.
- A Prof^a Ana Acácia pela revisão da dissertação. Muito obrigada!
- Mariana Genuíno, Débora Xisto, Caroline Pássaro, Gisele, Soraia, Mariana Antunes, Pedro, Mônica, Cynthia, Carla, Simone, Raquel, grandes companheiros de laboratório.
- André e Jaqueline por sempre nos auxiliar dentro do Laboratório de Investigação Pulmonar e Verônica pelo cuidado com os animais deste estudo no Biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar.

RESUMO

NARDELLI, Liliane Marlene. **Tamponamento da acidose hipercápnica modula o processo inflamatório no pulmão e órgãos à distância em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.** Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco. Resumo de Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Os efeitos da acidose hipercápnica (HC) assim como da acidose hipercápnica tamponada (HCT) sob o pulmão e órgãos à distância são controversos. O presente estudo investigou os efeitos do dióxido de carbono e da acidose hipercápnica tamponada no pulmão, rim, fígado e coração em modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA). Ratos controle (C) (n=18/cada) e com LPA induzida por paraquat foram estudados. Em 24 h, os animais foram anestesiados e ventilados mecanicamente (volume corrente=8ml/kg e PEEP=5cmH₂O). Os grupos C e LPA foram aleatoriamente divididos em 3 subgrupos: normocapnia (NC, PaCO₂ = 35-45 mmHg): ventilados com mistura gasosa de 0.03%CO₂ + 21%O₂ + N₂ balanceado. Hipercapnia (HC, PaCO₂ = 60-70 mmHg): mistura gasosa de 5%CO₂ + 21%O₂ + N₂ balanceado; e hipercapnia tamponada (HCT): ventilado de modo similar ao HC, mas tratado com bicarbonato de sódio. Após 1 h de ventilação mecânica foram mensuradas mecânica e histologia pulmonares (microscopia óptica e confocal), gases arteriais, caspase-3, IL-6, IL1-β e procolágeno do tipo III (PCIII) no pulmão bem como apoptose de células epiteliais no pulmão e órgãos à distância. A mecânica pulmonar foi similar em todos os grupos LPA. O grupo LPA-HC evidenciou maior número de células epiteliais apoptóticas no pulmão, coração, fígado e rim aumentando a expressão de RNAm para caspase-3 e PCIII, e diminuição da expressão de IL-6 e IL1-β quando comparado ao NC. Entretanto, na LPA-HCT, a apoptose de células epiteliais no pulmão e órgãos à distância e a expressão de RNAm para caspase-3 e PCIII foram significativamente reduzidos e IL-6 e IL1-β apresentou um decréscimo ainda maior em relação a LPA-HC. Em conclusão, no presente modelo de LPA: a) a hipercapnia aumentou número de células epiteliais apoptóticas no pulmão bem como a expressão de caspase-3 e PCIII; e b) hipercapnia tamponada reduziu a apoptose do pulmão e órgãos distais e a expressão de RNAm para PCIII no pulmão.

Palavras-chave: lesão pulmonar aguda, hipercapnia, tamponamento.

Rio de Janeiro
Julho 2009.

ABSTRACT

NARDELLI, Liliane Marlene. **Buffering of the acidosis induced by hypercapnia modulates the inflammatory process in lung and distal organs in experimental acute lung injury**. Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco. Resumo de Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Protective effects of hypercapnic acidosis (HCA) as well as buffering HCA on lung and distal organs are controversial. We investigated the effects of inspired carbon dioxide and buffering HCA on lung, kidney, liver, and heart in experimental acute lung injury (ALI). Healthy (C) and paraquat-induced ALI rats (n=18/each) were studied. At 24 h, animals were anesthetized and mechanically ventilated (VT=8ml/kg and PEEP=5cmH₂O). C and ALI groups were further randomized into 3 subgroups: normocapnia (NC, PaCO₂=35-45mmHg): ventilated with a gas mixture of 0.03%CO₂ + 21%O₂ + balance N₂; Hypercapnia (HC, PaCO₂=60-70 mmHg): gas mixture of 5%CO₂ + 21%O₂ +balance N₂; and buffered hypercapnia (HCT): ventilated similar to HC, but treated with sodium bicarbonate. After 1 h mechanical ventilation, lung mechanics and histology (light and confocal microscopy), gas-exchange, caspase-3, IL-6, IL1- β and type III procollagen mRNA (PCIII) expression in lung tissue (RT-PCR) as well as pulmonary and distal organ apoptosis were measured. Lung mechanics were similar in all ALI groups. ALI-HC group showed higher lung, heart, and kidney epithelial cell apoptosis, increased PCIII and caspase-3 mRNA expressions, and lower IL-6 and IL-1 compared to NC. Conversely, in ALI-HCT, epithelial cell apoptosis in lung and distal organs and PCIII and caspase-3 mRNA expressions were significantly reduced and IL-6 and IL-1 presented a further decrease in relation to ALI-HC. In conclusion, in the present ALI model: a) hypercapnia increased epithelial cell apoptosis and type III procollagen mRNA expression in lung tissue while attenuating IL-6 and IL1- expression; and b) buffering hypercapnia reduced lung and distal organ apoptosis and type III procollagen mRNA expression in lung.

Key words: acute lung injury, hypercapnia, buffering.

Rio de Janeiro
Julho 2009.

SUMÁRIO

Folha de rosto	ii
Folha de aprovação	iii
Ficha catalográfica	iv
Agências financiadoras	v
Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Sumário	x
Índice de figuras	xii
Índice de tabelas	xiii
Abreviaturas	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo / lesão pulmonar aguda	2
1.2. Patogênese e fisiopatologia da SDRA/LPA	4
1.3. Mediadores inflamatórios na LPA	8
2. VENTILAÇÃO MECÂNICA E A ESTRATÉGIA PROTETORA	10
3. HIPERCAPNIA	12
3.1. Definição	12
3.2. Transporte de gás carbônico	12
3.3. O CO ₂ e a ventilação	15
3.4. Efeitos do CO ₂	16
3.4.1. Efeitos da hipercapnia sobre o pulmão	16
3.4.2. Efeitos da hipercapnia no diafragma	17
3.4.3. Efeitos da hipercapnia no sistema cardiovascular	18
3.4.4. Efeitos da hipercapnia no sistema nervoso central	18
3.4.5. Efeitos da hipercapnia sobre o rim	18
3.5. Hipercapnia e a modulação da resposta inflamatória	19
3.6. Modelo de indução de hipercapnia	20
3.7. Tamponamento da acidose	21
4. JUSTIFICATIVA	24
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo geral	28
5.2. Objetivos específicos	28
6. MATERIAIS E MÉTODOS	29
6.1. Animais utilizados	30
6.2. Caracterização dos grupos experimentais	30
6.3. Preparação dos animais	32
6.4. Mecânica pulmonar	35
6.5. Remoção dos pulmões	39
6.6. Estudo da histologia e morfometria pulmonares	39
6.6.1. Microscopia óptica	39
6.6.1.a Fixação e preparo das lâminas	39
6.6.1.b Análise histológica e morfométrica	40
6.7. Estudo da apoptose	41
6.7.1. Remoção e preparo dos órgãos	41
6.7.2. Detecção <i>in situ</i> de células apoptóticas	42
6.8. Estudo da biologia molecular	43
6.8.1. Extração de RNA total	43

6.8.2. PCR em tempo real	44
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
8. RESULTADOS	46
8.1. Variáveis hemodinâmicas e gasométricas	47
8.2. Mecânica pulmonar	49
8.3. Histologia pulmonar	50
8.3.1. Morfometria pulmonar	50
8.3.2. Tipos celulares	54
8.4. Citocinas pró-inflamatórias	55
8.5. Apoptose pulmonar e de órgãos à distância	56
8.5.1. Expressão do RNAm para caspase-3 no pulmão	56
8.5.2. TUNEL no pulmão e órgãos à distância	56
8.6. Expressão do RNAm para prócolágeno do tipo III (PCIII)	60
9. DISCUSSÃO	61
10. CONCLUSÃO	73
11. PERSPECTIVAS FUTURAS	75
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Figura 1.	Definição da lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)	3
Figura 2.	Causas da LPA/SDRA	5
Figura 3.	CO ₂ e a respiração celular	13
Figura 4.	Transporte de CO ₂ das células do organismo para o pulmão	14
Figura 5.	CO ₂ e a curva de dissociação de hemoglobina	16
Figura 6.	Estudos em modelos <i>in vivo</i> de lesão pulmonar aguda	22
Figura 7.	Desenho experimental	31
Figura 8.	Escala temporal do protocolo experimental	33
Figura 9.	Teste de oclusão	35
Figura 10.	Método de oclusão ao final da inspiração	36
Figura 11.	Montagem experimental	38
Figura 12.	Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos	40
Figura 13.	Elastância estática do pulmão (Est, L)	50
Figura 14.	Morfometria pulmonar	51
Figura 15.	Fotomicrografias do parênquima pulmonar dos animais do grupo C que receberam salina e do grupo LPA que receberam 15mg/kg de paraquat	53
Figura 16.	Nível de citocinas próinflamatórias IL1- β e IL-6 avaliadas pelo método PCR em tempo real, nos animais controle que receberam salina e lesão pulmonar aguda que receberam 15mg/kg de paraquat	55
Figura 17.	Nível de Caspase-3 no tecido pulmonar dos animais controle que receberam salina e com lesão pulmonar aguda que receberam 15mg/kg de paraquat	56
Figura 18.	Fotomicrografias representativas das células epiteliais pulmonares dos animais do grupo controle e LPA	58
Figura 19.	Fotomicrografias representativas das células renais dos animais do grupo controle e LPA	58
Figura 20.	Fotomicrografias representativas das células hepáticas dos animais do grupo controle e LPA	59
Figura 21.	Fotomicrografias representativas das células intestinais dos animais do grupo controle e LPA	59
Figura 22.	Expressão de RNAm para procolágeno tipo III (PCIII)	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros da gasometria arterial	49
Tabela 2.	Percentual de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares	54

(MN) e de células totais (TOT) em pulmões de ratos do grupo C e LPA

Tabela 3.	Escore de apoptose nas células epiteliais do pulmão, rim, fígado e intestino obtido pela técnica TUNEL nos animais C que receberam salina (i.p.) e LPA que receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.).	57
------------------	--	----

ABREVIATURAS

- ΔP : Variação de pressão

- ΔP_{tr} : Variação de pressão traqueal
- ΔP_{es} : Variação de pressão esofageana
- ASA: Análise do sangue arterial
- BALF: Fluido do lavado broncoalveolar
- BE: Excesso de base
- C: Grupo Controle
- cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar ou DNA complementar
- DAPI: 4'6 diamidino - 2 fenilindole e PI: *iodeto* de propídio
- DEPC: Dietilpirocarbonato
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- dUTP: Trifosfato de deoxiuridina
- Est,L: Elastância estática do pulmão
- FC: Frequência cardíaca
- FiO_2 : Fração inspirada de oxigênio
- FR: Frequência respiratória
- GAPDH: enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase
- HC: Hipercapnia ou acidose hipercápnica
- HCT: Hipercapnia tamponada ou acidose hipercápnica tamponada
- ICAM-1: Molécula 1 de adesão intercelular
- I:E: Relação inspiração: expiração
- IL: Interleucina (1, 1α , 1β , 6, 8, 10 e 13)
- IL-1ra: Receptores agonistas de interleucina 1
- LPA: Lesão pulmonar aguda
- MEC: Matriz extracelular
- MIGET: Técnica de eliminação múltipla de gás inerte
- MN: Células mononucleares
- NAD: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
- NC: Normocapnia
- $NADH_2$: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo ligada aos íons hidrogênio
- NF- κ B: Fator de necrose – Kappa B
- NV: Animal não-ventilado

- PAM: Pressão arterial média
- PCI: procolágeno do tipo I
- PCIII: procolágeno do tipo III
- PI: Pneumócito do tipo I
- PII: Pneumócito tipo II
- PaCO₂: Pressão parcial arterial de dióxido de carbono
- PaO₂: Pressão parcial arterial de oxigênio
- PaO₂/FiO₂: relação entre a pressão parcial arterial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio
- PEEP: Pressão positiva no final da expiração
- Pel: Pressão de recolhimento elástico
- Pes: Pressão esofageana
- Pi: Ponto de inflexão
- PL: Pressão transpulmonar
- Pmax: Pressão máxima alcançada na traquéia
- PMN: Células polimorfonucleares
- Ppl: Pressão intrapleurar
- Ptr: Pressão traqueal
- Pw: Pressão da parede torácica
- Req: Resistência do equipamento
- RNAm: ácido ribonucleico mensageiro ou RNA mensageiro
- RT-PCR: Transcrição reversa da reação de cadeia da polimerase
- SDRA : Síndrome do desconforto respiratório agudo
- TdT: Transferase deoxinucleotidil terminal
- TGF-β: Fator de transformação de crescimento beta
- TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
- V': Fluxo aéreo
- V_a: ventilação alveolar
- VCAM-1: Molécula de adesão de célula vascular 1
- V_E: volume minuto ou ventilação minuto
- VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

- V/Q: Relação ventilação/perfusão
- VT: Volume Corrente

Introdução

1.1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO/LESÃO PULMONAR AGUDA

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)/Lesão Pulmonar Aguda (LPA) foi definida como falência respiratória aguda, hipoxemia refratária a terapia com oxigênio, redução da complacência pulmonar e infiltrados pulmonares bilaterais observados nas radiografias de tórax (ASHBAUGH e cols 1967). Em 1994, a Conferência de Consenso entre as Sociedades Americana e Européia de Pneumologia e Terapia Intensiva estabeleceu critérios clínicos, radiológicos e fisiológicos para o diagnóstico de SDRA (BERNARD e cols 1994): 1. Insuficiência respiratória de instalação aguda; 2. Infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax; 3. Relação entre pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2)/fração inspirada de oxigênio (FiO_2) menor ou igual a 200, independentemente do nível de pressão positiva no final da expiração (PEEP) utilizado e 4. Pressão capilar pulmonar menor ou igual a 18 mmHg. Os pacientes cuja relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ se localizasse entre 200 e 300, apresentariam lesão pulmonar aguda (LPA) (Figura 1). Logo, a SDRA é uma forma grave da LPA (BERNARD e cols 1994). Cabe ressaltar que essas definições já sofrem críticas (PHUA e cols 2008) sinalizando algumas inconsistências, já que um paciente que inicialmente é classificado como SDRA pode migrar sua classificação para LPA logo após iniciar a ventilação mecânica com a aplicação de uma PEEP por curta duração ou até mesmo pelo aumento da FiO_2 , sugerindo que essa melhora possa estar relacionada a queda da mortalidade apresentada em muitos estudos (VILLAR e cols 1999; ESTENSSORO e cols 2003; FERGUSON e cols 2004; ABOAB e cols 2006; VILLAR e cols 2007). Nesse contexto, indicadores como PEEP e a FiO_2 vêm sendo sugeridos para serem acrescentados na futura definição de LPA/SDRA (FERGUSON e cols 2004; ABOAB e cols 2006; VILLAR e cols 2007).

Figura 1: Definição da lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)

- **Instalação**
abaixo de 7 dias
- **Hipoxemia grave**
 $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ para LPA
 $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ para SDRA
- **Infiltrados pulmonares bilaterais difusos ao RX de tórax**
consistente com edema pulmonar
pode ser desigual e assimétrico
efusão pleural pode estar presente
- **Ausência de hipertensão atrial esquerda**
pressão capilar pulmonar ≤ 18 mmHg

(adaptado de Wheeler e Bernard, 2007)

A taxa de mortalidade da SDRA perdura alta, em torno de 30 - 40%, apesar das mudanças significativas nas estratégias terapêuticas ventilatórias (SUCHYTA e cols 1992; MILBERG e cols 1995; ZILBERBERG & EPSTEIN 1998; BROCHARD & LEMAIRE 1999; ARDSNET 2000; RUBENFELD 2003; DUBE 2005; ROCCO & ZIN 2005; VILLAR e cols 2006; MANCEBO e cols 2006; MEADE e cols 2008; MERCAT e cols 2008). A SDRA é cerca de 5 vezes mais freqüente que a LPA e tem quase o dobro da mortalidade (BRUN-BUISSON e cols 2004). Além disso, a SDRA/LPA é um importante problema de saúde pública, nos Estados Unidos, com mais de 100.000 casos por ano, e, por conta disso, existe um gasto diário muito alto nos hospitais e unidades de terapia intensiva (RUBENFELD e cols 2005). A partir do estudo realizado em 2.451 pacientes cadastrados no estudo multicêntrico controlado randomizado do ARDSNetwork entre 1996 a 2005, pode-se extrair algumas conclusões: (1) a mortalidade foi maior para os pacientes que receberam altos volumes correntes comparado com aqueles ventilados com baixo volume; (2) a maior causa de lesão pulmonar aguda foi a pneumonia seguida pela sepse e a

aspiração; e (3) a mortalidade foi de 35% em 1996-1997 e diminuiu durante cada período subsequente a uma baixa de 26% em 2004-2005 (ERICKSON e cols 2009).

Clinicamente, existe considerável heterogeneidade no prognóstico desses pacientes. Alguns se recuperam do grave edema pulmonar nos primeiros sete dias, sem progredir para a fase subaguda ou crônica. Entretanto, há pacientes que seguem para a fase subaguda, que se desenvolve entre cinco a sete dias após o início da SDRA/LPA. Naqueles em que a falência respiratória persiste por até quatorze dias, pode ocorrer uma transição gradual para a fase crônica, com baixa complacência e aumento do espaço morto alveolar (MEDURI 1997; ARTIGAS e cols 1998). Não se sabe por que alguns pacientes com SDRA/LPA resolvem rapidamente a inflamação aguda, enquanto outros progridem para a fase crônica. O mistério é que as mudanças histológicas da fibroproliferação podem ser vistos em alguns pacientes em dias, mas não aparece nos outros por semanas (WHEELER & BERNARD 2007).

1.2. PATOGÊNESE E FISIOPATOLOGIA DA SDRA/LPA

A SDRA/LPA pode ser dividida em direta, primária ou pulmonar onde a lesão primária é no epitélio alveolar e indireta, secundária ou extrapulmonar que resulta de uma resposta inflamatória sistêmica lesando primariamente o endotélio capilar (Figura 2). A SDRA/LPA apresenta grande morbidade podendo evoluir para Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas. Pacientes com SDRA usualmente mostram sinais de taquipnéia ou dispnéia e apresentam doenças subjacentes que promovem intensa resposta inflamatória (BURLESON & MAKI 2005).

Figura 2: Causas de LPA/SDRA

• Lesão Direta - Pneumonia - Aspiração Gástrica - Afogamento - Embolia gordurosa ou por fluido amniótico - Contusão pulmonar - Hemorragia alveolar - Inalação de fumaça de cigarro e gás tóxico - Reperfusão • Lesão Indireta - Sepse - Transfusões - Choque - Pancreatite
--

(adaptado de Wheeler e Bernard, 2007)

Classicamente, a SDRA/LPA pode apresentar três fases: exudativa, proliferativa e fibrótica. A fase aguda da SDRA/LPA, também chamada de fase exudativa, apresenta duração de 3 a 5 dias, e há excessiva resposta inflamatória com ativação dos macrófagos alveolares e recrutamento e ativação dos neutrófilos, culminando com o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar levando ao extravasamento de água, proteínas, hemácias e células inflamatórias além de trombose microvascular, o que determina o edema intersticial e alveolar. Os neutrófilos são encontrados cada vez mais durante a fase inicial em capilares, tecido intersticial e, progressivamente, dentro das vias aéreas (WEILAND e cols 1986). Observam-se ductos alveolares dilatados, alvéolos congestionados, edemaciados e colapsados, além de congestão capilar, edema intersticial e hemorragia intra-alveolar. Esses achados histológicos são evidenciados na radiografia de tórax como infiltrados bilaterais que não diferem daqueles observados no edema pulmonar cardiogênico (ABERLE e cols 1988), enquanto na análise da tomografia

computadorizada de tórax observam-se áreas de consolidação e atelectasias, que são mais predominantes no pulmão dependente (GATTINONI e cols 1994; GOODMAN 1996; GATTINONI e cols 2005; GATTINONI e cols 2006).

A fase aguda ou exudativa pode se resolver ou progredir para a fase proliferativa que é caracterizada pela organização do exudato e por fibrose (BACHOFEN & WEIBEL 1982; TOMASHEFSKI 1990; GRIFFITHS & EVANS 1995; MATSUBARA e cols 1995). Há persistência da hipoxemia, diminuição da complacência pulmonar, aumento do espaço morto e hipertensão pulmonar (PIANTADOSI & SCHWARTZ 2004). Com isso, torna-se necessário maior ventilação minuto (V_E), aumento da pressão das vias aéreas, FiO_2 elevada e aumento da pressão positiva expiratória final (PEEP) para manter em níveis toleráveis as pressões parciais arteriais de oxigênio e de dióxido de carbono no sangue. Radiologicamente observa-se opacidade linear consistente com o desenvolvimento de tecido fibrótico. Na tomografia computadorizada pode-se perceber espessamentos intersticiais difusos e sangramentos (GATTINONI e cols 1994). O exame patológico do pulmão mostra fibrose com deposição de colágeno, inflamação aguda e crônica e resolução incompleta do edema (ANDERSON & THIELEN 1992). Do ponto de vista microscópico nota-se fibrose intersticial com proliferação de pneumócitos tipo II (PII), obstrução e destruição de partes da microcirculação pulmonar (ZAPOL e cols 1979; FUKUDA e cols 1987). Além disso há queda na concentração de proteínas anticoagulantes (proteína C e proteína S) e aumento na expressão de proteínas pró-coagulantes (fatores teciduais) e proteínas antifibrinolíticas (inibidor 1 do ativador do plasminogênio) (GUNTHER e cols 2000; Idell 2003). O pulmão permanece pesado e sólido, e microscopicamente a integridade da arquitetura pulmonar torna-se mais desarranjada. O espaço intersticial

fica dilatado, há necrose do pneumócito tipo I (PI), áreas da membrana basal do epitélio estão expostas e o lúmen alveolar fica preenchido com leucócitos, células vermelhas, fibrinas e restos de células. Os fibroblastos tornam-se aparentes no espaço intersticial e mais tarde no lúmen alveolar. Todo esse processo resulta em um estreitamento extremo ou em uma obstrução uniforme das vias aéreas. Os restos de células e de fibrina são progressivamente substituídos por fibras de colágeno (BELLINGAN 2002).

Já na fase fibrótica, observa-se deposição de fibras colágenas nos espaços alveolares e intersticiais e desenvolvimento de microcistos (SOUZA e cols 2003; ROCCO e cols 2004). A rede vascular é desarranjada com estreitamento dos vasos e fibrose na parede. O exudato alveolar se organiza com deposição de fibrinogênio em áreas de membrana hialina, fibronectina em áreas de fibrose intra-alveolar e queratina no epitélio alveolar, glândulas brônquicas e mesotélio (FUKUDA e cols 1987).

Inicialmente, acreditava-se que a fase proliferativa ocorria ao término da primeira semana, entretanto, vários autores observaram aumento de miofibroblastos além de pró-colágeno tipos I e III na fase precoce da SDRA, sugerindo que a fase proliferativa se iniciava juntamente com a exudativa (MARSHALL e cols 2000; ROCCO e cols 2001; 2003, SANTOS e cols 2006, ROCCO E PELOSI 2008).

O fluido do lavado broncoalveolar (BALF) vem sendo utilizado para investigar a biologia celular do espaço aéreo na SDRA. O BALF evidencia, na fase mais tardia da lesão, redução no número de neutrófilos e acúmulo de linfócitos e macrófagos (BELLINGAN 2002). Além disso, uma vez que a fibrose é estabelecida, existe aumento do trabalho respiratório, diminuição do volume corrente resultando em retenção de dióxido de carbono (CO₂). A obliteração alveolar e espessamento

intersticial acarretam redução na troca gasosa, o que contribui para a hipoxemia e conseqüente dependência da ventilação mecânica.

O processo fibrótico resulta de uma interação complexa entre fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos migram para a área da lesão fazendo com que eles secretem colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (MEC). Primeiramente, há deposição de colágeno tipo III e, com o progredir da lesão constata-se presença de fibras de colágeno tipo I. Uma vez que as fibras colágenas do tipo I são mais grossas e resistentes, os pulmões tornam-se mais rígidos (ROCCO e cols 2003; ROCCO e cols 2004; MENEZES e cols 2005; SANTOS e cols 2006; PELOSI e cols 2007).

