

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MÔNICA DE CARVALHO MUNIZ CHAO

LESÃO ENDOTELIAL INDUZ FIBROELASTOGÊNESE EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA

RIO DE JANEIRO

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MÔNICA DE CARVALHO MUNIZ CHAO

LESÃO ENDOTELIAL INDUZ FIBROELASTOGÊNESE EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Pneumológicas.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Patricia Rieken Macedo Rocco

Rio de Janeiro

Junho 2010

MÔNICA DE CARVALHO MUNIZ CHAO

LESÃO ENDOTELIAL INDUZ FIBROELASTOGÊNESE EM MODELO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Pneumológicas.

APROVADA POR:

Prof. PhD. Patricia Rieken Macedo Rocco, Orientadora, Profa. Associada, UFRJ

Prof. PhD. José Rodolfo Rocco, Prof. Associado, UFRJ

Dra. Cristina Marcia Dias, Prof. UNISUAM

Prof. Hugo Castro Faria Neto, Pesquisador Titular, FIOCRUZ

Prof. Cristiane Baez Garcia, IBCCF, UFRJ

Prof. Eduardo Rocha, Prof. Adjunto, UFRJ

RIO DE JANEIRO
JUNHO DE 2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ).

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter iluminado o meu
caminho.

Aos meus pais Deise e Fernando,
por todo apoio e carinho para que
eu chegasse até aqui.

Ao meu noivo Henrique,
por seu amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que foram fundamentais para o meu aprendizado no laboratório, para elaboração da minha dissertação, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional:

- Prof^a Patrícia Rocco, minha orientadora, agradeço pela paciência e pela oportunidade de ter me permitido o ingresso ao laboratório, por todo conhecimento teórico e científico adquirido.
- Prof^a Vera Capelozzi e seus colaboradores, pela realização da microscopia eletrônica e auxílio na quantificação de fibras elásticas e colágenas.
- Prof^a Hugo Castro Faria Neto e Adriana Vieira-de-Abreu (FIOCRUZ), pelo auxílio na quantificação das citocinas no fluido do lavado broncoalveolar, peritoneal e sangue.
- À aluna de doutorado Mariana Genuíno, por sua ajuda durante os experimentos. Certamente, sem seu auxílio, ficaria tudo muito mais difícil.
- À aluna de mestrado Raquel Santos, por estar sempre disponível e disposta a me ajudar nos experimentos.
- Aos alunos Pedro Leme e Isabela Henriques Lucas, obrigada por tudo.
- À aluna de doutorado Andréia, que mesmo não fazendo parte do projeto propriamente dito, teve grande participação “nos bastidores”. Obrigada. Meus gráficos e minhas fotomicrografias não seriam os mesmos sem você.
- Ao André, técnico do Laboratório, obrigada pela ajuda na obtenção dos animais e pela disponibilidade em tudo que precisei.

- À Verônica, técnica do biotério, obrigada pelo cuidado aos animais.
- Obrigada a todos os meus amigos, noivo, pais, parentes, que aguentaram meus períodos de estresse e agitação.

RESUMO

CHAO, Monica de Carvalho Muniz. **Lesão endotelial prediz fibroelastogênese em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.** Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco. Resumo de Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Ciências Pneumológicas), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Este estudo testou a hipótese de que na fase precoce da lesão pulmonar aguda (LPA), a intensidade da lesão do epitélio alveolar e o grau de dano endotelial podem prever o remodelamento do parênquima pulmonar. Para esse propósito, dois modelos de lesão pulmonar aguda extrapulmonar, em camundongos BALB/c, induzidos por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPA-LPS) ou ligadura e perfuração de ceco (LPA-CLP) foram desenvolvidos. No dia 1, tais modelos apresentaram similares alterações na mecânica pulmonar, dano epitelial e inflamação intraperitoneal, entretanto o grau de lesão endotelial foi maior no grupo LPA-CLP. Um estudo temporal revelou no dia 7 que o conteúdo de fibras colágenas e elásticas, o número de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), no lavado peritoneal e sangue, e os níveis de interleucina-6, KC (análogo da IL-8 humana) e fator de crescimento transformador- α no BALF foram maiores no grupo LPA-CLP. Em conclusão, o grau de lesão do endotélio pulmonar pode afetar a intensidade da fibroelastogênese assim como o dano epitelial e a manutenção do processo inflamatório intraperitoneal.

Palavras-chave: inflamação; fibra colágena; mecânica pulmonar; endotélio; epitélio; lesão pulmonar aguda

ABSTRACT

CHAO, Monica de Carvalho Muniz. **Degree of endothelium injury promotes fibroelastogenesis in experimental acute lung injury.** Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco. Resumo de Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Ciências Pneumológicas), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

We tested the hypothesis that at the early phase of acute lung injury (ALI), the intensity of alveolar epithelium damage and the degree of endothelium injury may predict lung parenchyma remodelling. For this purpose, two models of extrapulmonary Acute lung injury, in BALB/c mice, induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide (ALI-LPS) or cecal ligation and puncture (ALI-CLP) were developed. At day 1, these models had similar degrees of lung mechanical compromise, epithelial damage, and intraperitoneal inflammation, but endothelial lesion was greater in ALI-CLP. A time course analysis revealed that at day 7, elastic and collagen fibre content, the number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), in peritoneal fluid and blood, and the levels of interleukin-6, KC (murine analogue of IL-8), and transforming growth factor- β in BALF were higher in ALI-CLP. In conclusion, the degree of endothelium injury may affect the intensity of fibroelastogenesis as well as epithelial damage and the maintenance of intraperitoneal inflammatory process.

Keywords: inflammation; collagen fibre; lung mechanics; endothelium; epithelium; acute lung injury

Rio de Janeiro

Junho 2010

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO PULMONAR AGUDA/SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO	19
1.2	ORGANIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR	21
1.3	MECANISMO DE REMODELAMENTO	23
1.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DA LESÃO PULMONAR AGUDA/SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO INDUZIDO POR SEPSE	26
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	AMOSTRA DO ESTUDO	37
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL: MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO	38
4.4	ESTUDO DA MECÂNICA PULMONAR	39
4.5	REMOÇÃO DOS PULMÕES	43
4.6	ESTUDO DA HISTOLOGIA	44
4.6.1	MICROSCOPIA ÓPTICA	44
4.6.1.1	FIXAÇÃO E PREPARO DAS LÂMINAS	44
4.6.1.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	44
4.6.2	QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS	46
4.6.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA	46
4.6.4	MICROSCOPIA CONFOCAL	48
4.7	ANÁLISE DO FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR, FLUIDO DO LAVADO PERITONEAL E PLASMA	48