1.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA LPA

A lesão da barreira alvéolo-capilar acarreta grande influxo de células inflamatórias para dentro do pulmão ([DE HEMPTINNE e cols 2008](#)). Tal fato pode ser ocasionado por lesão direta ao epitélio alveolar ou por lesão primária no endotélio pulmonar em função de liberação de mediadores inflamatórios. A infiltração de neutrófilos induz liberação de enzimas, tais como elastases (LEE e cols 1981; WEILAND e cols 1986; CHOLLET-MARTIN e cols 1996; ARMSTRONG & MILLAR 1997; [FUJISHIMA et al 2008](#)), bem como de espécies reativas de oxigênio ([LAMB e cols 1999](#)) contribuindo para a perpetuação da lesão pulmonar (BUCZEK-THOMAS e cols 2004; KUWAHARA e cols 2005). Os macrófagos e linfócitos também são recrutados para o pulmão e produzem grandes quantidades de citocinas pró- (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-13), sendo o balanço dessas citocinas essencial para amplificar e perpetuar a resposta inflamatória local e sistêmica (PARK e cols 2001; STRIETER e cols 2002).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, geralmente em torno dos 30.000 Daltons. TNF- α e IL-1 β são citocinas derivadas predominantemente da ativação dos macrófagos, perpetuando a ativação e extravasamento de neutrófilos (LIN e cols 2003), bem como aumentando a permeabilidade alvéolo-capilar (ALBERTINI 1998). TNF- α , IL-1 β e IL-8 estão elevados no fluido do lavado bronco alveolar (BALF) de pacientes com LPA (AGOURIDAKIS e cols 2002; SUTER e cols 1992). A IL-8 também é responsável pelo influxo de neutrófilos para o pulmão (BAUGHMAN e cols 1996; BHATIA 2002; REUTERSHAN & LEY 2004; PUNNET e cols 2005). Já a IL-6 é produzida por monócitos/macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas (BHATIA e cols 2000; BHATIA 2002; COHEN 2002) perpetuando o processo inflamatório.

Enquanto os neutrófilos são importantes ativadores do processo inflamatório, os fibroblastos são a chave para a resposta proliferativa (CHOLLET-MARTIN e cols 1996; COKER & LAURENT 1998; BELLIGAN 2002). Nesse contexto, se o influxo de neutrófilos for reduzido, a mortalidade reduz significativamente em modelos experimentais de LPA ([HAYAKAWA](#) e cols 2009). O fator de transformação de crescimento (TGF)- β é responsável por ativar fibroblastos induzindo fibrose pulmonar na LPA (BROEKELMANN e cols 1991; GIRI e cols 1993; SYNENKI e cols 2007).

O entendimento da patogênese da LPA é essencial para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica. Nesse contexto, a ventilação mecânica, quando utilizada de forma inadequada, pode perpetuar o processo inflamatório, aumentando a morbimortalidade na LPA/SDRA (DREYFUSS & SAUMON 1993; KALLET e cols 2001).

2. VENTILAÇÃO MECÂNICA E A ESTRATÉGIA PROTETORA

A ventilação mecânica (VM) é uma ferramenta indispensável para manter troca gasosa adequada, restabelecendo a oferta necessária de oxigênio aos órgãos periféricos, bem como para repouso dos músculos respiratórios (TOBIN 2001). Lesões na interface dos capilares alveolares, alterações de permeabilidade e edema têm sido mostrados em animais ventilados com estratégias ventilatórias lesivas (WEBB E TIERNEY 1974; CARLTON e cols 1990; PARKER e cols 1990; FU e cols 1992; DREYFUSS & SAUMON 1993). Como acontece com outras terapias, a ventilação mecânica pode agravar, ou mesmo causar, lesão pulmonar, uma condição referida como lesão pulmonar associada (VALI) ou induzida pelo ventilador (VILI) (BELPERIO e cols 2006).

Pacientes com SDRA ventilados com altos volumes correntes (10-15 ml/kg) são suscetíveis a hiperdistensão alveolar (GATTINONI e cols 1986; ROUPIE e cols 1995) em função da heterogeneidade do parênquima pulmonar.

Nos últimos anos, tornou-se evidente que uma diminuição progressiva do volume corrente (V_T) está associada a uma redução na taxa de mortalidade na LPA/SDRA. O *ARDSNetwork* estudou 861 pacientes com SDRA e constataram redução na mortalidade de 40% para 31% quando a pressão de platô foi limitada em 30 cmH₂O e o volume corrente reduzido de 12 ml/kg para 6 ml/kg. É interessante ressaltar que, os resultados deste estudo não indicam que a ventilação com 6 ml/kg seja segura; eles simplesmente sugerem que este volume implica em um melhor prognóstico. Logo, até o momento, a melhor estratégia ventilatória protetora recomendada é a ventilação com volume corrente baixo (4 a 6 ml/kg) (DRIES & MARINI 2003; ROUBY e cols 2003; MOLONEY & GRIFFITHS 2004; PETRUCCI &

IACOVELLI 2004; GATTINONI e cols 2005, HALTER e cols 2007; CHECKLEY e cols 2008).

Estudos experimentais evidenciaram que se por um lado a ventilação com baixos volumes correntes minimiza as lesões epiteliais e endoteliais alveolares (FRANK e cols 2002) por outro lado pode vir a ser lesiva em função do estresse de cisalhamento relacionado a abertura e o fechamento cíclico de vias aéreas distais, ductos e/ou unidades alveolares (KOLTON e cols 1982; HAMILTON e cols 1983; MCCULLOCH e cols 1988; CORBRIDGE e cols 1990; MUSCEDERE e cols 1994; SANDHAR e cols 1998; KALLET e cols 2001). Em estudo recente, Thammanomai e colaboradores mostraram grave comprometimento da função pulmonar com aumento na taxa de mortalidade em camundongos ventilados com baixos volumes independente dos níveis de PEEP (THAMMANOMAI e cols 2007). Por outro lado, Halter e colaboradores demonstraram redução na instabilidade alveolar, aumento na oxigenação e redução da lesão pulmonar em animais ventilados com baixos volumes e alto PEEP (HALTER e cols 2007). Nesse contexto, a PEEP previne o dano alveolar difuso por estabilizar as unidades distais e manter o recrutamento por todo o ciclo ventilatório (WEBB & TIERNEY 1974).

Entretanto, a ventilação com baixos volumes pode acarretar aumento na pressão parcial arterial de dióxido de carbono, fenômeno denominado de hipercapnia permissiva (HICKLING e cols 1990). A hipercapnia acarreta vasoconstrição e hipertensão pulmonar, arritmia cardíaca, e vasodilatação cerebral levando a um aumento da pressão intracraniana (ROTTA & STEINHORN 2006; MALHOTRA 2007). Entretanto, dados experimentais têm sugerido que a hipercapnia pode vir a ser benéfica (KAVANAGH & LAFFEY 2006).

3. HIPERCAPNIA

3.1. Definição

Hipercapnia deriva do prefixo grego hyper-, que significa excesso; e kapnos que significa fumar (já que o CO_2 é um dos componentes do cigarro). Logo, a hipercapnia é caracterizada pela presença de dióxido de carbono em excesso no sangue.

Pacientes ventilados mecanicamente com baixos volumes apresentam hipercapnia e acidose respiratória. Durante anos, a acidose hipercápnica foi tratada com bicarbonato de sódio, sendo recomendado seu uso pela ARDSNet que descreve a importância do tamponamento da acidose e da correção parcial da hipercapnia como potencial mecanismo para a sobrevivência dos pacientes com SDRA/LPA (ARDSNET 2000).

3.2. Transporte de gás carbônico

A ventilação tem como função eliminar o dióxido de carbono (CO_2), que é o produto da respiração celular aeróbica (Figura 3).

A respiração celular aeróbica envolve um processo de quebra gradual da molécula de glicose para liberação da energia que nela se encontra armazenada. Esse processo ocorre em três etapas: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa. A glicólise ocorre no citoplasma, já o ciclo de Krebs (matriz mitocondrial) e a cadeia transportadora de elétrons (crista mitocondrial) acontecem dentro da mitocôndria pois necessitam da presença de oxigênio.

Durante o ciclo de Krebs, todo o carbono responsável pela formação do acetil é degradado em CO_2 que é liberado pela célula, caindo na corrente sanguínea.

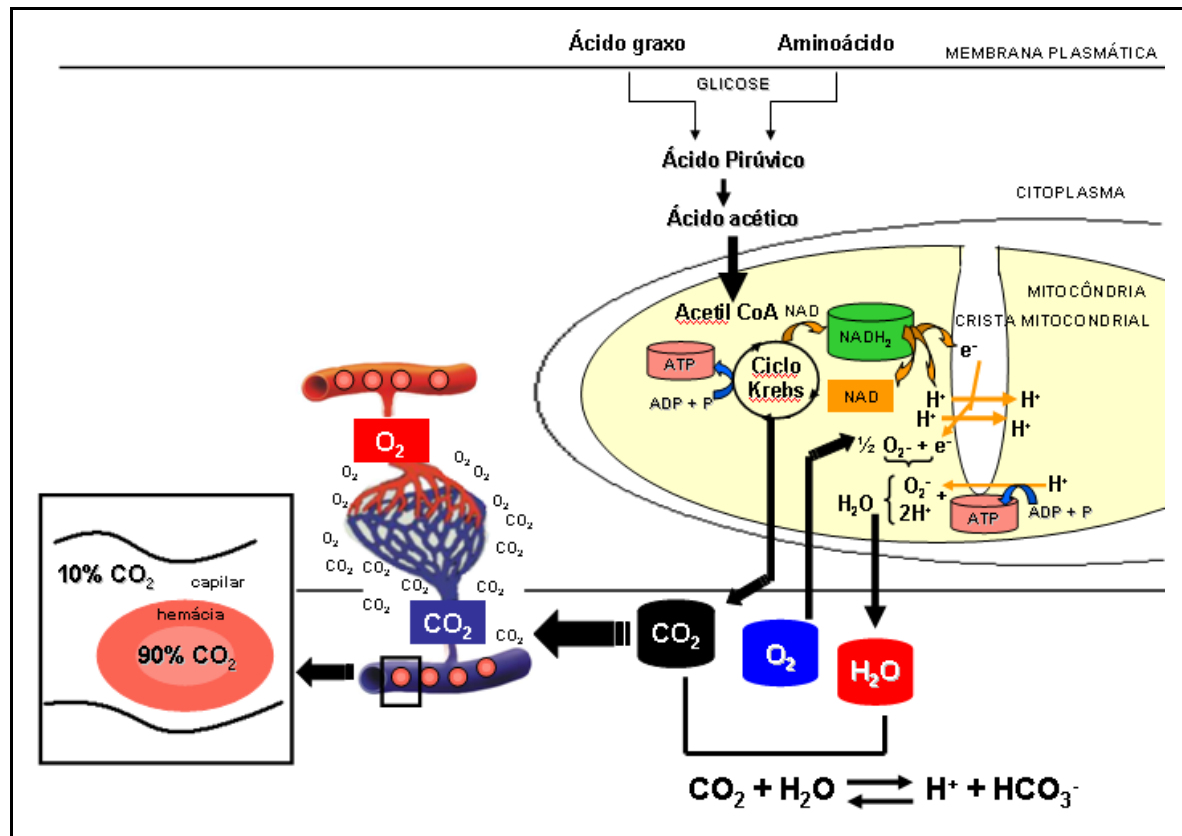


FIGURA 3: CO_2 e a respiração celular. O CO_2 é um dos produtos finais da respiração celular. A captação de CO_2 produzido pelas células e seu transporte até o pulmão, onde participa da troca gasosa, é feito pelo sangue. Uma pequena parte do CO_2 proveniente das células (10%) está dissolvida no plasma e a maior parte (90%) penetra nas hemácias. O CO_2 reage com a H_2O formando o ácido carbônico que se dissocia rapidamente formando os íons HCO_3^- e H^+ . Quando essa reação acontece dentro da hemácia há a presença da enzima anidrase carbônica que catalisa essa reação.

O CO_2 é transportado pelo sangue aos pulmões sob a forma dissolvida, como íons bicarbonato (HCO_3^-), carbamino-hemoglobina e outros compostos carbamínicos (Figura 4). Uma pequena parte do CO_2 proveniente das células (10%) está dissolvida no plasma e a maior parte (90%) penetra nas hemácias. Dentro das hemácias, o CO_2 se combina com a água formando ácido carbônico que se dissocia em H^+ e HCO_3^- . Ao contrário do plasma, essa reação química dentro da hemácia é catalisada pela anidrase carbônica.

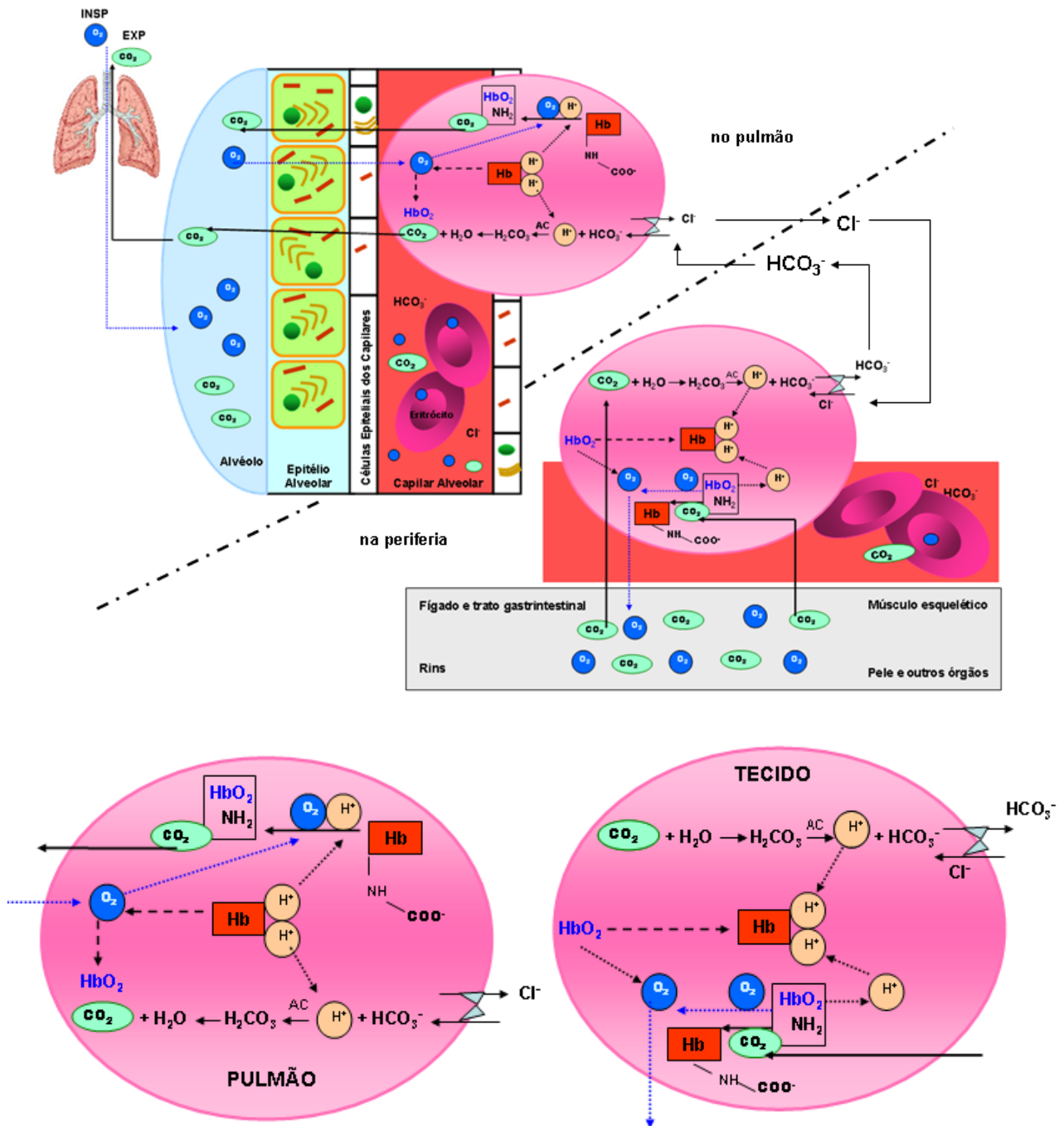


FIGURA 4: Transporte de CO_2 das células do organismo para o pulmão. Tanto na periferia quanto no pulmão, a maior parte do transporte do CO_2 se dá dentro do eritrócito com a presença da anidrase carbônica. Na periferia do organismo, o CO_2 se difunde para o interior dos capilares vizinhos. Nos capilares pulmonares, todas as reações ocorrem no sentido inverso dos capilares da periferia. Na periferia, a oxihemoglobina (HbO_2) se dissocia em hemoglobina reduzida (Hb) e O_2 . A Hb tampona os íons H^+ liberados da reação do CO_2 com a H_2O e o H^+ liberado da reação dos compostos carbamínicos, já o O_2 é liberado para os tecidos e órgãos periféricos (seta azul). Nos capilares pulmonares, a hemoglobina reduzida (Hb) se dissocia dos íons H^+ e se liga ao O_2 formando a oxihemoglobina (HbO_2). A reoxigenação da Hb nos pulmões é facilitada pela intensa liberação dos íons H^+ que serão necessários nas reações com o íon bicarbonato e com os compostos carbamínicos. Cerca de $\frac{3}{4}$ do HCO_3^- sai do eritrócito na periferia através de um antiporte de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (desvios de cloreto) e o mecanismo inverso ocorre nos eritrócitos dos capilares pulmonares. HbO_2 : oxihemoglobina; Hb: hemoglobina reduzida; AC: anidrase carbônica; EXP: expiração; INSP: inspiração.

3.3. O CO₂ e a ventilação

Normalmente, a ventilação alveolar é ajustada para manter a PaCO₂ em torno de 35-45 mmHg. Quando ventilação alveolar é aumentada (hiperventilação) ou diminuída (hipoventilação) em relação à produção de CO₂, existe um distúrbio ácido-base respiratório (Figura 5). A hipercapnia ocorre em função do CO₂ produzido, eliminado e em alguns casos do CO₂ inspirado (KAVANAGH & LAFLEY 2006). Entretanto, a redução da ventilação alveolar diminuindo o CO₂ eliminado é a causa mais comum de elevação do CO₂.

Com a produção de CO₂ constante, o nível do CO₂ arterial (e então alveolar) determina a necessidade para a ventilação alveolar como mostra a equação:

$$KVCO_2 = PaCO_2 V_a$$

onde:

K é uma constante, VCO₂ é o CO₂ eliminado, PaCO₂ é o CO₂ alveolar e V_a é a ventilação alveolar.

A hipercapnia acarreta o deslocamento para direita da curva de dissociação de hemoglobina (Figura 5) aumentando a liberação de oxigênio nos tecidos (efeito Bohr) (BOYNTON & HAMMOND 1994). A PaCO₂ é ajustada pelos quimioceptores centrais e periféricos. Quando a eliminação de CO₂ é insuficiente em relação à taxa de produção dos tecidos, a PaCO₂ aumenta, assim como a concentração de H⁺ e HCO₃⁻ de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$-\log [H^+] = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

onde:

$-\log [H^+] = \text{pH}$

$\text{pK} = \text{constante}$

$[\text{HCO}_3^-] = \text{concentração de íons bicarbonato}$

$[\text{CO}_2] = \text{concentração de dióxido de carbono}$

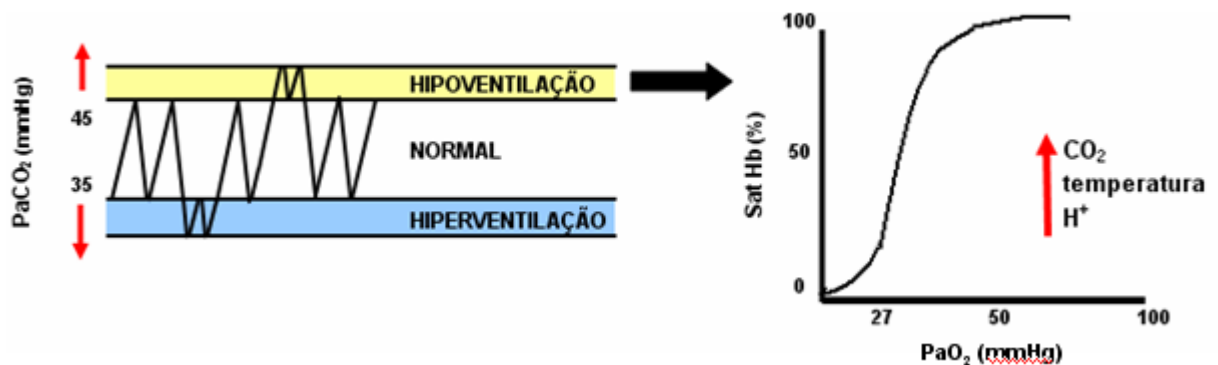


FIGURA 5: CO_2 e a curva de dissociação de hemoglobina. O PaCO_2 normal é mantido entre 35 – 45 mmHg. Quando ocorre um aumento na PaCO_2 acima de 45 mmHg, com diminuição na ventilação alveolar, há hipoventilação. Esse mesmo aumento no CO_2 , juntamente com o aumento da temperatura e da concentração de H^+ provoca o deslocamento da curva de dissociação de oxigênio para direita, o que significa maior liberação de O_2 .

3.4. Efeitos do CO_2

3.4.1. Efeitos da hipercapnia sobre o pulmão

Os efeitos da hipercapnia na complacência pulmonar são controversos (KAVANAGH & LAFFEY 2006). Entretanto, a hipercapnia leva a pequena redução na PaO_2 (causado pelo aumento no CO_2 alveolar, que pode ser superado pelo discreto aumento na fração inspirada de oxigênio), redução no transporte de oxigênio do sangue arterial (deslocamento para direita da curva de dissociação de O_2 , aumento na resistência vascular pulmonar e um aumento no trabalho respiratório (CARLO 2007)).

Através da equação do gás alveolar podemos prever o quanto a hipercapnia reduz a pressão alveolar de O_2 :

$$P_{AO_2} = FiO_2 (P_B - 47) - (PaCO_2/R)$$

onde:

P_{AO_2} é a tensão de O_2 alveolar; P_B é a pressão barométrica e R é o quociente respiratório. Bidani e colaboradores combinaram a equação do gás alveolar relacionando a PCO_2 ao ventilação-minuto, de modo que foi produzida a seguinte expressão (BIDANI e cols 1994):

$$P_{AO_2} = FiO_2 (P_B - 47) - (V'CO_2/R)$$

3.4.2. Efeitos da hipercapnia no diafragma

A hipercapnia parece ser deletéria na junção neuromuscular, diminuindo a tensão diafragmática e alterando a composição da fibra muscular (BEEKLEY e cols 2004).

Existem duas situações de acidose hipercápnica que são encontradas em pacientes com falência respiratória aguda nas unidades de terapia intensiva. A primeira é observada em pacientes comatosos expostos a uma hipercapnia aguda e de curta duração (HAN e cols 2003; GUPTA & HAYDOCK 2004) e a segunda é observada nos pacientes ventilados mecanicamente com estratégia protetora (HICKLING e cols 1994; HICKLING e cols 1998; HICKLING 2002). Estudos recentes têm demonstrado a acidose hipercápnica de curta duração (6 h de ventilação mecânica+hipercapnia) diminuiu a força contrátil do diafragma em 25-30% e 60 minutos após cessada a hipercapnia essas alterações ainda persistem, ou seja, a força contrátil do diafragma após exposição à acidose hipercápnica não retorna ao normal (80% dos valores basais) (JABER e cols 2008).

3.4.3. Efeitos da hipercapnia no sistema cardiovascular

A hipercapnia reduz a contratilidade cardíaca e do músculo liso. Entretanto, há situações onde há estimulação simpática com aumento da frequência cardíaca, vasodilatação sistêmica resultando em elevação do débito cardíaco (CULLEN & EGER 1974). Em pacientes com SDRA, o aumento agudo na PaCO_2 para 80 mmHg foi associado com a diminuição na resistência vascular sistêmica e o aumento do débito cardíaco em adição à depressão da contratilidade do miocárdio e elevação da pressão arterial média (MCINTYRE e cols 1994; WEBER e cols 2000). Contrariamente, a redução do volume corrente para aumentar o CO_2 a níveis mais modestos não foi associado com qualquer mudança hemodinâmica ou alteração na cinética de O_2 .

3.4.4. Efeitos da Hipercapnia no sistema nervoso central

A hipercapnia aguda eleva a pressão intracraniana, principalmente por vasodilatação cerebral e aumento do volume sanguíneo cerebral. Pode causar vasodilatação das arteríolas cerebrais pré-capilares e, nesse contexto, parece que a acidose é mais importante que os níveis de CO_2 (NAKAHATA e cols 2003). Níveis elevados de CO_2 também podem causar efeitos sedativos (narcose pelo CO_2) (TASKER & PETERS 1998).