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS APOPTÓTICAS	49
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6 RESULTADOS	52
6.1 MECÂNICA PULMONAR	52
6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	55
6.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA	55
6.2.1.1 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	55
6.2.1.2 FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS	58
6.3 ANÁLISE DA CELULARIDADE NO FLUIDO DO LAVADO PERITONEAL, SANGUE E LAVADO BRONCOALVEOLAR	60
6.4 ANÁLISE DA APOPTOSE DE CÉLULAS EPITELIAIS NO PULMÃO, RIM, FÍGADO E INTESTINO	63
6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	65
7 DISCUSSÃO	70
8 LIMITAÇÕES	78
9 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	106

FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão traqueal.....	41
Figura 2. Representação esquemática da montagem experimental.....	43
Figura 3. Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	45
Figura 4. Elastância estática e variação de pressão do pulmão.....	54
Figura 5. Morfometria do parênquima pulmonar.....	56
Figura 6. Fotomicrografias do parênquima pulmonar.....	57
Figura 7. Conteúdo de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar.....	59
Figura 8. Número de neutrófilos no lavado peritoneal, sangue e BALF.....	61
Figura 9. Análise das citocinas no fluido do lavado broncoalveolar.....	62
Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas do parênquima pulmonar.....	67
Figura 11. Fotomicrografias Confocal do parênquima pulmonar.....	68

TABELAS

Tabela 1. Fluxo e volume utilizados para análise da mecânica	53
Tabela 2. Escore de células epiteliais apoptóticas no pulmão, rim, fígado e intestino.....	64
Tabela 3. Escore das alterações ultraestruturais do parênquima pulmonar.....	66

QUADROS

Quadro 1. Critérios clínicos para definição de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).....	17
Quadro 2. Causas associadas ao desenvolvimento da SDRA.....	18

LISTA DE SIGLAS

ΔP = variação de pressão
 ΔV = variação de volume gasoso
Alv = alvéolo
BALF = fluido do lavado broncoalveolar
CLP = cirurgia de ligadura e perfuração do ceco
VCL = Veia centro lobular
DNA = ácido desoxirribonucléico
E = elastância
EGF = Fator de crescimento epidérmico
End = endotélio
Est = elastância estática
EM = erro padrão da média
FGF = Fator de crescimento de fibroblasto
FiO₂ = fração inspirada de oxigênio
H&E = Hematoxilina e eosina
Hp= Hepatócito
IL = interleucina
IgA = Imunoglobulina A
i.p. = intraperitoneal
i.v. = intravenoso
KC = citocina de queracínótico
L = pulmão
LBP = proteína ligante do LPS
LPA = Lesão pulmonar aguda
LPS = lipopolissacarídeo
MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno
Mb = Membrana basal
MEC = matriz extracelular
MMP = metaloproteinase
MN = mononuclear
NF- κ B = fator de transcrição- κ B
Paw = pressão nas vias aéreas
PI = pneumócito tipo I
PII = pneumócito tipo II
PaO₂ = pressão parcial arterial de oxigênio
PBS = solução fosfato tamponado
PCR = reação em cadeia da polimerase
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEEP = pressão positiva ao final da expiração
Pel = pressão de retração elástica
Pi = pressão no ponto de inflexão
PL = pressão transpulmonar
Pmáx = pressão máxima
PMN = polimorfonuclear

Pres = pressão resistiva

Ptr = pressão traqueal

R = resistência

Raw = resistência das vias aéreas

Req = resistência do equipamento

SDRA = Síndrome do desconforto respiratório agudo

TGF = Fator de crescimento transformador

TI = Tempo inspiratório

TIMP = Inibidor tecidual das metaloproteinases

TLR = *Toll like receptors*

V' = Fluxo

VT = Volume corrente

1 Introdução

A primeira publicação científica acerca da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi provavelmente, em 1821, quando LAENNEC descreveu a chamada anasarca idiopática dos pulmões caracterizada por edema pulmonar sem falência cardíaca. Em 1950, esse edema pulmonar foi intensamente estudado, porém não era feita nenhuma distinção entre causas cardíacas e não cardíacas. Em 1967, ASHBAUGH e colaboradores descreveram o quadro clínico de 12 pacientes com falência respiratória aguda, cianose refratária à oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado pulmonar difuso visualizado pela radiografia de tórax (ASHBAUGH e cols., 1967).

Em 1994, a conferência de consenso Americano-Européia definiu critérios clínicos, radiológicos e fisiológicos para o diagnóstico da SDRA, com base nos seguintes achados: I) falência respiratória de início agudo; (II) relação pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO_2)/fração inspirada de oxigênio (FiO_2) menor ou igual a 200 (independente do nível de pressão positiva ao final da expiração - PEEP); (III) infiltrados bilaterais vistos na radiografia de tórax; e (IV) pressão de oclusão da artéria pulmonar menor ou igual a 18 mmHg, quando mensurada, ou nenhuma evidência clínica de hipertensão atrial esquerda. Os critérios para a lesão pulmonar aguda (LPA) são idênticos àqueles da SDRA, exceto pela relação PaO_2/FiO_2 menor ou igual a 300, sendo a SDRA, então, a forma mais grave da LPA (Quadro 1) (BERNARD e cols., 1994).

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

Quadro 1 - Critérios clínicos para definição da lesão pulmonar aguda (LPA) e da (SDRA). PaO_2/FiO_2 : relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio.

A SDRA pode ser classificada em pulmonar, primária ou direta, quando a lesão se inicia diretamente no epitélio alveolar, e extrapulmonar, secundária ou indireta, quando a lesão inicial é no endotélio capilar resultante de uma resposta inflamatória sistêmica (ARTIGA e cols., 1998). No entanto, independente do tipo de insulto, o que caracteriza a SDRA é a perda da integridade da membrana alvéolo-capilar (PELOSI e cols., 2003; ROCCO E ZIN, 2005; ROCCO E PELOSI, 2008). Apesar de existirem vários estudos abordando a patogênese e fisiopatologia da SDRA, uma das grandes limitações desses estudos está na dificuldade em distinguir a SDRA pulmonar da extrapulmonar, já que as lesões: direta e indireta podem coexistir no mesmo indivíduo (GATTINONI e cols., 1998; ROCCO E ZIN, 2005; SANTOS e cols.; 2006, ROCCO e cols., 2008; 2009).

A mortalidade na LPA/SDRA perdura elevada (35-60%) (MACCALLUM E EVANS, 2005; ERICKSON e cols., 2009). Várias são as causas que podem acarretar LPA/SDRA, sendo a sepse a mais frequente (BERNARD e cols., 2005; RUBENFELD e cols., 2005; CALFEE e cols., 2007). A sepse com maior mortalidade é a de etiologia extrapulmonar (SEVRANSKY e cols., 2008) (Quadro 2).

LPA/SDRA PULMONAR	LPA/SDRA EXTRAPULMONAR
CAUSAS MAIS FREQUENTES	CAUSAS MAIS FREQUENTES
Pneumonia	Sepse
Aspiração de conteúdo gástrico	
CAUSAS MENOS FREQUENTES	CAUSAS MENOS FREQUENTES
Contusão pulmonar	Circulação extracorpórea
Embolia gordurosa	Toxicidade por drogas
Lesão por Inalação	Pancreatite aguda
Edema de reperfusão por transplante	Hemotransfusão

Quadro 2 - Causas associadas ao desenvolvimento da lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo ((LPA/SDRA).

1.1 Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório

A barreira alvéolo-capilar é formada por duas diferentes estruturas: o epitélio alveolar e o endotélio capilar. Acreditava-se que independente do agente agressor, através do alvéolo ou da circulação, o resultado morfofuncional final fosse similar (PELOSI e cols., 2003; ROCCO E ZIN, 2005; ROCCO E PELOSI, 2008). Entretanto, a fisiopatologia da SDRA parece diferir de acordo com o tipo de insulto primário (GATTINONI e cols., 1998; MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006, ROCCO E PELOSI, 2008).

Na lesão pulmonar direta, a primeira estrutura lesada é o epitélio alveolar (WARE E MATHAY, 2000; PELOSI e cols., 2003; ROCCO E PELOSI, 2008). O epitélio alveolar é composto por células alveolares tipo I (mais facilmente lesadas) e células alveolares tipo II (mais resistentes à lesão). As células alveolares tipo II possuem muitas funções como: produção de surfactante, transporte de íons e proliferação e diferenciação para células tipo I após a lesão (PELOSI e cols., 2003). A perda da integridade do epitélio alveolar é o principal determinante do aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, uma vez que permite a passagem de líquido contendo células inflamatórias, acarretando alterações na troca gasosa (DE HEMPTINNE e cols., 2008). A lesão do epitélio causa a ativação de macrófagos alveolares e mediadores inflamatórios iniciando um processo de inflamação pulmonar (MENEZES e cols., 2005). Ademais, há predomínio de colapso e edema alveolares e exsudato fibrinoso (HOELZ e cols., 2001; PELOSI E GATTINONI, 2001; MENEZES e cols., 2005; HUANG e cols., 2006).

Quando a etiologia é indireta, a lesão pulmonar se origina da liberação de mediadores inflamatórios de focos extrapulmonares para circulação sistêmica. A

primeira estrutura a ser lesada é o endotélio vascular pulmonar levando a aumento da permeabilidade vascular (congestão microvascular) e edema intersticial (ROCCO E ZIN, 2005; ROCCO E PELOSI, 2008).

A SDRA é também classificada didaticamente em três fases: exudativa, proliferativa e fibrótica que cursam com diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e radiológicas (MEDURI, 1996; UDOBI e cols., 2003). Na fase inicial inflamatória ou exudativa, os alvéolos apresentam-se ricos em proteínas, hemácias, neutrófilos e macrófagos e há presença de membrana hialina (WARE E MATTHAY, 2000; SOUZA e cols., 2003; ROCCO E ZIN, 2005; ROCCO E PELOSI, 2008). As membranas hialinas são mais proeminentes ao longo do ducto alveolar e são compostas por proteínas plasmáticas condensadas, que, após a lesão da barreira alvéolo-capilar, passam para o espaço alveolar (FUKUDA e cols., 1987; SCHWARZ, 2001). Na fase proliferativa, há hiperplasia e proliferação de células epiteliais tipo II, acúmulo de fibroblastos, miofibroblastos e monócitos no interstício pulmonar formando um tecido granular com deposição de colágeno (ROCCO E ZIN, 2005, SANTOS e cols., 2006), ocorrendo, dessa forma, o espessamento gradual do septo alveolar (WALLACE E DONNELLY, 2002). Os pneumócitos tipo II se multiplicam ao longo do septo alveolar para cobrir áreas desnudas da membrana basal. Fibroblastos e miofibroblastos se proliferam e migram através da fenda da membrana e converte o exudato intra-alveolar em tecido de granulação (FEIN E CALANG-COLUCCI, 2000; MENDEZ E HUBMAYR, 2005). Alguns pacientes têm resolução da SDRA nessa fase, mas outros evoluem para a fase fibrótica (FEIN e cols., 2000) onde há deposição de colágeno e formação de um tecido fibroso e denso, que causa espessamento do septo (WALLACE e cols., 2002).

Inicialmente, acreditava-se que a fase fibroproliferativa se iniciava após 1 semana do início da lesão. Hoje, já se sabe que ela se inicia em paralelo com a fase exudativa da doença (ARMSTRONG e cols., 1999; MARSHALL e cols., 2000; ROCCO e cols., 2001). Nesse contexto, ARMSTRONG e cols. (1999) evidenciaram aumento do nível de pró-colágeno I no BALF no primeiro dia de SDRA, mostrando síntese precoce de colágeno na fase inicial da lesão. MARSHALL e cols. (2000) também constataram aumento no nível de pró-colágeno III no fluido do lavado

broncoalveolar (BALF) de pacientes 24 horas após o diagnóstico da SDRA, indicando que o processo fibroproliferativo se iniciava imediatamente após o início da doença. Nesse contexto, ROCCO e colaboradores em modelo experimental de lesão pulmonar aguda observaram que havia não somente fibrose como também aumento de fibras elásticas na fase precoce da lesão (ROCCO e cols., 2001).