3.4.5. Efeitos da hipercapnia sobre o rim

Em uma acidose hipercápnica sustentada, os rins iniciam uma rede de reabsorção compensatória de bicarbonato de sódio, geralmente retornando o pH para níveis fisiológicos dentro de 2 dias (CARVALHO e cols 1997). A perfusão renal sofre grande influência porque a PaCO_2 tem correlação inversa com o fluxo

sanguíneo renal (STONE e cols 1958; ANAND e cols 1992; HOWES e cols 1995). A hipercapnia pode reduzir o fluxo sanguíneo renal através de mecanismos diretos como a vasoconstrição renal (KILBURN & DOWELL 1971) e indiretos como a diminuição da resistência vascular sistêmica (WEINBERGER e cols 1989; MACNEE 1994).

3.5. Hipercapnia e a modulação da resposta inflamatória

No recrutamento de leucócitos para os locais de infecção, os macrófagos que encontram microorganismos produzem citocinas, tais como TNF- α e IL-1, que ativam as células endoteliais de vênulas vizinhas a fim de produzirem selectinas, ligantes de integrina e quimiocinas. Posteriormente ocorre o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio mediado por selectinas e aumento na afinidade das integrinas mediado por quimiocinas seguido da adesão estável dos leucócitos ao endotélio. Em paralelo com a ativação das integrinas, as citocinas também aumentam a expressão endotelial de integrinas, principalmente das moléculas de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Um sinal quimiotático induz os leucócitos a migrarem através do endotélio. O acúmulo dos leucócitos nos tecidos é um componente importante da inflamação (ABBAS e cols 2008).

A acidose hipercápnica modula a expressão de moléculas de adesão, que são necessárias para auxiliar na passagem dos neutrófilos pela superfície vascular durante a inflamação (SERRANO e cols 1996). Além disso, a hipercapnia suprime a expressão de IL-8, inibe a ativação do NF- κ B induzido por endotoxinas (TAKESHITA e cols 2003), bem como reduz a infiltração (COAKLEY e cols 2002a; SINCLAIR e cols 2002; LAFFEY e cols 2004) e ativação neutrofílica (HACKAM e cols 1996). Entretanto, há estudos que descrevem que a hipercapnia aumenta a resposta

neutrófila tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contribuindo para a lesão pulmonar (Liu e cols 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que a hipercapnia acarreta efeitos antioxidantes (REHNCRONA e cols 1989). Nesse contexto, a produção de superóxidos é diminuída com um pH ácido (SIMCHOWITZ & ROOS 1985; LEBLEBICIOGLU e cols 1996).

3.6. Modelos de Indução de hipercapnia

A adição de CO₂ no circuito do ventilador é uma forma mais homogênea de se induzir a hipercapnia (LAFHEY e cols 2003), uma vez que o CO₂ permanece praticamente constante durante todo o protocolo experimental. Esse modelo foi utilizado pela maioria dos estudos *in vivo* (LAFHEY e cols 2000a; LAFHEY e cols 2003; LAFHEY e cols 2004; RAI e cols 2004; PARK e cols 2005; O'CROININ e cols 2005; KOMORI e cols 2007; O'CROININ e cols 2008; Ni Chonghaile e cols 2008a; Ni Chonghaile e cols 2008b; JABER e cols 2008; COSTELLO e cols 2009). Contudo, os resultados desses estudos são controversos com respostas positivas (LAFHEY e cols 2000a; 2003; 2004; Ni Chonghaile e cols 2008a; 2008b; COSTELLO e cols 2009), negativas (O'CROININ e cols 2008) ou neutras (RAI e cols 2004; PARK e cols 2005; O'CROININ e cols 2005) no que concerne a modulação do processo inflamatório.

A redução da ventilação alveolar é a causa mais comum de elevação do CO₂. A influência da hipercapnia endógena produzida pela redução do volume minuto na geração de mediadores inflamatórios também apresenta resultados controversos. Nesse contexto, constatou-se em modelo de LPA induzida pela instilação de *E. coli* (LANG e cols 2005; LIU e cols 2008) que a hipercapnia piorou o processo

inflamatório. Por outro lado, Sinclair e colaboradores em modelo de VILI relataram que a hipercapnia não só melhorou a inflamação pulmonar bem como minimizou as modificações morfo-funcionais do pulmão (SINCLAIR e cols 2002). Entretanto, a melhora da VILI ocorreu com níveis de CO_2 mais altos (80-100 mmHg) do que aqueles obtidos no modelo de LPA induzido por *E. coli* (55-65 mmHg), sugerindo a existência de um limiar para que o CO_2 possa vir a fazer um efeito benéfico. A grande vantagem de se induzir a hipercapnia reduzindo a ventilação reside no fato de ser um modelo mais próximo ao que acontece em pacientes com SDRA/LPA ventilados com baixos V_T (AMATO e cols 1998; ARDSNET 2000) porém os níveis de CO_2 usualmente variam no decorrer do tempo.

Estudos relacionados a dose de CO_2 apontam que a hipercapnia grave produzida por 15% de CO_2 demonstrou piorar a lesão neurológica (VANNUCCI e cols 2001). O grau de proteção da acidose hipercápnica com doses de CO_2 entre 2,5% à 10% foram demonstrados por Laffey e colaboradores em 2004. Houve pequena proteção no pulmão que recebeu doses de CO_2 inspirado em torno de 5%. No entanto, observou-se instabilidade hemodinâmica com aumento da fração inspirada de CO_2 até 10%. Com 20% de CO_2 inspirado, os animais não toleraram e vieram ao óbito (LAFHEY e cols 2004).

3.7. Tamponamento da acidose

Diversos tampões são responsáveis pela manutenção do pH no organismo, dentre eles está o tampão bicarbonato que tem grande relevância não só pelo tamponamento dos íons H^+ , mas também pelo fato de as concentrações dos componentes serem alteráveis de modo independente: a $[\text{CO}_2]$ pela respiração e a

[HCO₃] pelo fígado e rins, sendo dessa forma denominado “sistema-tampão aberto”. (SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2009).

A maioria dos protocolos experimentais não incluiu o tamponamento da acidose hipercápnica, deixando assim a dúvida se os efeitos ditos “protetores” da hipercapnia estão relacionados ao aumento do CO₂ ou a queda do pH.

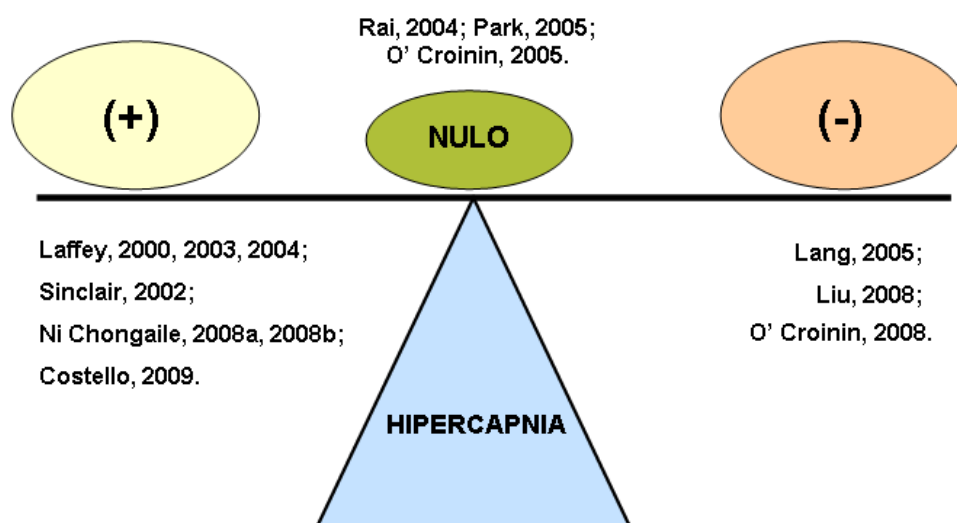


FIGURA 6: Estudos em modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda. Controvérsia acerca dos efeitos da acidose hipercápnica na literatura nos últimos 10 anos em modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda com resultados ora protetores, ora não-protetores e também três estudos onde a resposta da acidose hipercápnica não foi conclusiva. Todos os estudos citados não realizaram o tamponamento da acidose hipercápnica.

Na literatura, até o momento, há um único estudo *ex vivo* avaliando o papel do tamponamento na LPA. Para tal, utilizaram coelhos com acidose hipercápnica, acidose metabólica e hipercapnia tamponada com bicarbonato. Nesse estudo, a acidose hipercápnica e metabólica foram protetoras na lesão pulmonar aguda, entretanto, a acidose hipercápnica foi mais protetora que a metabólica. A hipercapnia tamponada foi menos protetora que a acidose hipercápnica e metabólica e quando a acidose hipercápnica foi tamponada trazendo o pH para valores normais, houve uma atenuação dos efeitos protetores (LAFFEY e cols 2000b). A acidose hipercápnica

resultou em vasoconstrição pulmonar, demonstrando que o tônus vascular pulmonar é mais sensível ao pH do que o CO_2 . Tal fato sugere que os efeitos diretos do pH e do PCO_2 são independentes. A grande limitação do estudo foi o fato de ser *ex vivo* o que anula as alterações hemodinâmicas decorrentes da circulação sistêmica.

Justificativa

O advento da estratégia ventilatória protetora na SDRA/LPA, com baixo volume corrente é acompanhado da aceitação de altos níveis de PaCO_2 (hipercapnia permissiva) (HICKLING e cols 1990).

Paradigmas correntes atribuem os efeitos benéficos da estratégia protetora somente à redução do estiramento pulmonar (ARDSNET 2000), porém quando Kregenow e colaboradores examinaram a mortalidade dos pacientes submetidos ao estudo ARDSnet em função da hipercapnia permissiva, utilizando uma análise de regressão logística multivariada, demonstraram que: (a) a hipercapnia reduziu a mortalidade em pacientes ventilados da maneira convencional; (b) não houve efeito protetor adicional nos pacientes ventilados mediante estratégia protetora (KREGENOW e cols 2006).

Nos últimos 10 anos, uma sequência de estudos foi realizada objetivando entender os efeitos da acidose hipercápnica, entretanto, os resultados perduram controversos. A acidose hipercápnica exerce atividade protetora *in vivo* atenuando a inflamação em modelos de isquemia-reperfusão (LAFFEY e cols 2000a; LAFFEY e cols 2003), lesão induzida pelo ventilador (SINCLAIR e cols 2002), na LPA induzida por *E. coli* (LAFFEY e cols 2004; NI CHONGHAILE e cols 2008a; NI CHONGHAILE e cols 2008b), mas também acarreta efeitos deletérios em modelos de LPA por depleção de surfactante (RAÍ e cols 2004) e naquela induzida por endotoxina (*E. coli*) (LANG e cols 2005; O'CROININ e cols 2005; O'CROININ e cols 2008; LIU e cols 2008).

Tais controvérsias podem ser atribuídas aos seguintes fatores: (1) modelo experimental de LPA que apresenta liberação de radicais livres e citocinas proinflamatórias (endotoxina e bactéria) apresenta melhor resposta em comparação aquele onde a LPA foi induzida por depleção de surfactante; (2) níveis de CO_2

atingidos pela estratégia ventilatória ou pela adição de CO₂ no ramo inspiratório do circuito do ventilator. Sabe-se que níveis elevados podem acarretar efeitos deletérios (RAÍ e cols 2004), logo, deve existir um limiar de CO₂ onde ocorra a atividade anti-inflamatória; (3) grau de acidose associada a hipercapnia já que pH muito reduzido acarreta lesão tecidual e comprometimento sistêmico.

Em face à controvérsia acerca dos efeitos do CO₂ na LPA como modulador do processo inflamatório esse estudo objetiva testar as seguintes hipóteses: (a) A acidose hipercápnica atua reduzindo a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica; (b) a acidose hipercápnica tamponada aumentaria a atividade inflamatória.

Objetivos

5.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da hipercapnia no pulmão e órgãos à distância em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.

5.2 Objetivos específicos

Analisar:

- ✓ Mecânica respiratória através da elastância estática a fim de avaliar o comportamento elástico do pulmão;
- ✓ Microscopia óptica do pulmão, objetivando dar suporte anatômico aos achados funcionais;
- ✓ Análise dos gases arteriais para verificar os níveis de PaO_2 , PaCO_2 , HCO_3^- e pH no sangue arterial;
- ✓ Análise de mediadores proinflamatórios (IL-6, IL1- β);
- ✓ Quantificação de células epiteliais apoptóticas no pulmão, rim, fígado e intestino através do método de TUNEL;
- ✓ Análise da expressão de caspase-3 e para procolágeno do tipo III no pulmão, rim, fígado e intestino.

Materiais

&

Métodos

6.1. Animais Utilizados

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (250-300g), oriundos do Biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (*US Department of Health and Humane Services*, 1985) e aprovado pela Comissão de Ética com uso de animais do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ (CEUA-CCS, IBCCF 019).

6.2. Caracterização dos grupos experimentais

Quarenta e dois ratos Wistar machos adultos (250-300g), foram aleatoriamente divididos em dois grandes grupos experimentais (Figura 7):

Controle (C): solução salina estéril (0.9% NaCl, 1,0 ml) foi injetada intraperitonalmente (i.p.) (n=21);

Lesão Pulmonar Aguda (LPA): paraquat (15 mg/kg) diluído em 1,0 ml de salina foi administrado intraperitonalmente (n=21);

Esses grupos foram subdivididos em:

Normocapnia (NC): os animais foram ventilados mecanicamente por 1 h e a PaCO_2 foi mantida em níveis normais (35-45 mmHg) (n=7);

Hipercapnia (HC): os animais receberam uma mistura gasosa de $5\%\text{CO}_2 + 21\%\text{O}_2 + \text{N}_2$ balanceado (Linde gás terapêutico, Lidingö, Sweden) que foi adicionada ao ramo inspiratório do circuito do ventilador e liberada ao fluxo de 1ml/s durante 1 hora. A PaCO_2 foi mantida entre 60 – 70 mmHg (n=7);

Hipercapnia Tamponada (HCT): além da mistura gasosa de $5\%\text{CO}_2 + 21\%\text{O}_2 + \text{N}_2$

balanceado (Linde gás terapêutico, Lidingö, Sweden) durante 1 hora de ventilação, os animais receberam uma infusão única *em bolus* de bicarbonato de sódio [8,4%, intravenoso (i.v.)] (n=7). Para o cálculo da dose de bicarbonato de sódio, utilizou-se como referência o excesso de bases (BE), obtido pela gasometria arterial e aplicou-se a fórmula:

$$\text{mEq de HCO}_3^- = 0,3 \times \text{peso do animal} \times \text{BE}$$

onde:

mEq é o número de miliequivalentes que foram repostos;

0,3 é uma constante;

Peso do animal foi medido em quilogramas;

BE é o excesso de base obtido através da análise do sangue arterial via gasometria.

Do total obtido na fórmula, injetou-se um terço na veia peniana do animal e após 5 min realizou-se nova gasometria arterial.

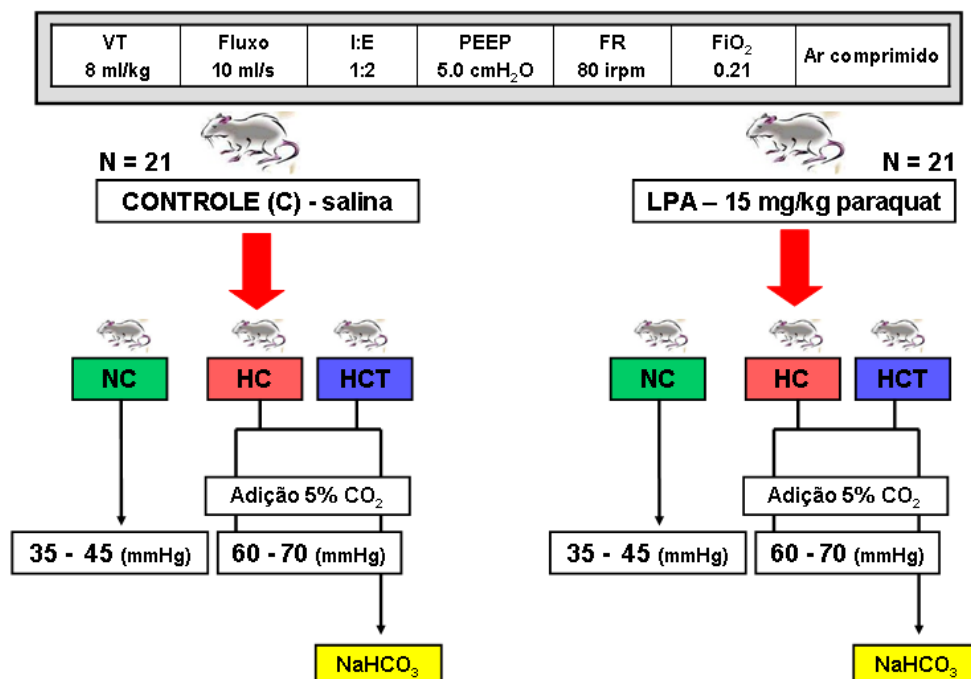


Figura 7. Desenho experimental.

6.3. Preparação dos Animais

Sete animais de cada grupo foram utilizados para o estudo da mecânica respiratória. Vinte e quatro horas após a administração de salina ou paraquat os animais foram sedados com diazepam [5 mg, intraperitonealmente (i.p.)], pesados (balança Filizola, modelo BR, fabricado por Indústrias Filizola AS, SP, Brasil) e em seguida anestesiados com tiopental sódico [Laboratórios Abbott do Brasil, Ltda, São Paulo, Brasil, (20 mg/kg, i.p.)]. Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos em abdução a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi feita uma pequena incisão longitudinal, medial, de aproximadamente 2 cm de extensão na face ventral no pescoço, seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, pela traqueotomia, uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic®, Clay-Adams Inc., Nova York, EUA) com 1,5 mm diâmetro interno e 4,0 cm de comprimento foi introduzida na traquéia, sendo esta fixada na porção proximal por meio de fios de algodão.

Um cateter de polietileno (PE-10) foi introduzido na artéria carótida para coleta de sangue arterial (300 µl) e monitorização da pressão arterial média (PAM) (SCIREQ, Montreal, Canada). A pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2), pressão parcial arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) e o pH foram mensurados por um analisador de gases i-STAT® [Laboratórios Abbott do Brasil, Ltda, São Paulo, Brasil] em quatro momentos: ar ambiente, 5 minutos após a liberação da mistura gasosa de 5% CO_2 no ramo inspiratório do circuito do ventilador, 5 minutos após a administração de bicarbonato de sódio *in bolus* e ao final do experimento (Figura 8).

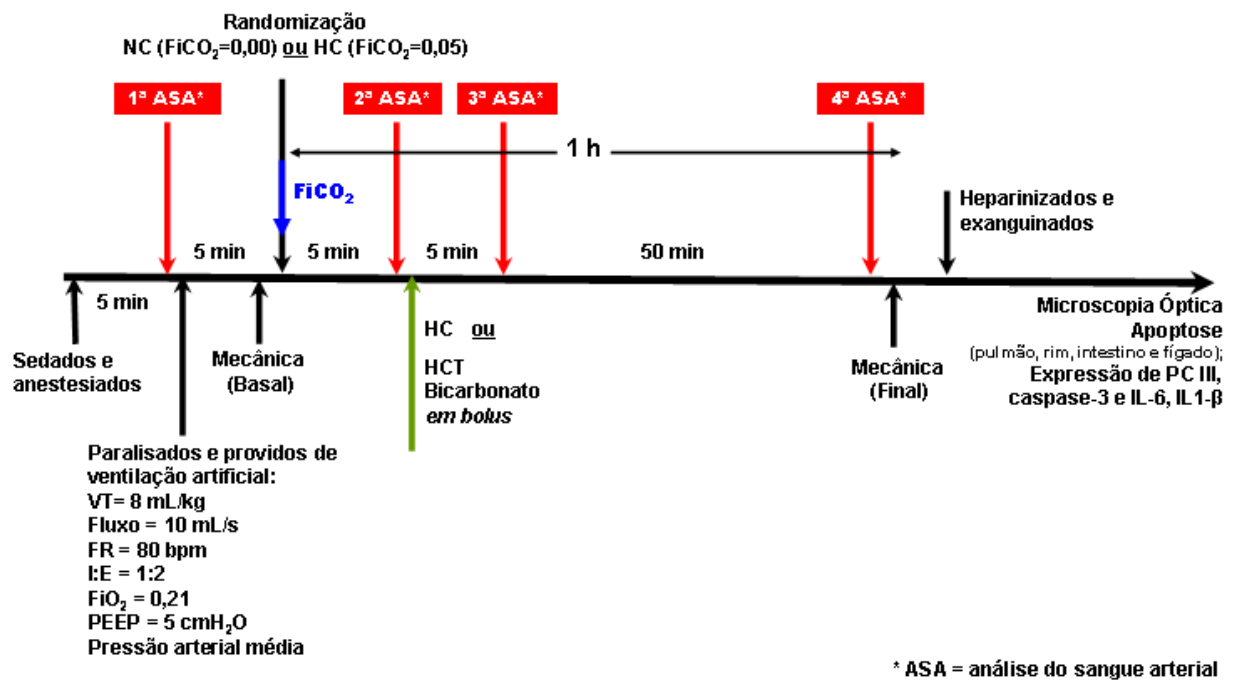


Figura 8. Escala temporal do protocolo experimental. Definições: V_T =volume corrente, FR= frequência respiratória, I:E = relação inspiração:expiração, FiO_2 = fração inspirada de oxigênio, PEEP= pressão positiva ao final da expiração, ASA = análise do sangue arterial.

Um pneumotacógrafo para pequenos animais como descrito por Mortola & Noworaj em 1983 foi conectado a cânula traqueal para medida de fluxo aéreo (V'). O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão (SCIREQ, SC-24, Montreal, Canada). Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão (UT-PDP, SCIREQ, Montreal, Canada) para medida da

pressão traqueal (P_{tr}). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (LORING e cols 1979; CHANG & MORTOLA 1981). O volume corrente mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

No esôfago dos animais, foi introduzido um cateter de polietileno (PE 205) de 30 cm de comprimento e 1,7 mm de diâmetro interno, com pequenos orifícios em sua extremidade distal, preenchido com água deionizada. O cateter foi introduzido até o estômago e retrocedido lentamente até atingir o terço inferior do esôfago. Sua extremidade proximal foi, então, conectada a um transdutor líquido (UT-PDP, SCIREQ, Montreal, Canada) para medida da pressão esofagiana (P_{es}), já que as variações da pressão no terço inferior do esôfago refletem as variações da pressão intrapleural (P_{pl}) e, portanto, da pressão da parede torácica (P_w). A medida da pressão esofagiana foi realizada para decompor o sistema respiratório em seus componentes: pulmão e parede torácica. O correto posicionamento do cateter esofagiano foi determinado pelo “teste de oclusão” (BAYDUR e cols 1982). O “teste de oclusão” consiste na oclusão das vias aéreas ao término de uma expiração espontânea, as quais são mantidas fechadas por um ciclo respiratório, registrando-se e comparando-se as variações das pressões traqueal e esofagiana durante o esforço inspiratório subsequente. Nessas condições, a diferença entre as variações da pressão traqueal (ΔP_{tr}) e da pressão esofagiana (ΔP_{es}) não devem exceder 5%. O cateter esofagiano foi lavado periodicamente com água deionizada, para evitar que a presença de secreção na luz do cateter possa comprometer as medidas da pressão (Figura 9).

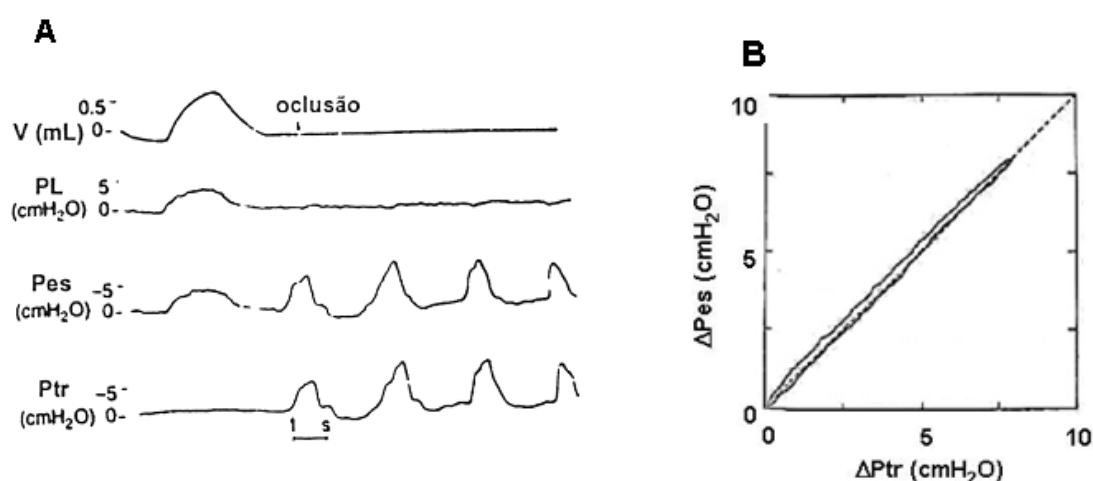


Figura 9. Teste de Oclusão. **A.** Traçados de volume (V), pressão transpulmonar (PL), pressão esofágica (Pes) e pressão traqueal (Ptr) durante o “teste de oclusão”. **B.** Variação de Ptr (Δ Ptr) por variação de Pes (Δ Pes). Δ Pes - Δ Ptr $< 5\%$ (Adaptado de Baydur e cols 1982).