1.2 Organização da Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é formada por: fibras colágenas e elásticas; glicoproteínas incluindo fibronectina e laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (RAGHOW, 1994; PELOSI e cols., 2007). As fibras colágenas são os mais abundantes componentes da MEC, fortalecendo-a e organizando-a (MIJAILOVICH e cols., 1993). As principais fibras colágenas são os tipos I, II e III que são fibrilares ou intersticiais, e os tipos IV, V e VI que são não-fibrilares ou amorfos. O colágeno tipo I é produzido em grandes quantidades durante o desenvolvimento pulmonar e em reações fibróticas. A produção de colágeno varia com a extensão da lesão, proliferação de fibroblastos e intensidade da liberação de mediadores inflamatórios no parênquima pulmonar. Quando a lesão não é muito intensa a síntese de colágeno é limitada, e a arquitetura pulmonar normalmente restaurada. Quando a lesão envolve pleura, brônquio e parênquima, o reparo pode resultar em uma cicatriz focal. Já na lesão grave a cicatriz pode se generalizar e resultar em uma perda da função pulmonar (ROCCO e cols., 2001; SOUZA e cols., 2003). No pulmão sadio o *turnover* de colágeno é fundamental para a manutenção da arquitetura do tecido, ocorrendo lentamente ao longo da vida do indivíduo (ARMSTRONG e cols., 1999). Entretanto, após uma agressão inicial do tecido pulmonar, se inicia um intenso processo de reparo e remodelamento da matriz extracelular. A síntese de colágeno é induzida por diversos fatores como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento para fibroblasto (FGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β e citocinas que induzem a síntese de colágeno (IL-1 e IL-4) (MEDURI, 1999). As fibras

elásticas são sintetizadas por muitos tipos de células pulmonares incluindo condroblastos, miofibroblastos, e células do músculo liso. O sistema elástico é composto por três componentes de acordo com o conteúdo de elastina: 1) fibras oxitalânicas, composta por microfibrilas; 2) fibras elaunínicas, composta por microfibrilas e pequeno conteúdo de elastina e 3) fibras elásticas maduras, composta de microfibrila e abundante elastina (STARCHER, 2000). No septo alveolar normal, a camada sub-epitelial de fibras elásticas é composta principalmente por fibras elásticas maduras, que confere uma grande elasticidade ao tecido alveolar nas situações normais. Após a destruição do sistema de fibras elásticas maduras há uma substituição gradual por fibras imaturas (oxitalânicas) que são pobres em elastina e menos distensíveis. As fibras oxitalânicas não se alongam sob estresse mecânico e previnem alongamento excessivo do tecido, já as fibras elaunínicas apresentam propriedades elásticas intermediárias entre as fibras elásticas maduras e as oxitalânicas (MONTES, 1992).

As glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) e integrinas são importantes componentes da MEC (COTRAN e cols., 1999). A fibronectina é produzida por fibroblastos, monócitos e células endoteliais. Ela está diretamente envolvida na fixação e migração celular. A laminina é a glicoproteína mais abundante na membrana basal e se une a receptores da superfície de células específicas e outros componentes da MEC como colágeno IV e heparina. As integrinas são responsáveis pela fixação das células à MEC (COTRAN e cols., 1999).

Os proteoglicanos são substâncias gelatinosas e hidratadas, compostas por uma proteína central ligada a um ou mais polissacarídeos denominados glicosaminoglicanos (EBIHARA e cols., 2000; SOUZA e cols., 2003). Devido a sua estrutura hidrofílica, os glicosaminoglicanos podem atrair água para a MEC, alterando o turgor do tecido e as propriedades viscoelásticas da MEC. Os proteoglicanos influenciam o processo de reparo através de seus efeitos na função miofibroblástica (GARG e cols., 2003).

A MEC modula o espaço intra e intercelular, e regula mecanismos celulares como: diferenciação, proliferação, migração e adesão (CHANUT-DELALANDE e cols.,

2004). Interações mecânicas entre células e matriz extracelular têm efeitos regulatórios na fisiologia celular, levando a reorganização e remodelamento de MEC, influenciando diretamente a função pulmonar (BREEN, 2000; SUKI e cols., 2005). A matriz intersticial está organizada ao redor das células epiteliais, endoteliais e de músculos lisos. Além de sua função de dar turgor aos tecidos moles e rigidez aos tecidos esqueléticos, a MEC e, particularmente, a membrana basal, fornecem substrato no qual as células podem aderir, migrar e aí proliferar (COTRAN e cols., 1996).

Em muitas doenças intersticiais agudas e crônicas, observam-se alterações irreversíveis da histoarquitetura pulmonar. Os efeitos deletérios das células inflamatórias sobre a MEC parecem ser os principais responsáveis por tais agressões, já que enzimas proteolíticas, como as elastases e colagenases (TASAKA e cols., 2002; FUJISHIMA e cols., 2008), são liberadas pelos neutrófilos.

A manutenção da homeostase depende do equilíbrio entre síntese e degradação de componentes da matriz extracelular através das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores. As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de enzimas proteolíticas que têm a capacidade de degradar cada componente de matriz extracelular (NELSON e cols., 2000). As MMPs têm um importante papel no remodelamento da matriz extracelular, sendo produzidas em grande quantidade durante o desenvolvimento embrionário, reparo tecidual, inflamação, invasão tumoral e metástase (GOLDSTEIN, 1991). As MMPs apresentam várias funções tais como (WINKLER e cols., 2002; GREENLEE e cols., 2007):

- 1- regulação da matriz extracelular, promovendo angiogênese;
- 2- imunoproteção do pulmão através da migração de células inflamatórias para o pulmão lesado ou infectado;
- 3- degradação de colágeno tipo IV, membrana basal, elastina e, provavelmente, envolvimento no movimento epitelial através de membrana basal.

As MMPs também são importantes na remoção do excesso de proteínas, porém podem destruir a arquitetura do pulmão normal (MEDURI, 1999). Na LPA, há aumento das MMP-2 e MMP-9 (CHOI e cols., 2002; HARTOG e cols., 2003). A atividade proteolítica das MMPs é inibida pelos TIMPS (inibidores teciduais das

metaloproteinases). Os TIMPS são constituídos por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases, que são produzidos pela maioria das células mesenquimais, impedindo a ação desordenada dessas proteinases (COTRAN e cols., 1999; FLIGIEL e cols., 2006).

1.3 Mecanismos de Remodelamento

O remodelamento é um processo dinâmico que interpõe lesão inflamatória e reparo tecidual. Esse processo, passível de acontecer em todos os órgãos, tanto pode levar à reconstrução nos moldes anteriores (“tornar a modelar”) como em moldes anormais (“refazer com modificações intensas”).

O processo de remodelamento ocorre como resposta à lesão pulmonar na tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar, resultando numa interação complexa entre fibroblastos, outras células do parênquima pulmonar e macrófagos. Após a lesão pulmonar, há migração de fibroblastos para o sítio da lesão, que são estimulados a secretar colágeno e outras proteínas da matriz. No processo de remodelamento, há migração de monócitos, que quando atingem o tecido extravascular se transformam em uma célula maior, o macrófago, que é a célula mais predominante no espaço alveolar (TASAKA e cols., 2002). Além da função de defesa contra microorganismos, ele tem importante função na inflamação pulmonar e fibrose, uma vez que secretam grande número de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-4, IL-13, e diversos fatores como: PDGF, EGF e TGF- β (WARD & HUNNINGHAKE, 1998; COTRAN e cols., 1996; KREIN e cols., 2003) que influenciam a migração de células mesenquimais, proliferação, e deposição de matriz extracelular. O estímulo que ativa os fibroblastos durante o remodelamento do pulmão não é bem definido, mas inclui componentes do sangue, produtos da degradação de matriz extracelular e mediadores que são liberados dos macrófagos e células do parênquima pulmonar (WARE E MATTHAY, 2000).

O TGF- β é produzido por plaquetas e macrófagos ativados, e mais especificamente, o TGF- β 1, causa a migração e proliferação de fibroblastos,

aumento da síntese de colágeno e de fibronectina e redução na degradação da matriz extracelular por metaloproteinases (SCHWARZ, 2001; KREIN E WINSTON, 2002). Dhainaut e colaboradores mostraram que o TGF- β atuava no reparo do dano tecidual na LPA, participando como um potente mediador inibindo a ativação dos macrófagos, das células *natural killers* e células T (DHAINAUT e cols., 2003).

Os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a se proliferar para formar um tecido de granulação, característico da cicatrização, seguido de formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (COTRAN e cols., 1996). O espaço alveolar normal possui atividade fibrinolítica que se deve à presença de ativador de plasminogênio tipo uroquinase. Em pacientes com SDRA, há acúmulo de fibrina no interior do alvéolo devido à supressão dessa atividade fibrinolítica. Em contrapartida, se a fibrina permanecer, há migração de fibroblastos para a matriz de fibrina e eles passam a secretar colágeno, formando cicatrizes espessas e espaços aéreos obliterados (GALEN e cols., 1999). A fibrose pulmonar é caracterizada por alvéolos fibróticos com irregularidades na parede alveolar associada à dilatação e estreitamento dos espaços aéreos. Na fase inicial da fibrose há aumento de colágeno tipo III, que é mais flexível e sujeito à quebra e, na fase mais tardia, há predomínio do colágeno tipo I, que é mais resistente e acarreta redução na complacência pulmonar (WARE E MATTHAY; 2000; ROCCO e cols., 2003 e 2004; SANTOS e cols., 2006). Os fatores que irão determinar se ocorrerá fibrose pulmonar ou se a arquitetura pulmonar será restaurada permanecem desconhecidos, porém sabe-se que para o reparo do pulmão lesado há a necessidade de uma barreira epitelial íntegra, pois o reparo envolve complexa interação entre células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas, fatores de crescimento e pneumócitos tipo II intactos (BERTHIAUME e cols., 2001). Os pneumócitos tipo II se proliferam e se diferenciam em pneumócitos tipo I, reparando o epitélio alveolar desnudo.

A integridade da membrana celular endotelial também é extremamente importante na fisiopatologia da SDRA, uma vez que sua ruptura leva a perda da integridade endotelial, levando a ativação de neutrófilos e de seus produtos

liberados (elastase neutrofílica) e modulando o processo inflamatório (INGBAR, 2000; ZEIHNER e cols., 2004). Estudos clínicos e experimentais observaram aumento da elastase neutrofílica sendo que a inibição de sua atividade estaria relacionada à redução dos sintomas de LPA (KAWABATA e cols., 2002). A elastase neutrofílica está envolvida diretamente na destruição de células endoteliais (CARDEN e cols., 1998). Os neutrófilos que migram para uma área de inflamação são removidos por necrose, com liberação de mediadores tóxicos, ou por apoptose, com pequeno dano ao tecido (INGBAR, 2000).

A apoptose, ou seja, “morte celular programada” tem um importante papel no sistema imune e reparo tecidual na LPA/SDRA (LI e cols., 2004). Recentes estudos apontam o papel da apoptose na fisiopatologia da fibrose pulmonar e na sua fase de resolução (MARTIN e cols., 2003; TANGE e cols., 2008). Os neutrófilos apoptóticos são rapidamente fagocitados pelos macrófagos, com mínimo dano tecidual (LI e cols., 2004). Já a inibição da apoptose resulta em um número aumentado de neutrófilos, induzindo necrose e perpetuação do processo inflamatório (MATUTE-BELLO e cols., 1997). Na fase tardia da LPA, a apoptose também tem um importante papel no reparo, eliminando tecido de granulação, além de remover o excesso de pneumócito tipo II do epitélio alveolar (GALEN e cols., 1999).

1.4 Modelos experimentais de lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório induzida por sepse

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica à invasão na corrente sanguínea de microorganismos e seus produtos (KAO e cols., 2007). Mais de 40% dos pacientes com sepse desenvolvem LPA ou a sua forma mais grave a SDRA (WHEELER e cols., 1999).

O pulmão é o órgão mais freqüentemente afetado durante a sepse (PELOSI e cols.; 2003). Estudos demonstraram correlação entre o aumento da permeabilidade intestinal e lesão de órgãos distais ao foco infeccioso, acreditando-se que o comprometimento precoce do pulmão ocorre em virtude do transporte de agentes pró-inflamatórios para a circulação sistêmica via ducto torácico, já que o

leito vascular pulmonar é o primeiro a ser exposto pela linfa mesentérica (DEITCH, 2005).

Vários modelos de LPA vêm sendo desenvolvidos: endotoxina (MENEZES e cols., 2005), ligadura e perfuração do ceco (CLP) e introdução de cateter no cólon ascendente (CASP) (MAIER e cols., 2004).

Dados na literatura mostram que a patogênese da sepse, causada pela administração de LPS ou de bactérias i.v., difere daquela induzida por um foco infeccioso (CLP), como acontece em uma peritonite (HADJIMINAS e cols., 1994; VAN e cols., 1995). A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos está relacionada à quantidade do estímulo, ao local e à forma de administração (em *bolus* ou liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta de liberação dos mediadores inflamatórios (ZANTL e cols., 1998).

A endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas e é amplamente utilizado para mimetizar vários efeitos observados em pacientes com sepse, como: alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tissular, hiporresponsividade a agentes vasoconstrictores, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação (GARRIDO e cols., 2004). É um modelo prático e fácil de ser reproduzido em muitas espécies animais como: ratos, camundongos, coelhos, cachorros e primatas.

A endotoxina contém 3 diferentes partes: (1) parte interior ou lipídio A, considerada a porção tóxica da molécula; (2) polissacarídeo-O, uma variável da cadeia situada na superfície externa da molécula de endotoxina; e (3) uma região central ligando as porções internas e externas. O lipídio A tem uma estrutura mais conservadora com semelhança molecular entre as bactérias gram-negativas (JEAN-BAPTISTE, 2007). A membrana externa da bactéria gram-negativa é constituída por uma bicamada lipídica, separada do interior da membrana citoplasmática por um peptidoglicano. A molécula de LPS está encaixada na membrana externa e a porção do lipídio A da molécula serve para fixar o LPS na parede celular da bactéria (COHEN, 2002).