A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em “U” contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro. O espaço morto da montagem foi de 0,2 mL. Para computá-lo, foi pesado o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em “T”, pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permitiu saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enchê-lo de água foi usado massa de modelar, que foi também pesada, junto com os demais equipamentos.

6.4. Mecânica pulmonar

Os animais tiveram a sua musculatura paralisada após a administração de brometo de pancurônio [Pavulon®, Organon International Inc., Nova Jersey, EUA (2,0 mg/kg, intravenosamente (i.v.)], e foram ventilados mecanicamente em um

ventilador mecânico para pequenos animais (Servo I, Maquet, Switzerland) com os seguintes parâmetros: (a) volume corrente de 8 ml/kg; (b) frequência respiratória de 80 incursões respiratórias por minuto (irpm); (c) relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2; (d) fluxo de 10 ml/s; (e) fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 0,21 e (f) pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 5 cmH₂O.

A mecânica pulmonar foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Figura 10) após insuflação com fluxo constante (Bates e cols 1985a, 1985b, 1988a, 1988b, 1989a, 1989b; Kochi e cols 1988a, 1988b).

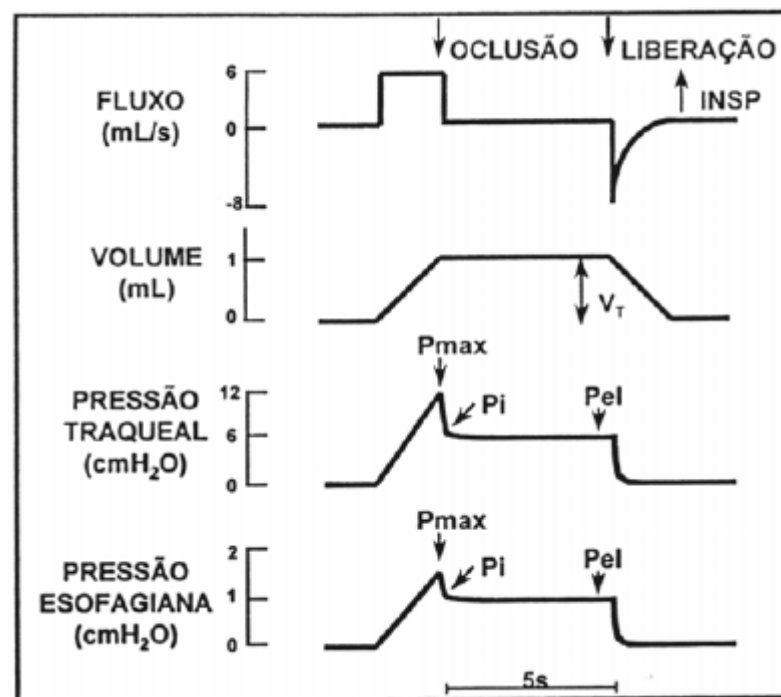


Figura 10. Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume, pressões traqueal e esofagiana em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. P_{max} = pressão máxima alcançada na traquéia; P_i = ponto de inflexão; P_{el} = pressão de retração elástica e V_T = volume corrente; INSP = inspiração.

Após a oclusão ao final da inspiração, há uma queda rápida inicial na pressão traqueal (P_{tr}) de onde o valor da pré-oclusão cai para um ponto de inflexão (P_i), seguinte a uma queda lenta da P_{tr} até que um platô seja alcançado. O platô corresponde à pressão de recolhimento elástico do sistema respiratório (P_{el}). Os

valores das elastâncias estáticas (Est) foram calculados dividindo-se $P_{el,L}$ pelo V_T , respectivamente. Foram coletados 10-15 ciclos respiratórios para cada animal.

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da P_i e P_{el} .

A seguinte fórmula foi utilizada na análise da mecânica respiratória:

$$Est = P_{el}/V_T$$

onde:

P_{el} = pressão de retração elástica;

Est = elastância estática;

V_T = volume corrente.

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

A aspiração de secreções traqueais foi cuidadosamente realizada apenas em presença de excesso das mesmas, sempre antes da medida da mecânica respiratória.

A figura 11 demonstra a montagem experimental.

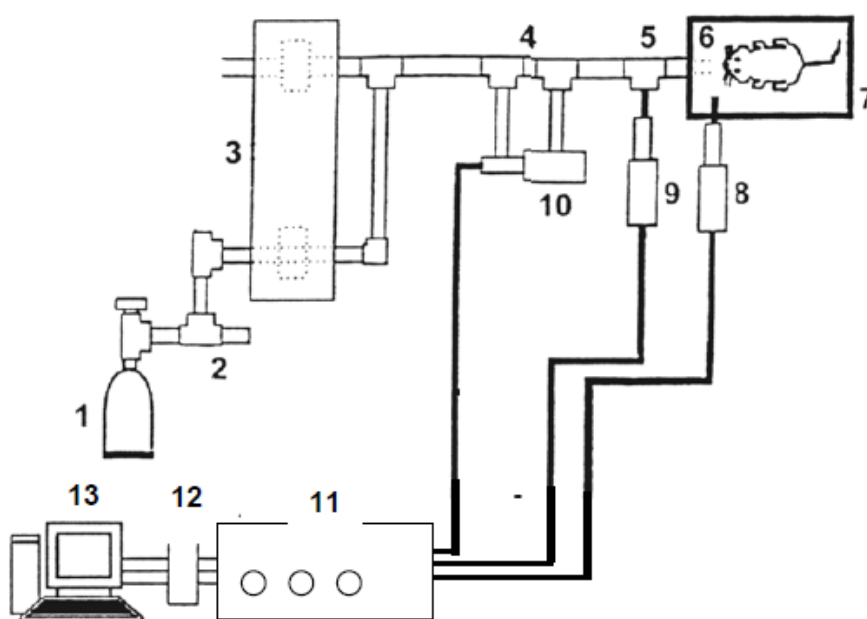


Figura 11: Montagem experimental consistindo de: (1) Cilindro de ar comprimido; (2) Rotâmetro de agulha; (3) Ventilador controlado a volume com fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides; (4) Pneumotacógrafo; (5) Peça T para medida de pressão nas vias aéreas; (6) Cânula traqueal; (7) Mesa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

As medidas mecânicas e morfométricas do pulmão, bem como a mensuração da expressão do RNAm para IL-6, IL-1 β , caspase-3 e procolágeno do tipo III, foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ). A quantificação da apoptose das células epiteliais do pulmão e órgãos à distância foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

6.5. Remoção dos pulmões

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

6.6. Estudo da histologia e morfometria pulmonares

6.6.1. Microscopia óptica

6.6.1.a Fixação e preparo das lâminas

Os pulmões direitos foram resfriados por imersão rápida em nitrogênio líquido por aproximadamente 3 min, retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o

material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol (NAGASE e cols 1992):

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1h e, em seguida, a -4°C durante 24h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 μ m de espessura.

6.6.1.b Análise histológica e morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Olympus BX51, Olympus América Latina-Inc., Brasil) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada em aumento de 100x e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (*point-counting*) (WEIBEL 1990), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 12).

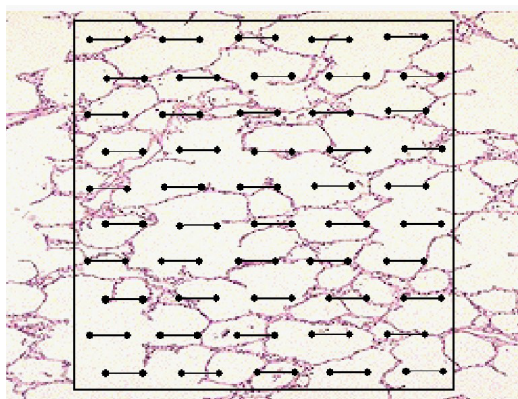


Figura 12. Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Em um aumento de 200x, foi avaliado dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (WEIBEL 1990). O número de pontos que caiu em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual.

Em um aumento de 1000x, foi avaliado dez campos aleatórios e não coincidentes para quantificação dos seguintes parâmetros: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (neutrófilos) e células mononucleares (macrófagos + linfócitos + monócitos). Pontos que caíram somente sobre área de tecido foram computados e divididos pelo número total de pontos do tecido (tecido + células no tecido). O número de pontos que caiu sobre as células polimorfonucleares ou mononucleares do parênquima pulmonar foi dividido por essa relação de tecido e expressos sob a forma de percentual.

6.7. Estudo da apoptose

6.7.1. Remoção e preparo dos órgãos

Após a separação do coração e dos pulmões, foram retirados intestino, rim direito e parte do lobo direito do fígado. Para a análise do intestino, foi retirado um pedaço da região intestinal mais próxima ao estômago e com o auxílio de uma seringa estéril de 1,0 ml, o pedaço retirado foi lavado com salina fosfato tamponada (PBS) estéril a fim de eliminar resíduos.

Para análise da apoptose através do método TUNEL, três pedaços de aproximadamente 2x2x2 mm de cada órgão, foram cortados e armazenados em eppendorfs individuais com solução de 90 ml de álcool a 80% + 5 ml de ácido acético

+ 5 ml de formol tamponado a 10%. O material ficou nessa solução durante 4 horas e foi transferido para álcool a 70%.

6.7.2. Detecção *in situ* de células apoptóticas

Para detecção *in situ* de apoptose, em nível de uma única célula, foi usado o método *TUNEL* (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end-labeling method*) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). Este método envolve a adição de trifosfato de deoxiuridina (dUTP) marcado com fluorescência nos fragmentos terminais do DNA por ação catalítica do TdT (GAVRIELI e cols 1992; WIJSMAN e cols 1993). Todos os experimentos foram realizados dez vezes de modo que os resultados para três amostras de cada tecido pudessem ser padronizados. Cortes histológicos feitos a partir de blocos de parafina (4 a 6 µm) foram depositados em lâminas. A seguir, os cortes foram desparafinados em solução xilol e rehidratados com diluições decrescentes de etanol em água. Os cortes foram lavados quatro vezes com água destilada por 2 minutos e imersos em tampão TdT (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Então, TdT (0,3 U por microlitro) e marcação fluorescente dUTP em tampão TdT foram adicionados aos cortes e as amostras foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C durante 60 minutos. Para controles negativos, TdT foi eliminado da mistura reativa. Os cortes foram, então, incubados com anticorpo específico conjugado a peroxidase. Os corantes foram visualizados com um substrato no qual núcleos com fragmentação do DNA se coram de marrom. A reação foi determinada pela lavagem dos cortes em tampão salina fosfato. Os núcleos sem fragmentação do DNA foram corados de azul como resultado da contra-coloração com hematoxilina.

A microscopia óptica foi usada para quantificar apoptose de células epiteliais no pulmão, rim, fígado e intestino.

Um escore semi-quantitativo de 5 pontos, baseado na gravidade, foi usado e graduado como negativo = 0 (parênquima pulmonar normal), mínimo = 1 (1-25%), moderado = 2 (26-50%), alto = 3 (51-75%) e grave = 4 (76-100%) de estruturas do parênquima analisadas em 10 campos microscópicos não-coincidentes, para cada animal, num total de 4 animais por grupo (aumento 400X).

6.8. Estudo da biologia molecular

6.8.1. Extração de RNA total

As amostras de tecido pulmonar foram homogeneizadas em TRIzol® Reagent (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA), permitindo a separação do RNA total. O TRIzol® Reagent é uma solução monofásica de fenol e de guanidina isotilcianato. Após a extração, realizada de acordo com as instruções do fabricante, o RNA total precipitado foi diluído em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nanômetros e a pureza das amostras foi determinada pela razão entre o comprimento de onda 260 e 280 nanômetros. Somente as amostras com razão maior que 1,7 foram utilizadas. A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos.

6.8.2. PCR em tempo real (*Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction*)

Para transcrição reversa, 1000 ng de RNA total foi utilizado com 0,5 µg/µL de oligo-dt (Invitrogen, Carlsbad, CA) e um kit transcriptase reversa (MMLT-V Reverse Transcriptase Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação da transcriptase reversa (RT) teve 1000ng de RNA total, 4µL de 5x RT *buffer*, 2µL de 0,1 M DDT, 1µL de 10mM de deoxinucleotídeos, 1µl de 50U/µL de MMLT-V e água DEPC para um volume final de 20 µl. Este procedimento ocorreu à 37°C por 50 min. A quantidade de cDNA correspondente a 62,5ng de RNA foi selecionada e amplificada com os pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene listados abaixo:

GAPDH sense, 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT- 3', e anti-sense, 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'; BC091141.1;

IL-1β sense, 5'- CTA TGT CTT GCC CGT GGA G -3', e anti-sense, 5'- CAT CAT CCC ACG AGT CAC A -3'; GenBank: BC087069.1;

IL- 6 sense, 5'- CTC CGC AAG AGA CTT CCA G -3', e anti-sense, 5'- CTC CTC TCC GGA CTT GTG A -3'; GenBank: M26744.1;

PCIII sense 5'- ACC TGG ACC ACA AGG ACA C -3', e anti-sense, 5'- TGG ACC CAT TTC ACC TTT C -3'; GenBank: BC087039.1;

CASPASE 3 sense 5'- GGC CGA CTT CCT GTA TGC -3', e anti-sense, 5'- GCG CAA AGT GAC TGG ATG -3'; GenBank: BC081854.1.

O PCR em tempo real foi realizado com o SYBR *green* PCR Master Mix (Biosystem Applied). A mistura do PCR foi pré-aquecida a 50° C por 2 minutos e então a 95° por 10 minutos para ativar a AmpliTaq Gold DNA polimerase, seguido de

40 ciclos de amplificação (95°C por 15seg; 60°C por 1 min). Ao final a reação foi aquecida a 60°C por 10 minutos. Todas as reações foram seguidas pela curva de dissociação onde o produto foi submetido a 95°C por 1 min e 60°C por 1 min. O produto do PCR foi checado em gel de agarose à 3,5% (Cambrex Bio Science Rockland). A quantificação relativa foi normalizada para o nível de expressão gênica do GAPDH. O ABI PRISM® 7500 Sistema de Detecção de Seqüência foi utilizado para detecção em tempo real do PCR, assim como, para análise de dados.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no programa SigmaStat® para Windows® (versão 3.1). A normalidade dos dados (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors) e a igualdade de variância (teste de mediana de Levene) foram testadas.

Os dados paramétricos foram apresentados como média $\pm$ DP e comparados através do teste *Two Way ANOVA* – Fatores: (1) C x LPA; (2) Normocapnia X Hipercapnia; quando comparações múltiplas foram necessárias, o teste *Tukey* foi aplicado.

O teste *t student* foi aplicado para análises entre os grupos HC x HCT, bem como o teste de *t pareado* para a análise da mecânica basal x final.

Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e percentis 25 e 75 e analisados utilizando-se *Two Way ANOVA on Ranks*.

O grau de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

8.1. Variáveis hemodinâmicas e gasométricas

A pressão arterial média (PAM) foi mantida entre 70– 90 mmHg e a temperatura corporal entre 36,0 – 36,7 °C durante todo o protocolo experimental.

Na Tabela 1 verificamos o comportamento das variáveis gasométricas nas diferentes estratégias ventilatórias. No grupo controle, apenas o grupo C-NC não apresentou diferença ao final do protocolo. O grupo controle hipercápnico (HC e HCT) diminuiu significativamente a pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2) em relação aos seus valores basais, sendo que essa queda foi mais expressiva no C-HC. Houve diferença significativa na PaO_2 entre os grupos C-HC e C-HCT.

A PaO_2 basal foi significativamente menor nos animais com lesão pulmonar aguda. Após 1 hora foi possível verificar melhora significativa na PaO_2 de todos os animais do grupo LPA. Os animais LPA-NC apontaram um aumento significativo na PaO_2 em relação aos demais. Contrariamente, o grupo LPA-HC apresentou menor aumento na PaO_2 final se comparados aos demais grupos. Contudo, os seus valores finais estão dentro da faixa de normalidade (80 – 100 mmHg).

A pressão parcial arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) basal foi significativamente maior no grupo LPA se comparados ao C. Entretanto, os seus valores estão dentro da faixa de normalidade (35-45 mmHg). Tanto no grupo C quanto LPA os animais NC não alteraram a PaCO_2 ao final de 1 hora de ventilação mecânica. O grupo controle hipercápnico (HC e HCT) apresentou diferença significativa da PaCO_2 final tanto em comparação ao grupo NC quanto aos valores basais. O mesmo comportamento foi observado nos animais LPA-HC e LPA-HCT. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos HC e HCT, que mantiveram níveis de hipercapnia entre 60 – 70 mmHg.

Os valores basais de bicarbonato (HCO_3^-) foram iguais em todos os grupos, tanto no C quanto no LPA. Os grupos normocápnicos C e LPA mantiveram os valores normais de bicarbonato no final do experimento. Os valores finais de bicarbonato nos grupos C-HCT e LPA-HCT apresentaram diferenças significativas em relação aos seus valores basais e também em relação aos valores finais nos grupos NC e HC.

O pH arterial basal manteve-se dentro da faixa de normalidade no grupo C e LPA. O grupo C-NC e LPA-NC não apresentaram diferença do pH final em comparação ao basal. Os grupos C-HC e LPA-HC apresentaram diminuição significativa do pH em comparação ao basal ($7,42 \pm 0,00$ - $7,23 \pm 0,01$; $7,37 \pm 0,02$ - $7,23 \pm 0,00$) respectivamente. O pH final do grupo C-HCT foi significativamente menor se comparado ao basal e ao C-NC final e significativamente maior se comparado ao grupo C-HC. No grupo LPA-HCT ao final do experimento, o comportamento do pH foi significativamente maior em comparação ao grupo C e ao grupo LPA-HC, mostrando-se menos ácido.

	C			LPA		
	NC	HC	HCT	NC	HC	HCT
PaO₂ (mmHg)						
Basal	99±0,4	99±0,2	99±0,1	66±0,2 *	65±1,7 *	65±1,1 *
Final	97±0,3	92±0,2 # †	94±0,2 # ## †	98±0,4 †	90±0,9 # †	95±0,7 * # ## †
PaCO₂ (mmHg)						
Basal	35±0,1	35±0,2	36±0,1	43±0,8 *	43±1,3 *	43±0,3 *
Final	36±0,2	63±0,5 # †	65±0,2 # †	36±0,5	64±0,4 # †	63±0,9 # †
HCO₃⁻ (mEq/l)						
Basal	23±0,8	22±0,2	23±0,3	24±0,6	24±0,3	23±0,6
Final	22±0,8	25±0,4	32±0,2 # ## †	24±0,2	25±0,2	32±0,0 # ## †
pH						
Basal	7,43±0,0					
1		7,42±0,00	7,42±0,00	7,36±0,00	7,37±0,02	7,36±0,00
Final	7,37±0,0					
4		7,23±0,01 # †	7,33±0,02 ## †	7,38±0,02	7,23±0,00 # †	7,34±0,00 ##

Tabela 1. Parâmetros da gasometria arterial. Valores de PaO₂, PaCO₂, HCO₃⁻ e pH adquiridos através da análise do sangue arterial no início (basal) e no final do experimento em animais normais (grupo controle) e com lesão pulmonar aguda (LPA). Os valores são a média ± DP (n=4/grupo). Definição das abreviações: C = controle, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). * Significativamente diferente do C; # Significativamente diferente do NC; ## Significativamente diferente do HC; † Significativamente diferente do Basal (p <0,05).

8.2. Mecânica pulmonar

A elastância estática do pulmão (Est, L) do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) foi significativamente diferente do grupo controle (C) (Figura 13). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos normocapnia (NC), hipercapnia (HC) e hipercapnia tamponada (HCT), tanto no grupo C quanto no LPA.

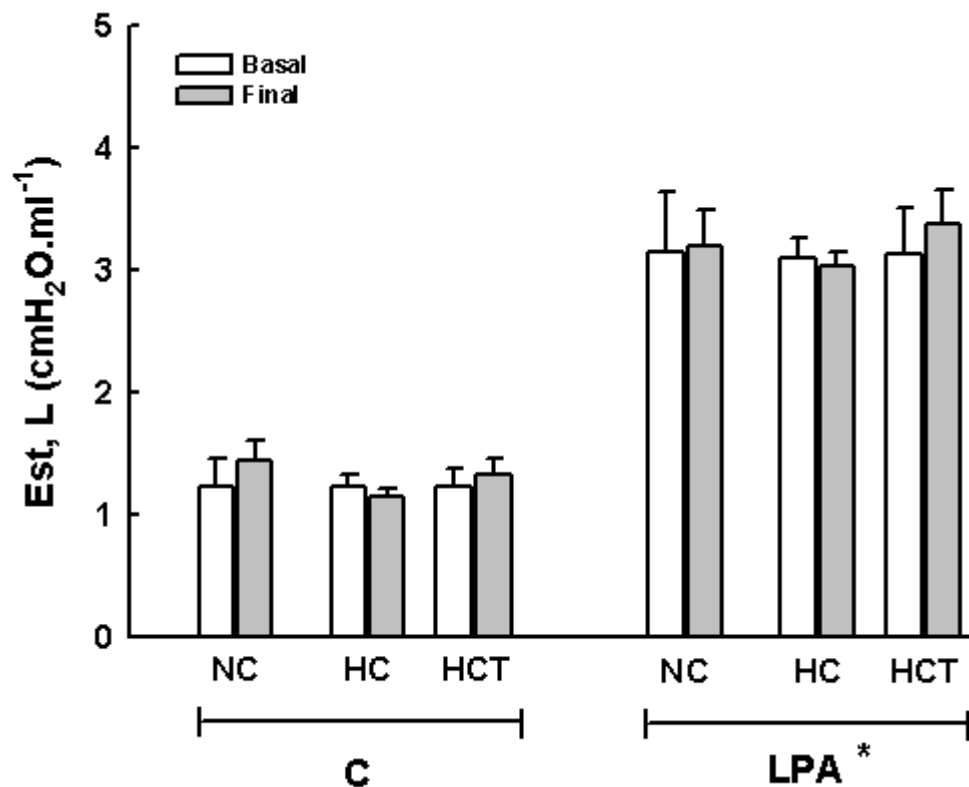


Figura 13. Elastância estática do pulmão (Est, L). Os valores da Est, L foram mensurados através do método de oclusão ao final da inspiração no início e ao final do protocolo experimental como descrito na sessão materiais e métodos. No grupo C os animais receberam salina (i.p.) e no grupo LPA os animais receberam 15mg/kg de paraquat (i.p.). As barras brancas representam os valores basais da Est, L enquanto as cinzas representam a Est, L após 1 hora de ventilação mecânica. Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). Valores são expressos como média $\pm$ DP (n=7/grupo). (*) Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$).

8.3. Histologia pulmonar

8.3.1. Morfometria pulmonar

No grupo LPA constatou-se maior fração de áreas de alvéolos colapsados sem evidências de hiperinsulflação. Os grupos C-HC e C-HCT tiveram redução significativa no percentual de alvéolos colapsados em relação ao grupo controle que não foi ventilado mecanicamente (C–NV). O mesmo comportamento foi observado nos animais com LPA que foram submetidos a normocapnia, hipercapnia e hipercapnia tamponada, 30%, 15%, 15%, respectivamente, comparado ao LPA–NV

(39%). Os grupos LPA-HC e LPA-HCT apresentaram maior percentual de alvéolos normais (85% e 85%) em relação ao NC (70%) e NV (61%) (Figura 14). Contudo, não houve diferença entre os grupos HC e HCT, tanto em C como em LPA.

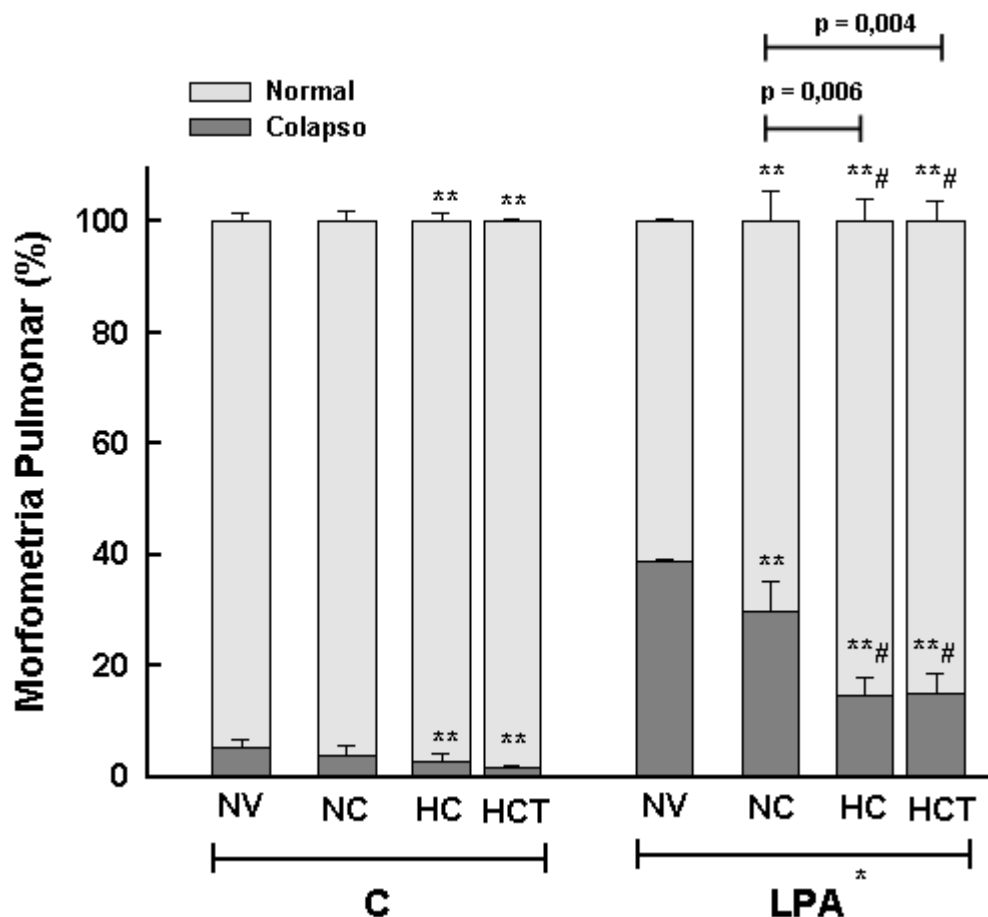


Figura 14. Morfometria pulmonar. O percentual de alvéolos normais e colapsados foi mensurado através da microscopia óptica utilizando-se a técnica de contagem de pontos. Os dados foram coletados em dez campos não coincidentes por animal. No grupo C os animais receberam salina (i.p.) e no grupo LPA os animais receberam 15mg/kg de paraquat (i.p.). Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hiperapnia e HCT = hiperapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). Valores expressos como média + DP (n=7/grupo). (*) Significativamente diferente do grupo C; (**) Significativamente diferente do grupo NV; (#) Significativamente diferente do grupo NC (p < 0,05).

A figura 15 permite uma melhor visualização da histoarquitetura do parênquima pulmonar nos animais C e LPA. O grupo C-NV apresenta menor fração de área de alvéolos normais e maior heterogeneidade se comparado ao grupo C-NC que ao ser

provido de ventilação mecânica apresentou aumento das áreas de alvéolos normais. Os grupos hipercápnicos, C-HC e C-HCT, não apresentam diferenças significativas em relação às áreas de colapso pulmonar. O grupo LPA-NV apresentou um padrão morfométrico muito heterogêneo, caracterizado por predomínio de colapso alveolar, edema intersticial e aumento da celularidade no septo. Com a ventilação mecânica já se pode verificar um aumento da área de alvéolos normais, embora ainda apresente grande percentual de áreas de colapso. No grupo LPA-HC constatou-se maior percentual de áreas normais em comparação ao grupo LPA-NC. Observou-se também redução da fração de área de alvéolos colapsados nos animais do grupo LPA-HCT.

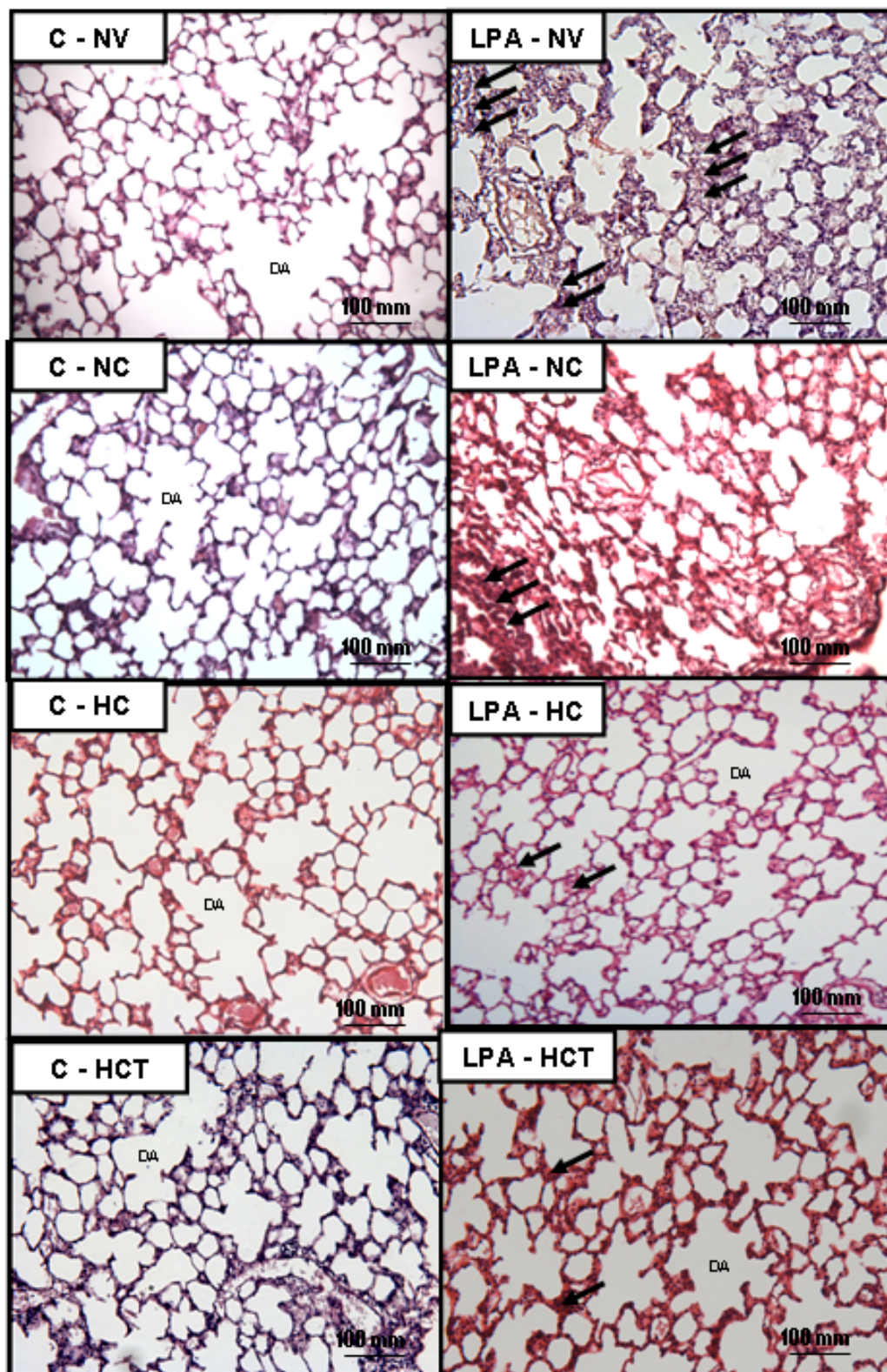


Figura 15. Fotomicrografias do parênquima pulmonar dos animais do grupo C que receberam salina (i.p.) e do grupo LPA que receberam 15mg/kg de paraquat (i.p.). Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). Aumento de 200x. Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina. As setas representam áreas de colapso alveolar.

8.3.2. Tipos celulares

As células polimorfonucleares, monocucleares e as células totais do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) foram significativamente diferentes do grupo controle (C) (Tabela 2).

O % total de células foi maior no grupo LPA-NV sendo significativamente diferente em comparação aos grupos LPA-NC, LPA-HC e LPA-HCT.

Tanto nos grupos C como LPA o percentual de células PMN foi significativamente maior nos grupos NV em comparação aos demais. O número de PMN reduziu significativamente no grupo NC não havendo diferença significativa entre HC e HCT.

Em contrapartida, as células MN só apresentaram diferença significativa no grupo LPA-HCT quando comparado LPA-NV.

Grupos		% PMN	% MN	% Total
C	NV	3,20±0,05	41,92±3,17	45,12±3,22
	NC	2,32±0,33 **	40,26±1,39	42,58±1,67
	HC	2,15±0,75 **	40,13±2,05	42,28±2,56
	HCT	1,97±0,23 **	40,55±0,87	42,51±1,03
LPA *	NV	18,26±0,38	36,97±1,28	55,23±0,90
	NC	14,76±2,26 **	35,21±1,29	48,88±3,76 **
	HC	9,39±1,00 ** #	35,08±3,20	44,47±4,06 **
	HCT	8,74±0,74 ** #	33,03±0,65 ** #	41,77±0,92 ** #

Tabela 2. Percentual de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e de células totais (TOT) em pulmões de ratos do grupo controle (C) e lesão pulmonar aguda (LPA). A análise dos tipos celulares foi realizada através da microscopia óptica em um aumento de 1000x. Foi avaliado dez campos aleatórios e não coincidentes. Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). * Significativamente diferente do C; ** Significativamente diferente do NV; # Significativamente diferente do NC (p <0,05). Os valores são a média ± DP (n=7/grupo).

8.4. Citocinas pró-inflamatórias

Os resultados apresentados foram expressos em função dos grupos C-NV e LPA-NV separadamente. As citocinas próinflamatórias IL-1 β e IL-6 reduziram progressivamente de NC para HC e HCT independentemente do grupo C ou LPA (Figura 16).

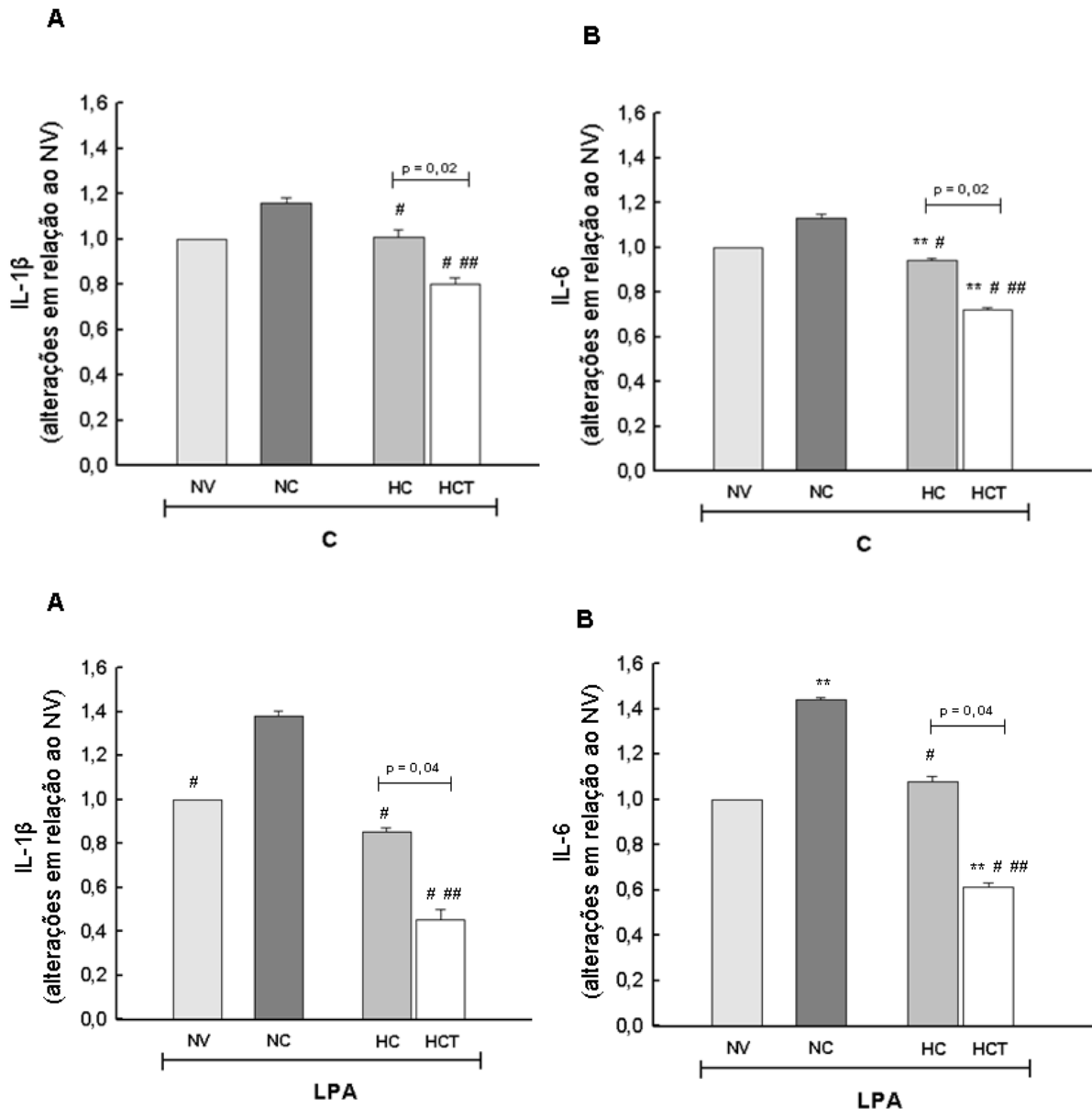


Figura 16. Nível de citocinas próinflamatórias (A) IL-1 β e (B) IL-6 avaliadas pelo método PCR em tempo real, nos animais controle (C) que receberam salina (i.p.) e lesão pulmonar aguda (LPA) que receberam 15mg/kg de paraquat (i.p.). Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). ** Significativamente diferente do NV; # Significativamente diferente do NC; ## Significativamente diferente do HC (p < 0,05). Os valores são a média $\pm$ DP (n=4/grupo).

8.5. Apoptose pulmonar e de órgãos à distância

8.5.1. Expressão do RNAm para caspase-3 no pulmão

Na figura 17 observa-se que a expressão do RNAm para caspase-3 não apresentou diferença significativa entre os grupos NV, NC, HC e HCT no grupo controle. Já nos animais LPA-NC ($1,66 \pm 0,02$) e LPA-HC ($1,89 \pm 0,07$), a expressão da caspase-3 foi significativamente maior quando comparado aos animais LPA-NV ($1,00 \pm 0,00$). O grupo HCT ($0,97 \pm 0,01$) apresentou menor expressão de caspase-3 em comparação ao NC e ao HC, retornando a valores similares do grupo LPA-NV.

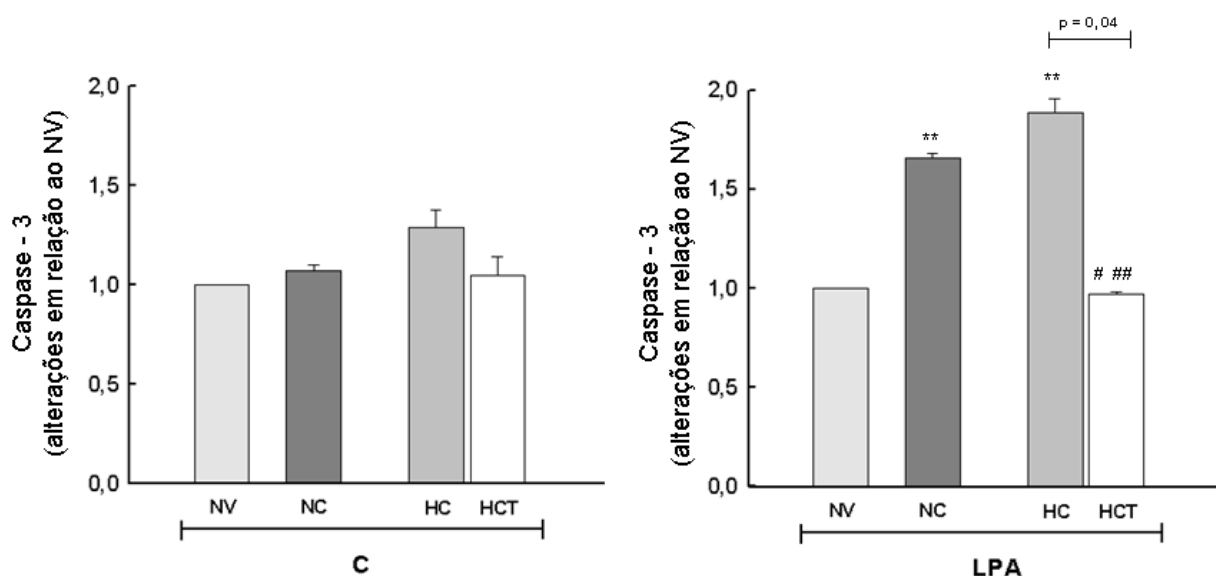


Figura 17. Nível de Caspase-3 no tecido pulmonar dos animais controle (C) que receberam salina (i.p.) e com lesão pulmonar aguda (LPA) que receberam 15mg/kg de paraquat (i.p.). A análise da caspase-3 foi realizada através do método de PCR em tempo real. Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). Valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=4$ /grupo). ** Significativamente diferente do NV; # Significativamente diferente do NC; ## Significativamente diferente do HC ($p < 0,05$).

8.5.2. TUNEL no pulmão e órgãos à distância

Todos os animais do grupo LPA apresentaram maior quantidade de células epiteliais apoptóticas tanto no pulmão como no rim, fígado e intestino em comparação ao C. Não houve alteração significativa nos entre os animais do grupo

C. Entretanto, houve mais células apoptóticas no grupo LPA-HC em comparação ao NC e HCT (Tabela 3, Figuras 18, 19, 20 e 21).

Grupos	C			LPA *		
	NC	HC	HCT	NC	HC # ††	HCT
Pulmão	1 (1 - 2)	2 (2 - 2,50)	2 (2 - 2,25)	2 (2 - 2,50)	3 (3 - 4)	2 (2 - 2,25)
Rim	1 (1 - 2)	2 (2 - 2,50)	2 (2 - 2,25)	2 (2 - 2,50)	3 (3 - 4)	2 (2 - 2,25)
Fígado	1 (1 - 2)	2 (1,50 - 2)	1 (1,25 - 1,50)	2 (2 - 2,50)	3 (3 - 4)	2 (2 - 2,25)
Intestino	1 (1 - 2)	2 (1,50 - 2)	1 (1,25 - 1,50)	2 (2 - 2,50)	3 (3 - 4)	2 (2 - 2,25)

Tabela 3. Escore de apoptose nas células epiteliais do pulmão, rim, fígado e intestino obtido pela técnica TUNEL, nos animais C que receberam salina (i.p.) e LPA que receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.). Valores correspondem a mediana (min-max) de 4 animais por grupo. Os achados apoptóticos foram classificados como 0 = ausência de células apoptóticas; 1 = 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75%; 4 = 76-100% de células apoptóticas. Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). * Significativamente diferente do C; # Significativamente diferente do NC; †† Significativamente diferente do grupo HCT; (p <0,05).

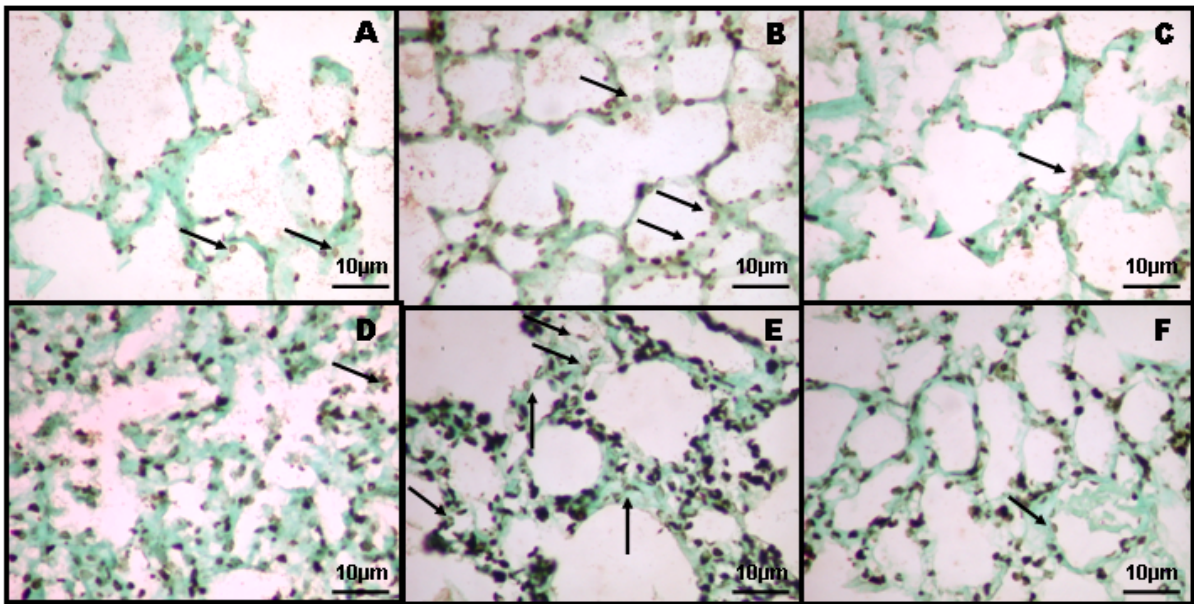


Figura 18. Fotomicrografias representativas das células epiteliais pulmonares dos animais do grupo controle (A, B e C) e LPA (D, E e F) analisadas pelo método de TUNEL *in situ*. A e D = normocapnia (NC); B e E = hipercapnia (HC); C e F = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (HCT). Os animais do grupo controle (C) receberam salina (i.p.) e os animais do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.). A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom dos núcleos celulares (setas) e o contraste está em verde. Aumento original 400x.

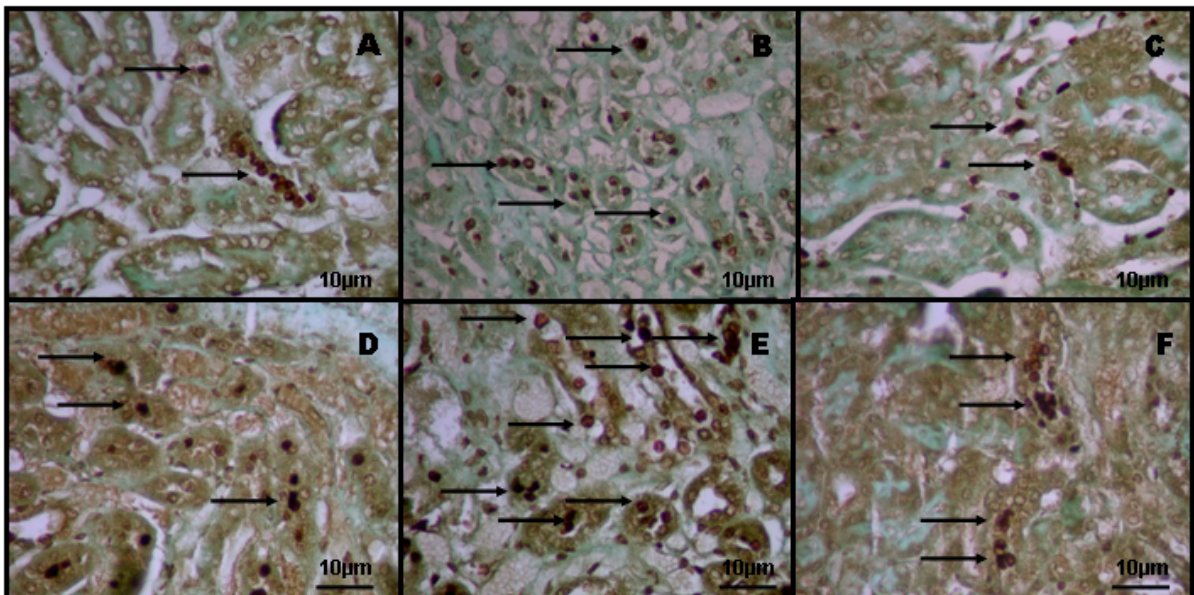


Figura 19. Fotomicrografias representativas das células renais dos animais do grupo controle (A, B e C) e LPA (D, E e F) analisadas pelo método de TUNEL *in situ*. A e D = normocapnia (NC); B e E = hipercapnia (HC); C e F = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (HCT). Os animais do grupo controle (C) receberam salina (i.p.) e os animais do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.). A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom dos núcleos celulares (setas) e o contraste está em verde. Aumento original 400x.