A ativação das células hospedeiras depende da presença de diferentes carreadores moleculares, sendo o mais importante a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP; de LPS- binding protein). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com o monócito através dos receptores de superfície celular chamados CD14 (que se encontra presente em macrófagos, monócitos e neutrófilos), e também participa da ativação de componentes na parede celular das bactérias gram-positivas como os peptídeoglicanos mediando a apoptose dos macrófagos. O CD14 pode ser encontrado ligado à superfície celular (mCD14) e também na circulação em sua forma solúvel (sCD14), sendo que os mesmos encontram-se aumentados em pacientes sépticos (COHEN, 2002).

A identificação dos Toll-Like receptors (TLRs) tem sido considerada como o maior avanço no entendimento da patogênese da inflamação (KOPP e cols., 1999). Os TLRs compreendem uma família de ligantes específicos (receptores transmembranas) para detecção de LPS e outros mediadores microbiais, que incluem fungos e bactérias (VASSELON E DETMERS, 2002; TAKEDA, 2005). Na literatura, tem sido descrito os TLR2 (responsáveis pelo reconhecimento das bactérias gram-negativas) e TLR4 (específicos para LPS) como os principais receptores na sepse (BEUTLER e cols., 2004). Os TLRs são ativados em resposta a diferentes ligantes, apesar de muitos utilizarem a via de sinalização através do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF- κ B). Eles são abundantes na superfície de macrófagos, neutrófilos e nas células epiteliais dos pulmões e intestino, atuando como um sistema de alarme para avisar a ambos os sistemas imunes (inato e adaptativo) que há infecção (TRAN e cols., 2007).

O receptor TLR4 reconhece os componentes de parede celular da bactéria gram-negativa, e a ligação entre LPS ao TLR-4 é aumentada por uma proteína MD2 (cujo exato mecanismo de ação ainda não foi completamente entendido, porém sua função parece ser o correto posicionamento do TLR4 na superfície da célula) (VISINTIN e cols., 2001; AKIRA e cols., 2006), enquanto o TLR2 reconhece os componentes de parede celular da bactéria gram-positiva (BAUMGARTEN e cols., 2006).

Após a administração de LPS há a liberação de mediadores pró-inflamatórios. A deficiência de TLR4 e CD14 protege contra a disfunção orgânica causada pelo LPS (BAUMGARTEN e cols., 2006; HUNTER, 2006). A mutação de TLR4 tem sido observada em humanos e sugere maior susceptibilidade à infecção (HOTCHKISS E KARL, 2003).

A sinalização do complexo CD14/TLR ativa o fator de transcrição nuclear (NF- κ B) através de uma série de cascatas de fosforilação estimuladas pelo mitógeno ativado pela família de proteína cinase (MAPK) (JEAN-BAPTISTE, 2007).

O NF- κ B é um fator de transcrição presente no citoplasma em forma inativa, estabilizada pela proteína inibitória do NF- κ B (I κ B α). Quando liberado, transloca-se para o núcleo e se liga a regiões específicas de genes para iniciar a transcrição de várias citocinas inflamatórias (MEDURI e cols., 1997; SUNTHARALINGAM e cols., 2006). Foi demonstrada a ativação aumentada de NF- κ B em monócitos periféricos de pacientes com sepse e em macrófagos alveolares de pacientes com SDRA estabelecida, resultando em aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e moléculas de adesão intracelular (BAEURLE E BALTIMORE, 1996).

Na sepse por bactérias gram-positivas, as proteínas dessas bactérias como o ácido lipóico e o peptidoglicano, se ligam ao CD-14 e provocam, através do TLR-2, liberação do NF- κ B (JEAN-BAPTISTE, 2007).

A barreira imunológica intestinal inclui: a população bacteriana entérica, camada mucosa com produção local de imunoglobulina (Ig) A, barreira epitelial mecânica, tecido linfático intestinal e barreira endotelial capilar (WANG e cols., 1994). Essas barreiras separam o lúmen intestinal do meio interno para prevenir a invasão de bactérias entéricas ou suas toxinas pela circulação sistêmica. Na fase precoce do choque séptico, a hipoxemia e lesões por reperfusão causam necrose dos enterócitos e danos endoteliais, permitindo a translocação das bactérias e de seus subprodutos, em função do aumento da permeabilidade (SALLES e cols., 1999). Nesse contexto, sugere-se que a translocação de bactérias e toxinas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica leva a síndrome da disfunção orgânica múltipla (ZIEGLER e cols., 1988).

Por muito tempo, vários pesquisadores reforçaram a idéia de que a passagem de bactérias e endotoxinas do intestino para a circulação sistêmica se fazia pela veia porta e esta translocação estimularia a produção de citocinas inflamatórias. Entretanto, MOORE e colaboradores não encontraram bactérias ou endotoxinas no sangue da veia porta de pacientes com trauma grave, contrapondo a idéia anterior (MOORE e cols., 1991). Posteriormente, alguns estudos evidenciaram o intestino como um órgão gerador de citocinas durante a sepse induzida por lesão intestinal, e que a microcirculação mesentérica poderia se tornar o leito primário para a circulação de neutrófilos na ausência de produtos pró-inflamatórios na circulação portal (DEITCH e cols., 1994; DEITCH, 2005). A seguir, esses produtos alcançariam a circulação sistêmica via ducto torácico, o que explicaria a SDRA de origem indireta, uma vez que o leito vascular pulmonar seria o primeiro a ser exposto à linfa mesentérica (DEITCH, 2005).

A utilização do modelo de ligadura e perfuração do ceco para o estudo da sepse foi descrito inicialmente por WICHTERMANN e colaboradores (1980) e BAKER e colaboradores (1983). É um modelo simples, de baixo custo e que mais se assemelha ao curso clínico da doença, por ser polimicrobiano, apresentando tanto bactérias gram-positivas como bactérias gram-negativas (ESMON, 2004; HUBBARD e cols., 2005). O modelo de CLP inicia uma resposta imune mais complexa do que aquela iniciada pelo LPS, já que a mistura de bactérias e os componentes distintos das mesmas podem agir sinergicamente (MANNEL, 2007).