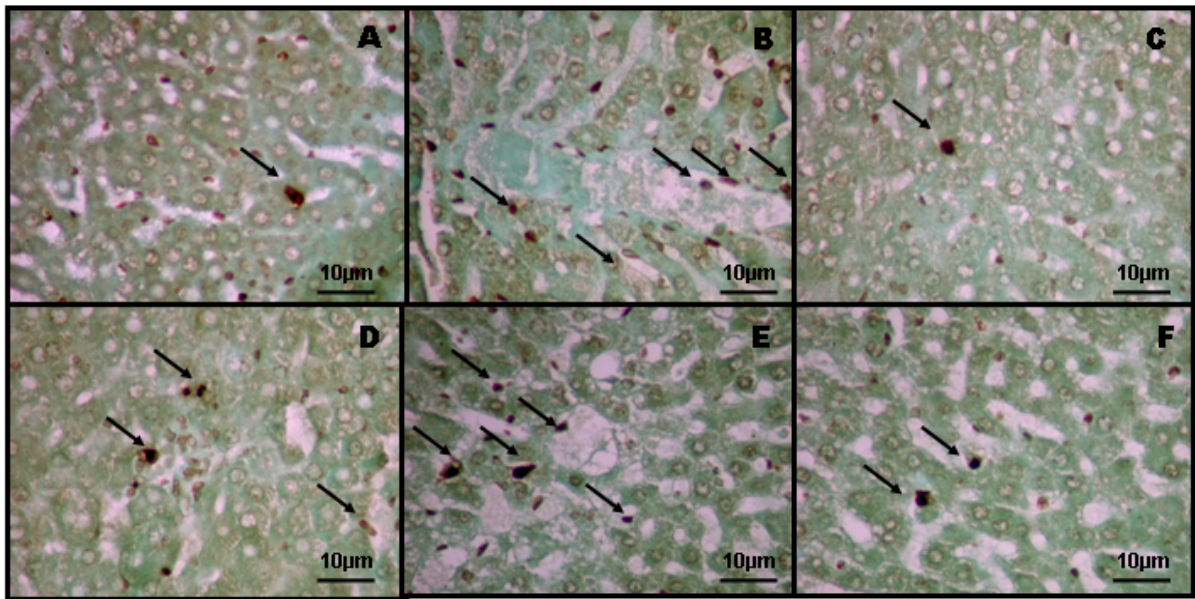


Figura 20. Fotomicrografias representativas das células hepáticas dos animais do grupo controle (A, B e C) e LPA (D, E e F) analisadas pelo método de TUNEL *in situ*. A e D = normocapnia (NC); B e E = hipercapnia (HC); C e F = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (HCT). Os animais do grupo controle (C) receberam salina (i.p.) e os animais do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.). A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom dos núcleos celulares (setas) e o contraste está em verde. Aumento original 400x.

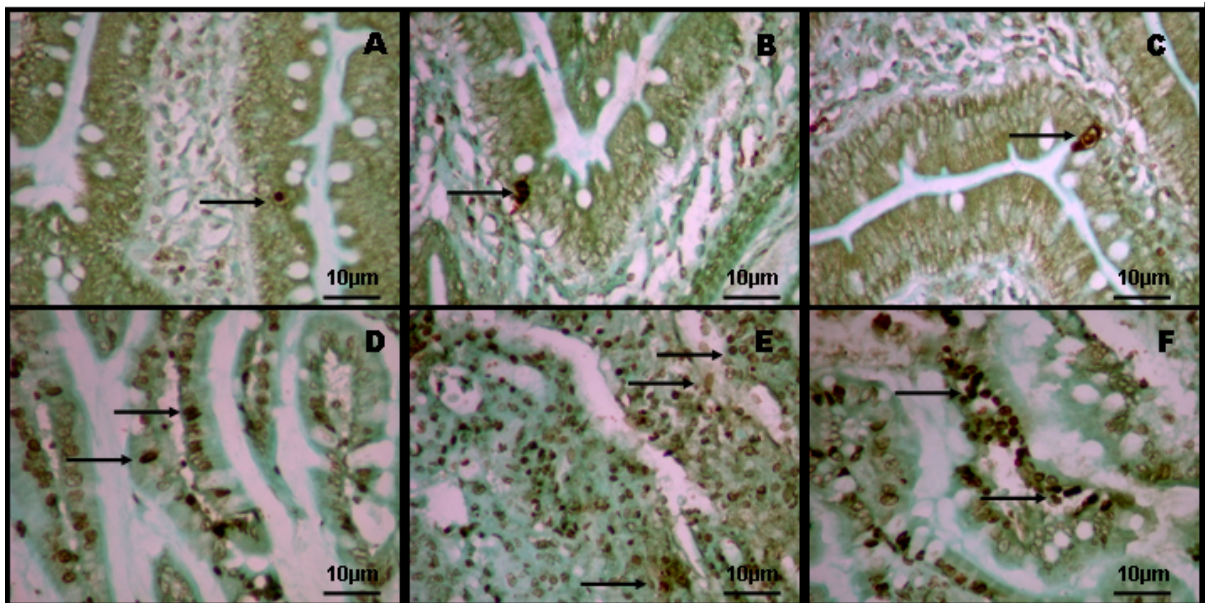


Figura 21. Fotomicrografias representativas das células intestinais dos animais do grupo controle (A, B e C) e LPA (D, E e F) analisadas pelo método de TUNEL *in situ*. A e D = normocapnia (NC); B e E = hipercapnia (HC); C e F = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (HCT). Os animais do grupo controle (C) receberam salina (i.p.) e os animais do grupo lesão pulmonar aguda (LPA) receberam 15ml/kg de paraquat (i.p.). A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom dos núcleos celulares (setas) e o contraste está em verde. Aumento original 400x.

8.6. Expressão do RNAm para prócolágeno do tipo III (PCIII)

A expressão do RNAm para PCIII foi mais elevada no grupo C-HC em comparação a NV, NC e HCT. Além disso, constatou-se menor expressão do PCIII no grupo HCT em comparação aos demais. Já os animais com LPA apresentaram maior expressão de PCIII nos animais normocápnicos (NC) em comparação ao NV. A hipercapnia evidenciou maior expressão de PCIII que reduziu após tamponamento. (Figura 22).

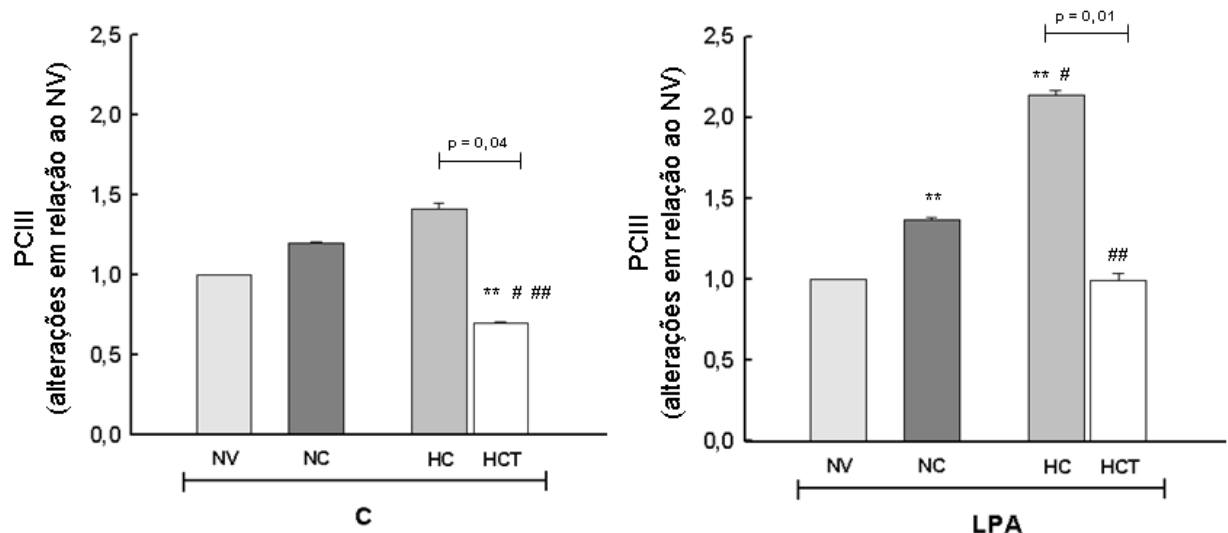


Figura 22. Expressão de RNAm para procolágeno tipo III (PCIII). O PCIII foi quantificado através do método de PCR em tempo real no tecido pulmonar de ratos do grupo controle e com lesão pulmonar aguda. Valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=4$ /grupo). Definição das abreviações: C = controle, LPA = lesão pulmonar aguda, NV = não ventilado, NC = normocapnia, HC = hipercapnia e HCT = hipercapnia + bicarbonato de sódio *in bolus* (i.v.). ** Significativamente diferente do NV; # Significativamente diferente do NC; ## Significativamente diferente do HC ($p < 0,05$).

Discussão

O presente estudo evidenciou que a acidose hipercápnica melhora o processo inflamatório pulmonar e sistêmico, sendo que o tamponamento propicia maior resposta anti-inflamatória sugerindo que a acidose modula a resposta anti-inflamatória induzida pela hipercapnia. Nesse contexto, a acidose hipercápnica reduz o número de células inflamatórias bem como da expressão de IL-1 β e IL-6. A melhora inflamatória acarretou redução da fração de área de colapso alveolar, sem modificações significativas na elastância estática do pulmão. Além disso, a acidose hipercápnica aumentou o número de células apoptóticas no pulmão, rim, fígado e intestino, assim como da expressão de caspase-3 e procolágeno tipo III, reduzindo após tamponamento.

Desde sua primeira descrição, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA) continuam atraindo a atenção de médicos e pesquisadores em virtude da sua evolução dramática e imprevisível. A LPA afeta aproximadamente 200.000 pacientes anualmente nos Estados Unidos e conta com 10 a 15% de admissões nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (ERICKSON e cols 2009). Apesar de numerosos esforços para o entendimento e o tratamento adequados, até o momento, não existe terapia específica para SDRA/LPA. Tal fato se deve, ao menos em parte, à falta de conhecimento acerca dos processos fisiopatológicos que regem a SDRA/LPA, que é agravado pela variedade de afecções que podem causá-las e a heterogeneidade de patologias sumarizadas sob o conceito de SDRA/LPA.

O uso de modelos animais possibilitou o entendimento da patogênese da SDRA/LPA com etiologias distintas e permitiu avanços importantes no desenvolvimento e no aprimoramento de abordagens terapêuticas (ROCCO & ZIN 2002). Existe uma grande variedade de espécies animais disponíveis para a

pesquisa biológica e uma parte importante da interpretação dos resultados é a cuidadosa seleção da espécie. Neste contexto, optamos por utilizar ratos Wistar, já que nossos experimentos exigiam um número considerável de animais, além de ser possível mimetizar as características da SDRA/LPA humana nessa espécie. O modelo experimental em ratos permite uma avaliação adequada dos parâmetros ventilatórios e histológicos pulmonares.

O modelo de indução da lesão pulmonar aguda deve primeiramente reproduzir a etiologia e, então, as fases fisiopatológicas que caracterizam a lesão, incluindo as fases exudativa e fibroproliferativa. Dentre os diversos modelos, selecionamos aquele induzido por paraquat, um herbicida que se acumula preferencialmente no pulmão, lesando os pneumócitos do tipo II. A lesão por paraquat caracteriza-se por dano alveolar difuso com edema intersticial, hemorragia intra-alveolar, inflamação com recrutamento de células mono- e polimorfo-nucleares, além da formação de membrana hialina. Adicionalmente, é um modelo de baixo custo, com efeito rápido (24 h) e facilmente reprodutível. Em relação à quantidade de paraquat necessária à rápida indução da lesão pulmonar aguda, sabe-se que doses acima de 10 mg/kg (lesão pulmonar aguda grau leve) deflagram um processo fibroproliferativo, acarretando alterações funcionais e histológicas pulmonares. Já as doses entre 20 e 25 mg/kg acarretam a morte de 50% dos animais nas primeiras 24 horas (SMITH e cols 1974; DELAVAL & GILLESPIE 1985; ROCCO e cols 2001). Logo, no presente estudo, a dose de 15 mg/kg de paraquat i.p. foi utilizada para indução da lesão pulmonar aguda moderada e sobrevida de 100% nas primeiras 24 horas. Além disso, o paraquat acarreta apoptose de células epiteliais no pulmão e órgãos periféricos (FABISIAK e cols 1998).

A única terapia que efetivamente diminuiu a mortalidade nos pacientes com SDRA/LPA foi a ventilação mecânica desses pacientes com redução do V_T (6-7 ml/kg) quando comparado ao V_T convencional (10-12 ml/kg) (AMATO e cols 1998; ARDSNET 2000). Entretanto, tal terapia ventilatória acarretou hipercapnia. A pressão parcial arterial de CO_2 foi significativamente diferente entre os dois estudos (43 mmHg AMATO e cols 1998 vs 58,2 mmHg ARDSNET 2000) e isso pode ser atribuído a dificuldade em se manter os níveis de CO_2 constante nos pulmões. A maioria dos estudos atribui o efeito benéfico da estratégia ventilatória protetora à redução do estiramento pulmonar (ARDSNET 2000), porém quando Kregenow e colaboradores examinaram a mortalidade dos pacientes submetidos ao estudo ARDSnet em função da hipercapnia permissiva, constataram que a hipercapnia também reduziu a mortalidade em pacientes ventilados da maneira convencional e não houve efeito protetor adicional nos pacientes ventilados mediante estratégia protetora (KREGENOW e cols 2006).

Vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos da hipercapnia como modulador do processo inflamatório. A adição de CO_2 no circuito do ventilador é uma forma mais homogênea de se induzir a hipercapnia (LAFHEY e cols 2003), uma vez que o CO_2 permanece praticamente constante durante todo o protocolo experimental, apesar desse modelo ter apresentado resultados controversos (LAFHEY e cols 2000a; LAFHEY e cols 2003; LAFHEY e cols 2004; RAI e cols 2004; PARK e cols 2005; O'CROININ e cols 2005; KOMORI e cols 2007; O'CROININ e cols 2008; NI CHONGHAILE e cols 2008a; NI CHONGHAILE e cols 2008b; JABER e cols 2008; COSTELLO e cols 2009). No presente estudo utilizamos a indução exógena, ou seja, através da adição de CO_2 no ramo inspiratório do circuito do ventilador, pois dessa forma obtemos uma acidose hipercápica uniforme,

sem diferenças regionais de PACO_2 (SWENSON 2004). A dose de 5% de CO_2 utilizada foi baseada em estudo prévio que já havia comprovado sua segurança e eficácia (LAFHEY e cols 2003). Esse é o primeiro trabalho que avalia a apoptose de órgãos periféricos na acidose hipercápnica bem como na acidose hipercápnica tamponada em modelo *in vivo* de lesão pulmonar aguda.

Para a análise da elastância estática do pulmão utilizou-se o método de oclusão ao final da inspiração. Para tal, utilizou-se volume e fluxo constantes já que a mecânica pulmonar varia em função de diferentes volumes e fluxos (AULER e cols 1990; EISSA e cols 1991). A elastância estática do pulmão foi maior no grupo LPA em comparação ao controle. Estudos prévios descreveram mudanças na elastância pulmonar na SDRA, resultante de disfunção do surfactante e/ou edema alveolar (GROSSMAN e cols 1980; GREGORY e cols 1991; INGENITO e cols 1994). No presente trabalho, o aumento na elastância estática do pulmão decorreu de vários fatores tais como: colapso alveolar, distorsão do parênquima pulmonar, edema intersticial, inflamação com infiltrados de neutrófilos e células mononucleares e membrana hialina (Figuras 13, 14, 15, Tabela 2) (ROCCO e cols 2001; 2003; PASSARO e cols 2009, STEIMBACH 2009). Não houve alteração significativa da elastância estática do pulmão tanto na acidose hipercápnica como em presença do tamponamento. Nesse contexto, Raí e colaboradores também mostraram que a hipercapnia não acarretou alterações significativas na mecânica pulmonar (RAI e cols 2004). Apesar da hipercapnia não ter acarretado modificação funcional, induziu menos atelectasia, influxo celular e edema nos grupos tratados com CO_2 (Figuras 14, 15, Tabela 2). Logo, a melhora morfológica não foi suficiente para propiciar redução da elastância. Nesse contexto, estudos experimentais evidenciaram tal dissociação

entre a mecânica e a histologia pulmonar (CONTADOR e cols 2003; SILVEIRA e cols 2004).

A redução no colapso pulmonar pode estar associada a diminuição da resposta inflamatória com queda da expressão de IL-1 β e IL-6 em função da hipercapnia levando a maior preservação do pneumócito tipo II e consequente produção do surfactante e redução da tensão superficial.

O edema e o colapso alveolar, mais intensos nas fases precoces da LPA, foram um dos fatores responsáveis pela grave hipoxemia basal nos animais submetidos a lesão pulmonar aguda. O suporte ventilatório em condições normocápnicas melhorou a oxigenação pulmonar. Além disso, a adição de CO₂ (5%) no ramo inspiratório do circuito do ventilador também aumentou a PaO₂. Vários artigos descreveram que a adição de 3-5% de CO₂ durante a inspiração promove melhora da troca gasosa e a oxigenação em pulmões normais (HAAS & BERGOFSKY 1968; INGRAM 1975). Swenson e colaboradores utilizando a técnica de eliminação múltipla de gás inerte (MIGET) demonstraram que a inspiração de CO₂ melhora a oxigenação arterial pela redução na heterogeneidade da ventilação/perfusão (V'/Q') (SWENSON e cols 1994; BROGAN e cols 2000). Entretanto, a melhora da troca gasosa foi mais efetiva após ter sido realizado o tamponamento com bicarbonato de sódio concomitante a um pH menos ácido e níveis de bicarbonato um pouco acima do normal. A adição de CO₂ leva a maior concentração de prótons pela combinação espontânea com a H₂O, catalisada pela anidrase carbônica, para formar o ácido carbônico. Os prótons gerados são livres para reagir ou serem tamponados. Não foi surpresa o pH ao final de 1h de ventilação mecânica ter sido menor na acidose hipercápnica em relação à acidose hipercápnica tamponada. Após a administração de bicarbonato de sódio o CO₂ gerado se difunde rapidamente por toda a membrana

celular para que haja um equilíbrio entre os compartimentos intracelular e extracelular. Estudos com fibras pulmonares C durante a hipercapnia alveolar mostram o papel dos íons hidrogênio na modulação do CO₂ quando houve uma atenuação da sensibilização das fibras C pulmonares na membrana terminal após administração de bicarbonato (GU & LEE 2002). Para elucidar se os efeitos protetores da acidose hipercápnica estariam relacionados a acidose ou ao CO₂ optamos em tamponar tal acidose com bicarbonato de sódio.

A resposta inflamatória foi atenuada na acidose hipercápnica com diminuição na expressão de IL1- β e IL-6 bem como no percentual de células PMN. Evidências sugerem que a acidose hipercápnica atenua componentes chave da resposta inflamatória incluindo o recrutamento de neutrófilos (HONAN e cols 2002), concentração de citocinas pulmonares e sistêmicas (LAFHEY e cols 2000b), produção de radicais livres (SHIBATA e cols 1998; LAFHEY e cols 2000a). Nossos resultados apontam uma melhora ainda maior na atividade antiinflamatória quando a acidose hipercápnica foi tamponada, sugerindo que os efeitos protetores possam estar sendo modulados pelo pH. No nosso estudo a acidose hipercápnica tamponada foi mais protetora do que a acidose hipercápnica em modelos *in vivo* de LPA, sendo contrário ao estudo de Laffey e colaboradores em que os efeitos protetores da acidose hipercápnica foram perdidos quando houve tamponamento (LAFHEY e cols 2000a). Os resultados de Laffey e colaboradores foram descritos em modelos *ex vivo*, anulando o componente sistêmico e restringindo os resultados estritamente ao tecido pulmonar. Além disso, os níveis do PaCO₂ atingido no estudo de Laffey e colaboradores foram maiores do que os nossos (108 mmHg vs 65 mmHg). Nesse contexto, Komori e colaboradores mostraram que as arteríolas sofrem dilatação com níveis de PaCO₂ até 80 mmHg, sendo que a partir de 100

mmHg as arteríolas começam a realizar constrição (KOMORI e cols 2007). Logo, poder-se-ia especular que a alta concentração de CO₂ constatada no estudo de Laffey poderia reduzir o fluxo sanguíneo pulmonar modificando a relação ventilação perfusão, bem como a perfusão de órgãos com perpetuação do processo inflamatório.

A caspase-3, considerada um marcador precoce das vias apoptóticas, mostrou-se elevada na acidose hipercápnica reduzindo quando tamponada. Os neutrófilos são células dominantes na resposta inflamatória aguda e também estão implicados na patogênese da SDRA/LPA. O pH é importante porque tem a capacidade para modular a função neutrofílica. Não podemos descartar a hipótese da influência do pH citosólico (pH_i) afetando a função neutrofílica. O balanço entre os prótons intra e extra celular é importante porque muitas funções neutrofílicas, incluindo a migração de células, são pH dependente (ROOS & BORON 1981; SERRANO e cols 1996; TREVANI e cols 1999). Além disso o pH_i e pH_e afetam diretamente a apoptose em muitos tipos de células (BENEDETTI e cols 1995; WEBSTER e cols 1999; THANGARAJU e cols 1999; MATSUYAMA e cols 2000; LIU e cols 2000), o que pode explicar a elevada expressão de caspase-3 durante a hipercapnia. Coackley e colaboradores descreveram aumento da apoptose quando o pH_i era muito baixo (COACKLEY e cols 2002b). Tal fato pode explicar o aumento da caspase-3 que observamos durante a acidose hipercápnica, onde o meio é mais ácido. A acidose hipercápnica tamponada promoveu redução da expressão da caspase-3 nas células epiteliais alveolares. Além disso, observamos utilizando-se o método de TUNEL que a acidose hipercápnica propiciou maior apoptose nas células epiteliais pulmonares bem como no rim, fígado e intestino.

A expressão do RNAm para procolágeno tipo III no pulmão foi significativamente reduzida na acidose hipercápnica tamponada (pH menos ácido). O PCIII é o primeiro tipo de colágeno a ser remodelado na evolução do processo de fibrose pulmonar (RAGHU e cols 1985). A acidose hipercápnica (pH mais ácido) apresentou maior expressão do RNAm para procolágeno tipo III no pulmão apontando maior remodelamento da matriz extra-celular (MEC). Ratos Wistar que foram submetidos a diferentes volumes, PEEP e ventilados na posição prona ou supino apresentaram hipercapnia no grupo que foi submetido a V_T de 8ml/kg, PEEP: 12 cmH₂O e ventilado na posição supino por 1h, sendo que tal grupo apresentou maior expressão do RNAm para PCIII (PILOTTO DE CARVALHO e cols 2007). Apesar de não podermos dissociar os efeitos da ventilação da hipercapnia no aumento da expressão de PCIII, no grupo ventilado com altos níveis de PEEP não houve hiperinsuflação pulmonar (PASSARO e cols 2009; STEIMBACK e cols 2009) sugerindo ser a hipercapnia o principal fator desencadeante do PCIII.

As células do tecido pulmonar constantemente remodelam o seu micro-ambiente, alterando os componentes e a estrutura da MEC (ROCCO e cols 2001; MENEZES e cols 2005; PELOSI & ROCCO 2008). A dinâmica de regulação da MEC é complexa, envolvendo um balanço entre síntese e deposição das moléculas da mesma, bem como sua degradação (DOS SANTOS & SLUTSKY 2006; DOS SANTOS 2008). Apesar de vários estudos descreverem o papel da hipercapnia durante o processo inflamatório na lesão pulmonar aguda, o mesmo não ocorre no que tange o remodelamento e reparo do parênquima pulmonar. Os efeitos da acidose na síntese de proteína da MEC pulmonar são amplamente desconhecidos. Bushinsky e colaboradores mostraram que a acidose metabólica induziu a diminuição da síntese de RNAm para procolágeno do tipo I na cultura de

osteoblastos de camundongos (FRICK e cols 1997), o mesmo não ocorreu quando em presença de acidose respiratória decorrente da hipercapnia (BUSHINSKY e cols 1993). Logo, mais estudos devem ser realizados com o intuito de melhor elucidar o papel da hipercapnia no remodelamento e reparo do pulmão.

Não podemos descartar algumas hipóteses em relação aos resultados do nosso estudo pensando no contexto clínico:

(a) a acidose hipercápnica tamponada foi protetora no presente modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida por paraquat. Esses dados divergem daqueles previamente descritos em modelo *ex vivo* de LPA induzida por isquemia-reperfusão (LAFHEY e cols 2000b). Tal fato sugere que os efeitos da hipercapnia podem estar relacionados não só aos níveis de PaCO_2 e pH, bem como a importância do componente sistêmico na modulação do processo inflamatório. Estudos *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida por alto estresse pulmonar apontaram resultados positivos quando o nível de PaCO_2 foi mais alto ($\sim 80 - 100$ mmHg) e pH mais baixo (SINCLAIR e cols 2002) e efeitos não protetores com um nível de CO_2 mais baixo ($\sim 65 - 75$ mmHg) com pH mais alto (PARK e cols 2005). Já os modelos *in vivo* de LPA induzida por isquemia-reperfusão apontaram resultados protetores da acidose hipercápnica do nível moderado ao grave (PaCO_2 : $63 - 110$ mmHg) com pH mais baixo (LAFHEY e cols 2000a; LAFHEY e cols 2003). Um estudo recente que induziu a LPA por ligadura e perfuração do ceco com nível moderado de PaCO_2 ($60 - 70$ mmHg) e pH não tão baixo como nos modelos de isquemia-reperfusão, apresentaram resultados benéficos quanto a terapia hipercápnica (COSTELLO e cols 2009). Tais estudos sugerem que o modelo de inflamação pulmonar bem como os níveis de CO_2 e pH são fundamentais para o resultado final. Além disso, esses estudos não realizaram o tamponamento da acidose hipercápnica e, por isso, não se

pode afirmar se os efeitos protetores são relacionados ao alto CO_2 ou ao baixo pH. Para a utilização segura da acidose hipercápnica na clínica, devemos entender melhor o papel exercido pelo CO_2 e pelo H^+ separadamente, mecanismos esses passíveis de melhor análise quando realizamos o tamponamento da acidose hipercápnica;

(b) o tamponamento da acidose hipercápnica atenuou muito mais a resposta inflamatória e diminuiu a apoptose das células epiteliais pulmonares e de órgãos à distância sugerindo haver algum mecanismo que perpetue os efeitos locais da administração do CO_2 nos pulmões, rim, fígado e intestino. Logo, alguns questionamentos devem ser realizados: 1) Poderia o CO_2 exercer algum efeito parácrino ou sofrer influência da expressão de algum canal sensível ao CO_2 ? No tecido cerebral existem canais Kir que são sensíveis ao aumento do CO_2 . Estudos mostraram que a diminuição nos níveis do pH durante alta exposição do CO_2 (acidose hipercápnica) foi a causa primária para a inibição desses canais Kir. Esses resultados foram baseados nas seguintes considerações: (1) inibição dos canais Kir 4,1 e Kir 5,1 mediante alta exposição de CO_2 são associadas a mudanças no pH_i ; (2) a redução no pH_i com bicarbonato inibiu esses efeitos; (3) acidificação intracelular com ou sem mudança na PaCO_2 e HCO_3^- com níveis de pH similares aqueles mensurados durante a acidose hipercápnica produziram inibição dos canais Kir e (4) alto PaCO_2 sem mudanças no pH não tiveram esses efeitos. Logo, a diminuição do pH_i é o mecanismo de entendimento central da inibição dos canais Kir 4,1 e 5,1 sensíveis ao CO_2 durante a hipercapnia (XU e cols 2000). Para isso, níveis ideais de pH devem ser estipulados durante a terapia hipercápnica tamponada *in vivo* para prover segurança na sua aplicação clínica.

Nosso estudo apresentou algumas limitações como: (a) a forma de indução da LPA, apesar de apresentar correlação com as alterações da LPA estudadas clinicamente, a intoxicação com paraquat não é a causa mais comum de SDRA/LPA; (b) a falta de mensuração do pH_i para responder os resultados encontrados, pois altos níveis de CO_2 geram uma diminuição no pH_i ; (c) o tamponamento da acidose hipercápnica ter sido *in bolus* ao invés de infusão contínua; (d) o pouco tempo de ventilação mecânica (1h).

Conclusão

A adição de gás-carbônico em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzido por paraquat acarretou melhora do processo inflamatório com redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, infiltração neutrofílica e da fração de área de colapso alveolar. Entretanto, tais modificações não foram suficientes para induzir alteração na mecânica pulmonar. Por outro lado, a acidose hipercápnica induziu aumento na apoptose de células epiteliais pulmonares, do fígado, rim e intestino bem como da expressão de caspase-3 no pulmão. Ademais, houve aumento da fibrogênese. O tamponamento da acidose hipercápnica melhorou ainda mais o processo inflamatório, com redução na apoptose no pulmão e órgãos a distância e da expressão de PCIII no pulmão.

Tais dados sugerem que o aumento do CO₂, por si só, promove melhora da inflamação e fibrogênese, porém a acidose atua modulando esses processos.

Perspectivas Futuras

- Comparar os efeitos pulmonares e sistêmicos da acidose hipercápnica exógena, induzida pela adição de CO₂, com a outra forma de indução de hipercapnia, aquela determinada pela redução da ventilação (endógena), em um mesmo modelo experimental de lesão pulmonar aguda.
- Analisar além da caspase-3, a caspase-8 e a caspase-9 que são caspases iniciadoras, a fim de entendermos qual via apoptótica está sendo utilizada durante a acidose hipercápnica e acidose hipercápnica tamponada.

Referências Bibliográficas

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. Imunologia celular e molecular. 6ª Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008.

ABERLE DR, WIENER-KRONISH JP, WEBB WR, MATTHAY MA. Hydrostatic *versus* increased permeability pulmonary edema: diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. **Radiology**, 1988;168:73-79.

ABOAB J, LOUIS B, JONSON B, [BROCHARD L](#). Relation between PaO₂/FIO₂ ratio and FIO₂: A mathematical description. **Intensive Care Med**, 2006;32:1494–97.

[AGOURIDAKIS P](#), [KYRIAKOU D](#), [ALEXANDRAKIS MG](#), [PREKATES A](#), [PERISINAKIS K](#), [KARKAVITSAS N](#), [BOUROS D](#). The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. **Respir Res**, 2002;3:25.

ALBERTINE KH. Histopathology of pulmonary oedema and acute respiratory distress syndrome. In: Matthay MA, Ingbar DH. New York: **Marcel Dekker**, 1998;37-84.

AMATO MB, BARBAS CS, MEDEIROS DM, MAGALDI RB, SCHETTINO GP, LORENZI-FIHLO G, KAIRALLA RA, DEHEINZELIN D, MUNOZ C, OLIVEIRA R, TAKAGAKI TY, CARVALHO CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress Syndrome. **N Engl J Med**, 1998;338:347-54.

[ANAND IS](#), [CHANDRASHEKHAR Y](#), [FERRARI R](#), [SARMA R](#), [GULERIA R](#), [JINDAL SK](#), [WAHI PL](#), [POOLE-WILSON PA](#), [HARRIS P](#). Pathogenesis of congestive state in chronic obstructive pulmonary disease. Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamics, and plasma hormones during edema and after recovery. **Circulation**, 1992;86:12-21.

ANDERSON WR, THIELEN K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. **Ultrastruct Pathol**, 1992;16:615-28.

ARDSNET. Ventilation with lower tidal volumes as compare with traditional volumes for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 2000;342:1301-08.

ARMSTRONG L, MILLAR AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. **Thorax**, 1997;52:442-46.

ARTIGAS A, BERNARD GR, CARLET J, DREYFUSS D, GATTINONI L, HUDSON L, LAMY M, MARINI JJ, MATTHAY MA, PINSKY MR, SPRAGG R, SUTER PM. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 1998;157:1332-47.

ASHBAUGH DG, BIGELOW DB, PETTY TL, LEVINE BE. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, 1967;2:319-23.

[AULER JO JR](#), [SALDIVA PH](#), [MARTINS MA](#), [CARVALHO CR](#), [NEGRI EM](#), [HOELZ C](#), [ZIN WA](#). Flow and volume dependence of respiratory system mechanics during constant flow ventilation in normal subjects and in adult respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, 1990;18:1080-86.

BACHOFEN M, WEIBEL ER. Structural alteration of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med**, 1982;3:35-36.

BATES JHT, DECRAMER M, CHARTRAND D, ZIN WA, BDDENER A, MILIC-EMILI JA. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J App Physiol**, 1985a;59:732-37.

BATES JHT, ROSSI A, MILIC-EMILI JA. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J Appl Physiol**, 1985b;58:1840-48.

BATES JH, BACONNIER P, MILIC-EMILI JA. Theoretical analysis of interruptertechnique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol**, 1988a;64:2204-14.

BATES JH, LUDWIG MS, SLY PD, BROWN K, MARTIN JG, FREDBERG JJ. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol**, 1988b;65:408-14.

BATES JHT, ABE T, ROMERO PV, SOTO J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**, 1989a;67:488-92.

BATES JHT, SHADORNOFSKY F, STEWART DE. The low frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. **Respir Physiol**, 1989b;78:369-82.

BAUGHMAN RP, GUNTHER KL, RASHKIN MC, KEETON DA, PATTISHALL EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. **Am J Respir Crit Care Med**, 1996;154:76-81.

BAYDUR A, BEHRAKIS PK, ZIN WA. A simple method for assessing the validity of esophageal balloon technique. **Am Rev Resp Dis**, 1982;126:788-91.

BEEKLEY MD, CULLOM DL, BRECHUE WF. Hypercapnic impairment of neuromuscular function is related to afferent depression. **Eur J Appl Physiol**, 2004;91:105-10.

BELLINGAN GJ. The pulmonary physician in critical care 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. **Thorax**, 2002;57:540-46.

[BELPERIO JA](#), [KEANE MP](#), [LYNCH JP RD](#), [STRIETER RM](#). The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. **Semin Respir Crit Care Med**, 2006;27(4):350-64.

BENEDETTI A, DI SARIO A, SVEGLIATI BG, JEZEQUEL AM. Transforming growth factor beta 1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular pH in isolated periportal and perivenular rat hepatocytes. **Hepatology**, 1995;22:1488-98.

BERNARD GR, ARTIGAS A, BRIGHAM KL, CARLET J, FALKE K, HUDSON L, LAMY M, LEGALL JR, MORRIS A, SPRAGG R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, 1994;149:818-24.

BHATIA M, BRADY M, SHOKUHI S, CHRISTMAS S, NEOPTOLEMOS JP, SLAVIN J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **J Phatol**, 2000; 190:117-25.

BHATIA M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Drug Targets – Infl Allergy**, 2002;1:343-51.

BIDANI A, TZOUANAKIS AE, CARDENAS VJJR, ZWISCHENBERGER JB. Permissive hypercapnia in acute respiratory failure. **JAMA**, 1994;272:957-62.

BOYNTON BR, HAMMOND MD. Pulmonary gas exchange: basic principles and the effects of mechanical ventilation In: Boynton B, Carlo WA, Jobe A (eds). New Therapies for neonatal respiratory failure: a physiologic approach. **Cambridge University Press: Cambridge**, England, 1994;115-29.

BROCHARD L, LEMAIRE F. Tidal volume, positive end expiratory pressure and mortality in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, 1999;27:1661–63.

[BROEKELMANN TJ](#), [LIMPER AH](#), [COLBY TV](#), [MCDONALD JA](#). Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **Proc Natl Acad Sci**, U S A, 1991;88:6642-46.

BROGAN TV, HEDGES RG, MCKINNEY S, ROBERTSON HT, HLASTALA MP, SWENSON ER. Pulmonary NO synthase inhibition and inspired CO₂: Effects on V/Q and pulmonary blood flow distribution. **Eur Respir**, J 2000; 16: 288–95.

BRUN-BRUISSON C, MINELLI C, BERTOLINI G, PIMENTEL J, LEWANDOWSKI K, BION J, ROMAND JA, VILLAR J, THORSTEINSSON A, DAMAS P, ARMAGANIDIS A,

LEMAIRE F. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units; results from the ALIVE study. **Intensive Care Med**, 2004; 30:51-61.

[BUCZEK-THOMAS JA](#), [LUCEY EC](#), [STONE PJ](#), [CHU CL](#), [RICH CB](#), [CARRERAS I](#), [GOLDSTEIN RH](#), [FOSTER JA](#), [NUGENT MA](#). Elastase mediates the release of growth factors from lung *in vivo*. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2004;31:344–50.

BURLESON BS, MAKI ED. Acute Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Pharmacy Practice**, 2005;18(2):118-31.

BUSHINSKY DA, LAM BC, NESPECA R, SESSLER NE, GRYNPAS MD. Decreased bone carbonate content in response to metabolic, but not respiratory, acidosis. **Am J Physiol**, 1993;265:530-36.

CARLO WA. Permissive hypercapnia and permissive hypoxemia in neonates. **Journal of Perinatology**, 2007;27:64-70.

CARLTON DP, CUMMINGS JJ, SCHEERER RG, POULAIN FR, BLAND RD. Lung overexpression increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. **J Appl Physiol**, 1990;69:577-83.

[CARVALHO CR](#), [BARBAS CS](#), [MEDEIROS DM](#), [MAGALDI RB](#), [LORENZI FILHO G](#), [KAIRALLA RA](#), [DEHEINZELIN D](#), [MUNHOZ C](#), [KAUFMANN M](#), [FERREIRA M](#), [TAKAGAKI TY](#), [AMATO MB](#). Temporal hemodynamic effects of permissive hypercapnia associated with ideal PEEP in ARDS. **Am J Respir Critical Care Med**, 1997;156(5):1458-66.

CHANG HK, MORTOLA JP. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**, 1981;51:218-25.

CHECKLEY W, BROWER R, KORPAK A, TAYLOR THOMPSON B, AND FOR THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK INVESTIGATORS. Effects of a Clinical Trial on Mechanical Ventilation Practices in Patients with Acute Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 2008;177:1215–22.

[CHOLLET-MARTIN S](#), [JOURDAIN B](#), [GIBERT C](#), [ELBIM C](#), [CHASTRE J](#), [GOUGEROT-POCIDALO MA](#). Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. **Am J Resp Crit Care Med**, 1996;154:594-601.

COAKLEY RJ, TAGGART C, GREENE C, MCELVANEY NG, O'NEILL SJ. Ambient pCO₂ modulates intracellular pH, intracellular oxidant generation, and interleukin-8 secretion in human neutrophils. **J Leukoc Biol**, 2002a;71:603-10.

COAKLEY RJ, TAGGART C, MCELVANEY NG, O'NEILL SJ. Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. **Blood**, 2002b;100:3383-91.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 2002;420:885-91.

COKER RW, LAURENT GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. **Eur Respir**, 1998; 11:1218-21.

[CONTADOR RS](#), [CHAGAS PS](#), [VASCONCELLOS FP](#), [FEIJÓO M](#), [FAFFE DS](#), [ROCCO PR](#), [ZIN WA](#). Evaluation of respiratory mechanics and lung histology in a model of atelectasis. **Respir Physiol Neurobiol**, 2003;14:137(1):61-68.

[CORBRIDGE TC](#), [WOOD LD](#), [CRAWFORD GP](#), [CHUDOBA MJ](#), [YANOS J](#), [SZNAJDER JL](#). Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration. **Am Rev Respir Dis**, 1990;142:311-15.

COSTELLO J, HIGGINS B, CONTRERAS M, NI CHONGHAILE M, HASSETT P, O'TOOLE D, LAFFEY JG. [Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis](#). **Crit Care Med**, 2009; 37.

CULLEN DJ, EGER EL. Cardiovascular effects of carbon dioxide in man. **Anesthesiology**, 1974;41:345-49.

DE HEMPTINNE Q, REMMELINK M, BRIMIOULLE S, SALMON L, VINCENT JL. ARDS: a Clinicopathologic Confrontation. **Chest**, 2009;135(4):944-9.

DELAVAL PM, GILLESPIE DJ. Pulmonary dysfunction during paraquat-induced lung injury: a model of acute alveolar injury. **Crit Care Med**, 1985;13:1056-60.

DOS SANTOS CC. [Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury](#). **Intensive Care Med**, 2008;34(4):619-30.

DOS SANTOS CC, SLUTSKY A. The Contribution of Biophysical Lung Injury to the Development of Biotrauma. **Ann Rev Physiol**, 2006;68:19.1-34.

DREYFUSS D, SAUMON G. Role of tidal volume, FRC, and end-expiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. **Am Rev Respir Dis**, 1993;148:1194-203.

[DRIES DJ](#), [MARINI AJ](#). A rationale for lung recruitment in acute respiratory distress syndrome. **J Trauma**, 2003;54(2):326-28.

DUBE DS. Influence of overweight on ICU mortality: a prospective study. **Chest**, 2005;127:683-84.

[EISSA NT](#), [RANIERI VM](#), [CORBEIL C](#), [CHASSÉ M](#), [ROBATTO FM](#), [BRAIDY J](#), [MILIC-EMILI J](#). Analysis of behavior of the respiratory system in ARDS patients: effects of flow, volume, and time. **J Appl Physiol**, 1991;70(6):2719-29.

ERICKSON SE, MARTIN GS, DAVIS JL, MATTHAY MA, EISNER MD; NIH NHLBI ARDS NETWORK. [Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005](#). **Crit Care Med**, 2009;37(5):1574-79.

[ESTENSSORO E](#), [DUBIN A](#), [LAFFAIRE E](#), [CANALES HS](#), [SÁENZ G](#), [MOSEINCO M](#), [BACHETTI P](#). Impact of positive end-expiratory pressure on the definition of acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, 2003;29:1936-42.

FABISIAK JP, KAGAN VE, TYURINA YY, TYURIN VA, LAZO JS. Paraquat-induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. **Am J Physiol**, 1998;274:793-802.

FRANK JA, GUTIERREZ JA, JONES KO, ALLEN L, OOBBS L, MATTHAY MA. Low Tidal Volume Reduces Epithelial and Endothelial Injury in Acid-injured Rat Lungs. **Am J Respir Crit Care Med**. 2002;165:242-49.

FRICK KK, JIANG L, BUSHINSKY DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. **Am J Physiol**, 1997;272:1450-56.

[FERGUSON ND](#), [KACMAREK RM](#), [CHICHE JD](#), [SINGH JM](#), [HALLETT DC](#), [MEHTA S](#), [STEWART TE](#). Screening of ARDS patients using standardized ventilator settings: Influence on enrollment in a clinical trial. **Intensive Care Med**, 2004;30:1111-16.

[FU Z](#), [COSTELLO ML](#), [TSUKIMOTO K](#), [PREDILETTO R](#), [ELLIOTT AR](#), [MATHIEU-COSTELLO O](#), [WEST JB](#). High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. **J Appl Physiol**, 1992;73:123-33.

[FUJISHIMA S](#), [MORISAKI H](#), [ISHIZAKA A](#), [KOTAKE Y](#), [MIYAKI M](#), [YOH K](#), [SEKINE K](#), [SASAKI J](#), [TASAKA S](#), [HASEGAWA N](#), [KAWAI Y](#), [TAKEDA J](#), [AIKAWA N](#). Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients. **Biomed. Pharmacother**, 2008;62:333–38.

FUKUDA Y, ISHIZAKI M, MASUDA G, KIMURA G, KAWANAMI O, MASUGI Y. The role of intraalveolar of fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. **Am J Pathol**, 1987;126:171-82.

[GATTINONI L](#), [PRESENTI A](#), [TORRESIN A](#), [BAGLIONI S](#), [RIVOLTA M](#), [ROSSI F](#), [SCARANI F](#), [MARCOLIN R](#), [CAPPELLETTI G](#). Adult respiratory distress syndrome profiles by computed tomography. **J Thorac Imaging**, 1986;1:25-30.

[GATTINONI L](#), [BOMBINO M](#), [PELOSI P](#), [LISSONI A](#), [PESENTI A](#), [FUMAGALLI R](#), [TAGLIABUE M](#). Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. **JAMA**, 1994;271:1772-79.

[GATTINONI L](#), [CHIUMELLO D](#), [CRESSONI M](#), [VALENZA F](#). Pulmonary computed tomography and adult respiratory distress syndrome. **Swiss Med Wkly**, 2005;135:169-74.
[GATTINONI L](#), [CAIRONI P](#), [VALENZA F](#), [CARLESSO E](#). [The role of CT-scan studies for the diagnosis and therapy of acute respiratory distress syndrome](#). **Clin Chest Med**, 2006; 4:559-70.

[GAVRIELI Y](#), [SHERMAN Y](#), [BEM-SASSON AS](#). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, 1992;119:4993-50.

[GIRI SN](#), [HYDE DM](#), [HOLLINGER MA](#). Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. **Thorax**, 1993;48:959-66.

[GOODMAN LR](#). Congestive heart failure and adult respiratory distress syndrome. New insights using computed tomography. **Radiol Clin North Am**, 1996;34:33-46.

[GREGORY TJ](#), [LONGMORE WJ](#), [MOXLEY MA](#), [WHITSETT JA](#), [REED CR](#), [FOWLER AA RD](#), [HUDSON LD](#), [MAUNDER RJ](#), [CRIM C](#), [HYERS TM](#). Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, 1991;88:1976-81.

[GRIFFITHS MJD](#), [EVANS TW](#). Adult respiratory distress syndrome. In: [Brewis RAL](#), [Corrin B](#), [Geddes DM](#), [Gibson GJ](#), eds. **Respiratory medicine**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995;605-29.

[GROSSMAN RF](#), [JONES JG](#), [MURRAY JF](#). Effects of oleic acid-induced pulmonary edema on lung mechanics. **J Appl Physiol**, 1980;48:1045-51.

GU Q, LEE LY. Alveolar hypercapnia augments pulmonary C-fiber responses to chemical stimulants: role of hydrogen ion. **J Appl Physiol**, 2002; 93:181-88.

GUNTHER A, MOSAVI P, HEINEMANN S. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia: comparison with the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 2000;161:454–62.

GUPTA R, HAYDOCK T. Severe hypercapnia caused by acute heroin overdose. **Ann Emerg Med**, 2004; 43:665–66.

HAAS F, BERGOFSKY EH. Effect of pulmonary vasoconstriction on balance between alveolar ventilation and perfusion. **J Appl Physiol**, 1968;24:491-97.

HACKAM DJ, GRINSTEIN S, NATHENS A, WATSON WG, MARSHALL JC, ROTSTEIN OD. Exudative neutrophils show impaired pH regulation compared with circulating neutrophils. **Arch Surg**, 1996;131:1296-1301.

[HALTER JM](#), [STEINBERG JM](#), [GATTO LA](#), [DIROCCO JD](#), [PAVONE LA](#), [SCHILLER HJ](#), [ALBERT S](#), [LEE HM](#), [CARNEY D](#), [NIEMAN GF](#). Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. **Critical Care**, 2007;11:20.

[HAMILTON PP](#), [ONAYEMI A](#), [SMYTH JA](#), [GILLAN JE](#), [CUTZ E](#), [FROESE AB](#), [BRYAN AC](#). Comparison of conventional and high-frequency ventilation: oxygenation and lung pathology. **J Appl Physiol**, 1983;55:131-38.

HAN SR, HO CS, JIN CH, LIU CC. Unexpected intraoperative hypercapnia due to undetected expiratory valve dysfunction: A case report. **Acta Anaesthesiol Sin**, 2003; 41:215–18.

[HAYAKAWA M](#), [KATABAMI K](#), [WADA T](#), [SUGANO M](#), [HOSHINO H](#), [SAWAMURA A](#), [GANDO S](#). Sivelestat (selective neutrophil elastase inhibitor) improves the mortality rate of sepsis associated with both ARDS and DIC patients. **Shock**, 2009; May 18.

HICKLING KG, HENDERSON SJ, JACKSON R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, 1990;16:372-77.

[HICKLING KG](#), [WALSH J](#), [HENDERSON S](#), [JACKSON R](#). Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. **Crit Care Med**, 1994;22(10):1568-78.

HICKLING KG, WRIGHT T, LAUBSCHER K, TOWN IG, TIE A, GRAHAM P, MONTEATH J, A'COURT G. Extreme hypoventilation reduces ventilator-induced lung injury during ventilation with low positive end-expiratory pressure in saline-lavaged rabbits. **Crit Care Med**, 1998;26:1690–97.

HICKLING KG: Permissive hypercapnia. **Respir Care Clin North Am**, 2002; 8:155–69.