2 Justificativa

A Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), a manifestação mais grave da lesão pulmonar aguda (LPA), é caracterizada por uma resposta inflamatória do pulmão associada a injúria na membrana alvéolo-capilar e uma fase fibroproliferativa, independente da causa inicial (DOS SANTOS e cols., 2008). Muitos pacientes com LPA/SDRA sobrevivem à fase inicial da lesão pulmonar e podem progredir para uma fase de reparo da lesão ou evolução da síndrome (ROCCO e cols., 2009). Apesar dos grandes avanços no manejo da SDRA, a mortalidade permanece alta (35-40%) (PHUA e cols., 2009). A fibrose pulmonar extensa é visto em 55% dos pacientes que morreram, (PAPAZIAN e cols., 2007), sugerindo que o reparo desordenado pode contribuir para uma maior morbidade e mortalidade desses pacientes (MARTIN e cols., 1995; DONATI & PAPAZIAN, 2008).

Os fatores determinantes se ocorrerá fibrose pulmonar ou restauração da arquitetura pulmonar normal na SDRA permanecem desconhecidos. A integridade do epitélio alveolar (MUNGER e cols., 1999; SANTOS e cols., 2006) vem sido descrita como fundamental para evitar o processo fibroproliferativo. Em conjunto com a barreira epitelial, o endotélio pulmonar medeia a mudança inicial na permeabilidade e é também crítico para o reparo e remodelamento da membrana alvéolo-capilar (ORFANOS e cols., 2004; MANIATIS e cols., 2008; LUCAS e cols., 2009). No entanto, as respostas das células endoteliais do pulmão não são totalmente definidas, embora pareçam ser as primeiras células do pulmão que se alteram na LPA/SDRA desencadeada por sepse, trauma e outras condições sistêmicas. Para o melhor entendimento a respeito do papel das células endoteliais no remodelamento do pulmão, foram desenvolvidos dois modelos de lesão pulmonar

aguda extrapulmonar com graus similares de comprometimento da mecânica pulmonar, lesão epitelial e inflamação intraperitoneal, porém com graus diferentes de lesão endotelial na fase precoce da lesão pulmonar aguda, e analisou-se a evolução temporal do remodelamento do parênquima pulmonar. Portanto, a hipótese do presente estudo é a intensidade da lesão epitelial e inflamação intraperitoneal, assim como o grau de lesão endotelial podem prever o remodelamento do parênquima pulmonar nesses modelos de lesão pulmonar aguda extrapulmonar.

3 Objetivos

Desenvolver modelos de lesão pulmonar aguda de etiologia extrapulmonar induzida por injeção intraperitoneal de LPS de *E.coli* e ligadura e perfuração do ceco (CLP) com mesmo grau de alteração na mecânica pulmonar, lesão epitelial e inflamação intraperitoneal na fase precoce da lesão, porém com graus diferentes de lesão endotelial na fase precoce da lesão; e analisar a evolução temporal do remodelamento do parênquima pulmonar.

4 Materiais e Métodos

4.1 Amostra do estudo

Um total de 136 camundongos BALB/c machos (20-25 g) provenientes do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro foram utilizados. Os animais receberam cuidados conforme as normas internacionalmente adotadas e divulgadas pelos seguintes órgãos: *International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals (CIOMS)*, *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*, *American Association of Laboratory Animal Science (AALAS)*, *Canadian Association of Laboratory Animal Science (CALAS)*, *Centre d'Information sur les Animaux de Laboratoire (CIAL)* e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com uso de animais do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ (CEUA-CCS, IBCCF 019).

Todos os animais foram alimentados com dieta padrão (ração para camundongo) e água *ad libitum*, com ciclo diário de 12 horas de exposição à luz, nos cinco dias antecedentes ao início dos experimentos, para aclimatização em suas gaiolas.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos, em 4 grupos experimentais, que foram analisados 1 e sete dias após indução da lesão.

C-LPS: Os animais receberam 0,5 ml de solução salina estéril intraperitonealmente.

C-CLP: Os animais foram submetidos a laparotomia para exposição do ceco sem ligadura e perfuração do mesmo (*sham*)

LPA-LPS: Os camundongos receberam intraperitonealmente (i.p) 125 µg de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006; LEITE-JUNIOR e cols., 2008).

LPA-CLP: Os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (HUBBARD e cols., 2005; RITTIRSCH e cols., 2009).

4.3 Protocolo experimental: Modelo de ligadura e perfuração do ceco

A lesão pulmonar aguda foi induzida através da ligadura e perfuração do ceco com objetivo de provocar uma sepse polimicrobiana com repercussões pulmonares (WICHTERMAN e cols., 1980; HUBBARD e cols., 2005; RITTIRSCH e cols., 2009). Os animais foram mantidos em jejum 16 horas antes do procedimento cirúrgico. Em seguida, utilizamos um agente anestésico de ação rápida, o Sevoflurano, por não produzir alterações pulmonares, que pudessem interferir nos resultados finais. Após a anestesia, foi realizada uma pequena incisão de cerca de 2 cm na porção inferior do abdômen, inicialmente cortando-se a camada de pele e, em seguida, a camada muscular. O ceco foi exposto e, aproximadamente 25% de sua área ligada imediatamente abaixo da válvula íleo-cecal (RITTIRSCH e cols., 2009), sempre evitando sua obstrução para que não fosse interrompido o trânsito intestinal. A área ligada do ceco foi então, puncionada uma vez com uma agulha de 18G, seguido de expressão bidigital para saída de material fecal pelos orifícios da punção para o interior da cavidade peritoneal e certificar-se de que a perfuração teria sido eficaz. O segmento intestinal foi então reposicionado para o interior da cavidade abdominal, seguido pelo fechamento por planos em dois tempos, isto é, primeiramente a camada muscular e, após, a camada de pele, utilizando-se um fio de nylon 3.0. Todos os animais receberam 1 ml de solução salina (a 0,9% NaCl) a uma temperatura de 37°C com cloridrato de tramadol (20 µg/g por kg de peso) subcutânea, após a cirurgia, para a reposição volêmica e analgesia. Ao final do procedimento, eles foram recolocados em suas gaiolas de acordo com o grupo de intervenção e receberam água e ração *ad libitum*.

No grupo *sham* (C-CLP), os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico anteriormente descrito, entretanto, o ceco foi exposto e não se realizou a ligadura e perfuração.

A medida da mecânica e da morfometria pulmonar foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), a análise da microscopia eletrônica foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e a quantificação das citocinas foi feita no Laboratório de Farmacodinâmica, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro (RJ).