HONAN D, LAFFEY JG, HOPKINS N, BOYLAN JF, MCLOUGHLIN P. Therapeutic hypercapnia attenuates endotoxin induced acute lung injury. **Am J Resp Crit Care Med**, 2002;165:383.

[HOWES TQ](#), [DEANE CR](#), [LEVIN GE](#), [BAUDOUIN SV](#), [MOXHAM J](#). The effects of oxygen and dopamine on renal and aortic blood flow in chronic obstructive pulmonary disease with hypoxemia and hypercapnia. **Am J Respir Crit Care Med**, 1995;151:378-83.

IDELL S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Crit Care Med**, 2003;31:213–20.

INGENITO EP, MARK L. DAVISON B. Effects of acute lung injury on dynamic tissue properties. **J Appl Physiol**, 1994;77:2689-97.

INGRAM RH. Effects of airway versus arterial CO₂ changes on lung mechanics in dogs. **J Appl Physiol**, 1975;38:603-07.

JABER S, JUNG B, SEBBANE M, RAMONATXO M, CAPDEVILA X, MERCIER J, ELEDJAM JJ, MATECKI S. Alteration of the piglet diaphragm contractility *in vivo* and its recovery after acute hypercapnia. **Anesthesiology**, 2008;108:651–58.

[KALLET RH](#), [SIOBAL MS](#), [ALONSO JA](#), [WARNECKE EL](#), [KATZ JA](#), [MARKS JD](#). Lung collapse during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. **Respir Care**, 2001;46(1):49-52.

KAVANAGH BP, LAFFEY JG. Hypercapnia permissive and therapeutic. **Minerva Anesthesiol**, 2006;72:567-76.

KILBURN KH, DOWELL AR. Renal function in respiratory failure. Effects of hypoxia, hyperoxia, and hypercapnia. **Arch Intern Med**, 1971;127(4):754-62.

KOCHI T, OKUBO S, ZIN WA, MILIC-EMILI J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, 1988a;64:441-50.

KOCHI T, OKUBO S, ZIN WA, MILIC-EMILI J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol**, 1988b;64:2636-46.

[KOLTON M](#), [CATTRAN CB](#), [KENT G](#), [VOLGYESI G](#), [FROESE AB](#), [BRYAN AC](#). Oxygenation during high frequency ventilation compared with conventional mechanical ventilation two models of injury. **Anesth Analg**, 1982;61:323-32.

[KOMORI M](#), [TAKADA K](#), [TOMIZAWA Y](#), [NISHIYAMA K](#), [KAWAMATA M](#), [OZAKI M](#). Permissive range of hypercapnia for improved peripheral microcirculation and cardiac output in rabbits. **Crit Care Med**, 2007;35(9):2171-75.

[KREGENOW DA](#), [RUBENFELD GD](#), [HUDSON LD](#), [SWENSON ER](#). Hypercapnic acidosis and mortality in acute lung injury. **Critical Care Med**, 2006;34(1):1-7.

[KUWAHARA I](#), [LILLEHOJ EP](#), [HISATSUNE A](#), [LU W](#), [ISOHAMA Y](#), [MIYATA T](#), [KIM KC](#). Neutrophil elastase stimulates MUC1 gene expression through increased Sp1 binding to the MUC1 promoter. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;289:355-62.

LAFHEY JG, TANAKA M, ENGELBERTS D, LUO X, YIANG S, TANSWELL TK, POST LINDSAY T, KAVANAGH BP. Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following *in vivo* lung reperfusion. **Am J Respir Crit Care Med**, 2000a;162:2287-94.

LAFHEY JG, ENGELBERTS D, KAVANAGH BP. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. **Am J Resp Crit Care Med**, 2000b;161:141-46.

[LAFHEY JG](#), [JANKOV RP](#), [ENGELBERTS D](#), [TANSWELL AK](#), [POST M](#), [LINDSAY T](#), [MULLEN JB](#), [ROMASCHIN A](#), [STEPHENS D](#), [MCKERLIE C](#), [KAVANAGH BP](#). Effects of therapeutic hypercapnia on mesenteric ischemia-reperfusion injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 2003;168:1383-90.

LAFHEY JG, HONAN D, HOPKINS N, HYVELIN JM, BOYLAN JF, MCLOUGHLIN P. Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 2004;169:46-56.

[LAMB NJ](#), [GUTTERIDGE JM](#), [BAKER C](#), [EVANS TW](#), [QUINLAN GJ](#). Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. **Crit Care Med**, 1999;27:1738-44.

LANG CJ, DONG P, HOSSZU EK, DOYLE IR. Effect of CO₂ on LPS-induced cytokine responses in rat alveolar macrophages. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;289:96-103.

LEBLEBICIOGLU B, LIM JS, CARIO AC, BECK FM, WALTERS JD. pH changes observed in the inflamed gingival crevice modulate human polymorphonuclear leukocyte activation *in vitro*. **J Periodontol**, 1996;67:472-77.

[LEE CT](#), [FEIN AM](#), [LIPPMANN M](#), [HOLTZMAN H](#), [KIMBEL P](#), [WEINBAUM G](#). Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. **N Engl J Med**, 1981;304:192-96.

[LIN CY](#), [ZHANG H](#), [CHENG KC](#), [SLUTSKY AS](#). Mechanical ventilation may increase susceptibility to the development of bacteremia. **Crit Care Med**, 2003;31(5):1429-34.

[LIU D](#), [MARTINO G](#), [THANGARAJU M](#), [SHARMA M](#), [HALWANI F](#), [SHEN SH](#), [PATEL YC](#), [SRIKANT CB](#). Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. **J Biol Chem**, 2000;275:9244-50.

LIU Y, CHACKO BK, RICKSECKER A, SHINGAREV R, ANDREWS E, PATEL RP, LANG JR JD. Modulatory effects of hypercapnia on *in vitro* and *in vivo* pulmonary endothelial-neutrophil adhesive responses during inflammation. **Cytokine**, 2008;44(1):108-17.

LORING SH, ELLIOTT EA, DRAZEN JM. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**, 1979;156(1):33-42.

MACNEE W. Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part two. **Am J Respir Crit Care Med**, 1994;150(4):1158-68.

MALHOTRA A. Low-tidal-volume ventilation in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 2007;357:1113-20.

[MANCEBO J](#), [FERNÁNDEZ R](#), [BLANCH L](#), [RIALP G](#), [GORDO F](#), [FERRER M](#), [RODRÍGUEZ F](#), [GARRO P](#), [RICART P](#), [VALLVERDÚ I](#), [GICH I](#), [CASTAÑO J](#), [SAURA P](#), [DOMÍNGUEZ G](#), [BONET A](#), [ALBERT RK](#). A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med** 2006;173:1233–39.

MARSHALL RP, BELLINGAN G, WEBB S, PUDDICOMBE A, GOLDSACK N, MCANULTY RJ, LAURENT GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. **Am J Respir Crit Care Med**, 2000, 162:1783-88.

[MATSUBARA O](#), [TAMURA A](#), [OHDAMA S](#), [MARK EJ](#). Alveolar basement membrana breaks down in diffuse alveolar damage:an immunohistochemical study. **Pathol Int**, 1995;45:473-82.

MATSUYAMA S, LLOPIS J, DEVERAUX QL, TSIEN RY, REED JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. **Nat Cell Biol**, 2000;2:318-25.

MCCULLOCH PR, FORKERT PG, FROESE AB. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency in surfactant deficient rabbits. **Am Rev Respir Dis**, 1988;137:1185-92.

MCINTYRE RC JR, HAENEL JB, MOORE FA, READ RR, BURCH JM, MOORE EE. Cardiopulmonary effects of permissive hypercapnia in the management of adult respiratory distress syndrome. **J Trauma**, 1994;37:433-38.

MEADE MO, COOK DJ, GRIFFITH LE, HAND LE, LAPINSKY SE, STEWART TE, KILLIAN KJ, SLUTSKY AS, GUYATT GH. [A study of the physiologic responses to a lung recruitment maneuver in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome](#). **Respir Care**, 2008;53(11):1441-49.

MEDURI GU. Host defense response and outcome in ARDS. **Chest**, 1997;112(5):1154-58.

MENEZES SL, BOZZA PT, NETO HC, LARANJEIRA AP, NEGRI EM, CAPELOZZI VL, ZIN WA, ROCCO PR. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **J Appl Physiol**, 2005; 98:1777–83.

MERCAT A, RICHARD JC, VIELLE B, JABER S, OSMAN D, DIEHL JL, LEFRANT JY, PRAT G, RICHECOEUR J, NIESZKOWSKA A, GERVAIS C, BAUDOT J, BOUADMA L, BROCHARD L; EXPIRATORY PRESSURE (EXPRESS) STUDY GROUP. [Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial](#). **JAMA**, 2008;299(6):646-55.

MILBERG JA, DAVIS DR, STEINBERG KP, HUDSON LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS):1983-1993. **JAMA**, 1995;273(4):306-09.

MOLONEY ED, GRIFFITHIS MJ. Protective ventilation of patients with acute respiratory distress syndrome. **Br J Anaesth**, 2004;92(2):261-70.

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

[MUSCEDERE JG](#), [MULLEN JB](#), [GAN K](#), [SLUTSKY AS](#). Tidal ventilation at low airway pressure can augment lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 1994;146:1327-34.

[NAGASE T](#), [LEI M](#), [ROBATTO FM](#), [EIDELMAN DH](#), [LUDWIG MS](#). Tissue viscance during induced constriction in rabbit lungs: morphological-physiological correlations. **J Appl Physiol**, 1992;73(5):1900-07.

NAKAHATA K, KINOSHITA H, HIRANO Y, KIMOTO Y, IRANAMI H, HATANO Y. Mild hypercapnia induces vasodilation via adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in parenchymal microvessels of the rats cerebral cortex. **Anesthesiology**, 2003;99:1333-39.

NI CHONGHAILE M, HIGGINS BD, COSTELLO J, LAFFEY JG. Hypercapnic acidosis attenuates lung injury induced by established bacterial pneumonia. **Anesthesiology**, 2008a;109:837-48.

NI CHONGHAILE M, HIGGINS BD, COSTELLO J, LAFFEY JG. Hypercapnic acidosis attenuates severe acute bacterial pneumonia-induced lung injury by a neutrophil-independent mechanism. **Crit Care Med** 2008b; 36:3135-44.

O'CROININ DF, HOPKINS NO, MOORE MM, BOYLAN JF, MCLOUGHLIN P, LAFFEY JG. Hypercapnic acidosis does not modulate the severity of bacterial pneumonia-induced lung injury. **Crit Care Med**, 2005;33:2606-12.

O'CROININ DF, NICHOL AD, HOPKINS N, BOYLAN J, O'BRIEN S, O'CONNOR C, LAFHEY JG, MCLOUGHLIN P. Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. **Crit Care Med**, 2008; 36:2128–35.

[PARK WY](#), [GOODMAN RB](#), [STEINBERG KP](#), [RUZINSKI JT](#), [RADELLA F 2ND](#), [PARK DR](#), [PUGIN J](#), [SKERRETT SJ](#), [HUDSON LD](#), [MARTIN TR](#). Cytoquines balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Resp Crit Care Med**, 2001;164:1896-903.

PARK CM, LIM SC, KIM YI, KIM KS, OH IJ, KIM OS, KIM YC. Does hypercapnic acidosis, induced by adding CO₂ to inspired gas, have protective effect in a ventilator-induced lung injury?. **J Korean Med Sci**, 2005;20:764-69.

PARKER JC, HERNANDEZ LA, LONGENECKER GL, PEEVY K, JOHNSON W. Lung edema caused by high peak inspiratory pressure in dogs: role of increased microvascular filtration pressure and permeability. **Am Rev Respir Dis**, 1990;142:321-28.

PÁSSARO CP, SILVA PL, RZEZINSKI AF, ABRANTES S, SANTIAGO VR, NARDELLI L, SANTOS RS, BARBOSA CM, MORALES MM, ZIN WA, AMATO MB, CAPELOZZI VL, PELOSI P, ROCCO PR. [Pulmonary lesion induced by low and high positive end-expiratory pressure levels during protective ventilation in experimental acute lung injury](#). **Crit Care Med**, 2009;37(3):1011-17.

PELOSI P, ROCCO PR, NEGRINI D, PASSI A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. [An Acad Bras Cienc](#), 2007;79(2):285-97.

PELOSI P, ROCCO PR. [Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix](#). **Intensive Care Med**, 2008;34(4):631-39.

PETRUCCI N, IACOVELLI W. Ventilation with smaller tidal volumes: a quantitative systematic review of randomized controlled trials. **Anesth Analg**, 2004;99(1):193-200.

PHUA J, STEWART TE, FERGUSON ND. Acute respiratory distress syndrome 40 years later: Time to revisit its definition. **Crit Care Med**, 2008;36:2912-21.

PIANTADOSI CA, SCHWARTZ DA. The Acute respiratory distress Syndrome. **Ann Intern Med**, 2004;141:460-70.

PILOTTO DE CARVALHO ME, DOLHNIKOFF M, MEIRELES SI, LIMA REIS LF, MARTINS MA, DEHEINZELIN D. Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. **Critical Care**, 2007;11(1):R23.

PUNEET P, MOOCHHALA S, BHATIA M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;288:3-15.

RAGHU G, STRIKER L, HUDSON LD, STRIKER GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. **Am Rev Respir Dis**, 1985;131:281-89.

RAI S, ENGELBERTS D, LAFFEY JG, FREVERT C, KAJIKAWA O, MARTIN TR, MARTIN POST, KAVANAGH BP. Therapeutic hypercapnia is not protective in the *in vivo* surfactant-depleted rabbit lung. **Pediatric Res**, 2004;55:42-49.

REHNCRONA S, HAUGE HN, SIESJO BK. Enhancement of iron-catalyzed radical formation by acidosis in brain homogenates: difference in effect by lactic acid and CO₂. **J Cereb Blood Flow Metab**, 1989;9:65-70.

REUTERSHAN J, LEY K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome-how neutrophils migrate into the lung. **Crit Care**, 2004;8:453-61.

[ROCCO PR, NEGRI EM, KURTZ PM, VASCONCELLOS FP, SILVA GH, CAPELOZZI VL, ROMERO PV, ZIN WA.](#) Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 2001;164(6):1067-71.

ROCCO PR, ZIN WA. Experimental models of acute lung injury. Anesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine 2002; **Springer-Verlag**, Milao.175-91.

ROCCO PR, MOMESSO DP, FIGUEIRA RC, FERREIRA HC, CADETE RA, LEGORAMACHADO A, KOATZ VL, LIMA LM, BARREIRO EJ, ZIN WA. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **Eur Respir J**, 2003;22:20-27.

ROCCO PR, FACCHINETTI LD, FERREIRA HC, NEGRI EM, CAPELOZZI VL, FAFTE DS, ZIN WA. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, 2004;12;143(1):49-61.

ROCCO PR, ZIN WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different ?. **Curr Opin Crit Care**, 2005;11:10-17.

ROCCO PR, PELOSI P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? **Curr Opin Crit Care**, 2008;14(1):50-55.

ROOS A, BORON WF. Intracellular pH. **Physiol Rev**, 1981;61:296-434.

ROTTA AT, STEINHORN DM. Is permissive hypercapnia a beneficial strategy for pediatric acute lung injury?. **Respir Care Clin N Am**, 2006;12(3):371-87.

[ROUBY JJ](#), [PUYBASSET L](#), [NIESZKOWSKA A](#), [LU Q](#). Acute respiratory distress syndrome: lessons from computed tomography of the whole lung. **Crit Care Med**, 2003;31:285-95.

[ROUPIE E](#), [DAMBROSIO M](#), [SERVILLO G](#), [MENTEC H](#), [EL ATROUS S](#), [BEYDON L](#), [BRUN-BUISSON C](#), [LEMAIRE F](#), [BROCHARD L](#). Titration of tidal volume and induced hypercapnia in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 1995;152:121-28.

RUBENFELD GD. Epidemiology of acute lung injury. **Crit Care Med**, 2003;31(4 Suppl):276-84.

RUBENFELD GD, CALDWELL E, PEABODY E, WEAVER J, MARTIN DP, NEFF M, STERN EJ, HUDSON LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**, 2005;353:1685-93.

[SANDHAR BK](#), [NIBLETT DJ](#), [ARGIRAS EP](#), [DUNNILL MS](#), [SYKES MK](#). Effects of positive end-expiratory pressure on hyaline membrane formation in a rabbit model of the neonatal respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, 1998;14:538-46.

SANTOS FB, NAGATO IKS, BOECHEM NM, NEGRI EM, GUIMARÃES A, CAPELOZZI VL, FAFTE DS, ZIN WA, ROCCO PRM. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol**, 2006;100:98-106.

[SERRANO CV JR](#), [FRATICELLI A](#), [PANICCIA R](#), [TETI A](#), [NOBLE B](#), [CORDA S](#), [FARAGGIANA T](#), [ZIEGELSTEIN RC](#), [ZWEIER JL](#), [CAPOGROSSI MC](#). pH dependence of neutrophil-endothelial cell adhesion and adhesion molecule expression. **Am J Physiol**, 1996;271:962-70.

SHIBATA K, CREGG N, ENGELBERTS D, TAKEUCHI A, FEDORKO, KAVANAGH BP. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. **Am J Resp Crit Care Med**, 1998;158:1578-84.

SILBERNAGL S, DESPOPOULOS A. Fisiologia texto e atlas. 7ª ed revisada. Porto Alegre: **Artmed**, 2009.

SILVEIRA KSO, BARBOSA A M, BARBOZA AB, MELO PA, MORAES VG, ROCCO PRM, SILVA PRM, ZIN WA. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by Bothrops jararaca venom. [Respir Physiol Neurobiol](#), 2004;139(2):167-77.

SMITH P, HEALTH D, KAY JM. The pathogenesis and structure of paraquatinduce lung fibrosis in rats, **J Pathol**, 1974;114:57-67.

SIMCHOWITZ L, ROOS A. Regulation of intracellular pH in human neutrophils. **J Gen Physiol**, 1985; 85:443-70.

SINCLAIR SE, KREGENOW DA, LAMM WJ, STARR IR, CHI EY, HLASTALA MP. Hypercapnic acidosis is protective in an *in vivo* modelo of ventilator-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 2002;166:403-08.

SOUZA AB, BRANDÃO F DOS SANTOS, NEGRI EM, ZIN WA, ROCCO PRM. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. **J Pneumol**, 2003;29(4):1-10.

[STEIMBACK PW](#), [OLIVEIRA GP](#), [RZEZINSKI AF](#), [SILVA PL](#), [GARCIA CS](#), [RANGEL G](#), [MORALES MM](#), [LAPA E SILVA JR](#), [CAPELOZZI VL](#), [PELOSI P](#), [ROCCO PR](#). Effects of frequency and inspiratory plateau pressure during recruitment manoeuvres on lung and distal organs in acute lung injury. **Intensive Care Med**, 2009;35(6):1120-28.

[STONE JE](#), [WELLS J](#), [DRAPER WB](#), [WHITEHEAD RW](#). Changes in renal blood flow in dogs during the inhalation of 30% carbon dioxide. **Am J Physiol**, 1958;194(1):115-19.

STRIETER RM, BELPERIO JA, KEANE MP. Cytoquines in innate host defense in the lung. **J Clin Invest**, 2002;109(6):699-705.

[SUCHYTA MR](#), [CLEMMER TP](#), [ELLIOTT CG](#), [ORME JF JR](#), [WEAVER LK](#). The adult respiratory distress syndrome. A report of survival and modifying factors. **Chest**, 1992;101(4):1074-79.

SUTER PM, SUTER S, GIRARDIN E, ROUX-LOMBARD P, GRAU GE, DAYER J-M. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock or sepsis. **Am Rev Respir Dis**, 1992;145:1016–22.

SWENSON ER, ROBERTSON HT, HLASTALA MP. Effects of inspired carbon dioxide on ventilation-perfusion matching in normoxia, hypoxia, and hyperoxia. **Am J Respir Crit Care Med**, 1994;149:1563-69.

SWENSON ER. Therapeutic hypercapnic acidosis – pushing the envelope. **Am J Respir Crit Care Med**, 2004;169.

SYNENKI L, CHANDEL NS, BUDINGER RS, DONNELLY HK, TOPIN J, EISENBART J, JOVANOVIĆ B, JAIN M. Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation. **Critical Care Medicine**, 2007;35(3):842-48.

[TAKESHITA K](#), [SUZUKI Y](#), [NISHIO K](#), [TAKEUCHI O](#), [TODA K](#), [KUDO H](#), [MIYAO N](#), [ISHII M](#), [SATO N](#), [NAOKI K](#), [AOKI T](#), [SUZUKI K](#), [HIRAOKA R](#), [YAMAGUCHI K](#). Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2003;29:124-32.

[THAMMANOMAI A](#), [MAJUMDAR A](#), [BARTOLAK-SUKI E](#), [SUKI B](#). Effects of reduced tidal volume ventilation on pulmonary function in mice before and after acute lung injury. **J Appl Physiol**, 2007;103(5):1551-9.

THANGARAJU M, SHARMA K, LEBER B, ANDREWS DW, SHEN SH, SRIKANT CB. Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. **J Biol Chem**, 1999;274:29549-57.

TASKER RC, PETERS MJ. Combined lung injury, meningitis and cerebral edema: how permissive can hypercapnia be? **Intensive Care Med**, 1998;24:616-19.

[TREVANI AS](#), [ANDONEGUI G](#), [GIORDANO M](#), [LÓPEZ DH](#), [GAMBERALE R](#), [MINUCCI F](#), [GEFFNER JR](#). Extracellular acidification induces human neutrophil activation. **J Immunol**, 1999;162:4849-57.

TOBIN MJ. Advances in mechanical ventilation. **N Engl J Med**, 2001;344(26):1986-96.

TOMASHEFSKI JFJR. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med** 1990;11:593-619

VANNUCCI RC, TOWFIGHI J, HEITJAN DF, BRUCKLACHER RM, VANNUCCI SJ. Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. **Pediatr Res**, 2001;49:799-803.

VILLAR J, PEREZ-MENDEZ L, KACMAREK RM. Current definitions of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome do not reflect their true severity and outcome. **Intensive Care Med**, 1999;25:930-35.

[VILLAR J](#), [KACMAREK RM](#), [PÉREZ-MÉNDEZ L](#), [AGUIRRE-JAIME A](#). A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. **Crit Care Med**, 2006; 34:1311-18.

[VILLAR J](#), [PÉREZ-MÉNDEZ L](#), [LÓPEZ J](#), [BELDA J](#), [BLANCO J](#), [SARALEGUI I](#), [SUÁREZ-SIPMANN F](#), [LÓPEZ J](#), [LUBILLO S](#), [KACMAREK RM](#); [HELP NETWORK](#). An early PEEP/FiO₂ trial identifies different degrees of lung injury in ARDS patients. **Am J Respir Crit Care Med**, 2007;176:795–804.

XU H, CUI ZY, ZHIQIANG Q, CHUN J. Modulation of Kir 4.1 and Kir 5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. **Journal of Physiology**, 2000; 524(3):725-35.

WEBB HH, TIERNEY DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure, **Am Rev Respir Dis**, 1974;110(5):556-65.

[WEBER T](#), [TSCHERNICH H](#), [SITZWOHL C](#), [ULLRICH R](#), [GERMANN P](#), [ZIMPFER M](#), [SLADEN RN](#), [HUEMER G](#). Tromethamine buffer modifies the depressant effect of permissive hypercapnia on myocardial contractility in patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 2000;162:1361-65.

WEBSTER KA, DISCHER DJ, KAISER S, HERNANDEZ O, SATO B, BISHOPRIC NH. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. **J Clin Invest**, 1999;104:239-52.

WEIBEL ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. Models of lung disease-microscopy and structural methods, **Marcel Dekker**, New York 1990;199–247.

[WEILAND JE](#), [DAVIS WB](#), [HOLTER JF](#), [MOHAMMED JR](#), [DORINSKY PM](#), [GADEK JE](#). Lung neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. Clinical and Pathophysiologic significance. **Am Rev Respir Dis**, 1986;133:218-25.

WEINBERGER SE, SCHWARTZSTEIN RM, WEISS JW. Hypercapnia. **N Engl J Med**, 1989;321(18):1223-31.

WHEELER AP, BERNARD GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**, 2007;369:1553-65.

WIJSMAN JH, JONKER RR, KEIJZER R, VAN DE VELDE CJ, CORNELISE CJ, VAN DIERENDONCK JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. **J Histochem Cytochem**, 1993;41:7-12.

ZAPOL WM, TRELSTAD RL, COFFEY JW, TSAI I, SALVADOR RA. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. **Am Rev Respir Dis**, 1979;119:547-54.

ZILBERBERG MD, EPSTEIN SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. **Am J Respir Crit Care Med**, 1998;157:1159-64.

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](#)