4.4 Estudo da mecânica pulmonar

Os camundongos foram sedados com diazepam (5 mg i.p.), pesados (balança Filizola, Modelo BR, fabricado por Indústrias Filizola, SP, Brasil) e, em seguida, anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg i.p.). Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com 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 realizada uma pequena incisão longitudinal, medial, de aproximadamente 0,5 cm de extensão na face ventral no pescoço seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, foi realizada a traqueostomia com introdução de jelco 20G (32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno) na traquéia, e fixação, na porção proximal por meio de fios de algodão. A resistência do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal é constante até um fluxo de $26 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ e de $0.1 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{s}$. Uma vez que $R_{eq}=\Delta P/V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A pressão resistiva do equipamento ($= R_{eq}\cdot V'$) será subtraída da pressão resistiva pulmonar.

Os animais foram paralisados com a administração de brometo de pancurônio (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) e a parede torácica anterior retirada bem como o

músculo diafragma, sendo, portanto, os pulmões e o coração expostos ao ar ambiente. Esses, por sua vez, receberam constante hidratação com salina aquecida. Imediatamente após a retirada da parede torácica, foi aplicado uma pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O com o objetivo de manter a capacidade residual funcional. A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais (MORTOLA e cols., 1983) para medida de fluxo aéreo (V'). O pneumotacógrafo que foi 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 [©SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo 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 será conectada a outro transdutor diferencial de pressão para medida da pressão traqueal (P_{tr}) (BURBURAN e cols., 2007). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG e cols., 1981). O volume (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

A ventilação artificial foi instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Os animais foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL, fluxo aéreo de 1 mL/s, frequência respiratória de 100 irpm.

A mecânica pulmonar foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES e cols., 1985, 1988, 1989; KOCHI e cols., 1988), que permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão (Figura 1). No presente estudo, como a parede torácica anterior foi retirada, somente foi

computado os componentes elásticos, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, logo, a pressão traqueal (P_{tr}) reflete a pressão transpulmonar (P_L).

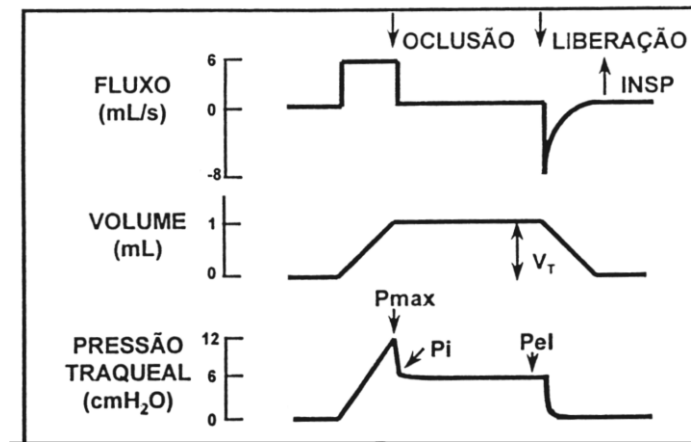


Figura 1. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão traqueal em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. P_{max} = pressão máxima alcançada, P_i = pressão no ponto de inflexão, P_{el} = pressão de retração elástica e V_T = volume corrente.

Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da pressão traqueal (P_{tr}) até um ponto (ponto de inflexão, P_i) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}) (Figura 1). A diferença de pressão que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{máx}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente resistivo do pulmão (ΔP_1). A segunda variação de pressão representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar (ΔP_2) (BATES e cols., 1988; KOCHI e cols., 1988; D’ANGELO e cols., 1989). A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de

pressão (ΔP_{tot}). A elastância estática do pulmão (Est) foi calculada dividindo-se a P_{el} pelo volume corrente (V_T).

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, de P_i e P_{el} . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCHI e cols., 1988).

As seguintes fórmulas foram utilizadas para a análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P1 = P_{m\acute{a}x} - P_i$$

$$\Delta P2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{tot} = \Delta P1 + \Delta P2$$

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

Onde:

$\Delta P1$ = variação de pressão relativa ao componente resistivo

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

ΔP_{tot} = variação de pressão total; $P_{m\acute{a}x}$ = pressão máxima.

P_i = pressão no ponto de inflexão; P_{el} = pressão de retração elástica.

Est = elastância estática; V_T = volume corrente;

TI = tempo inspiratório;

Foram registrados 10 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES e cols., 1985, 1988, 1989; KOCHI e cols., 1988) em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo, ao tubo traqueal registrarão os sinais de V' e P_{tr} , respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da P_{tr} foram estáveis até 20 Hz. Os sinais foram acondicionados e

filtrados no SCIREQ (*Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá), convertidos a sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA), e amostrados a uma freqüência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador, utilizando-se o software LABDAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) e gravados em disquetes magnéticos para posterior análise, que foi realizada pelo programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) (Figura 2).

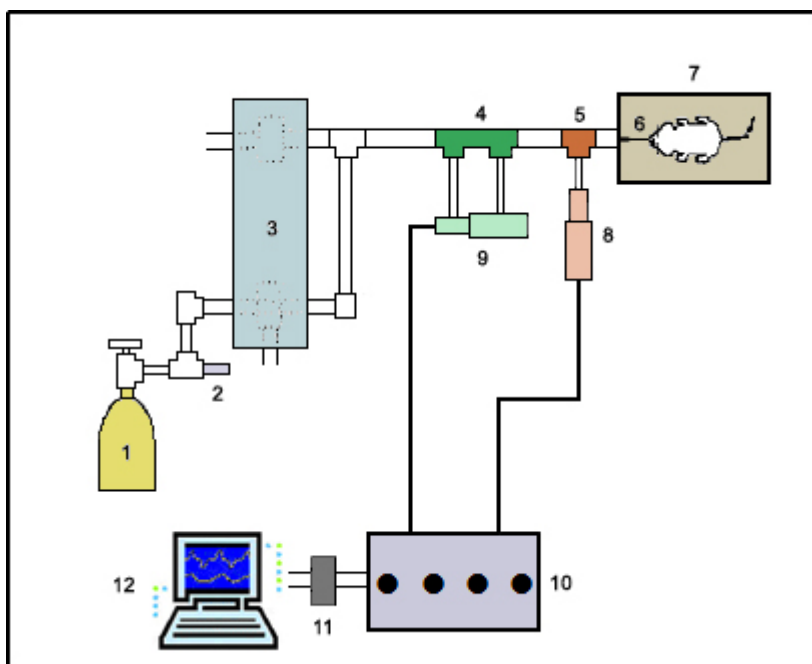


Figura 2. Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido
- 2 - Rotâmetro de agulha
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides
- 4 - Pneumotacógrafo
- 5 - Peça T
- 6 - Cânula traqueal
- 7 - Mesa cirúrgica
- 8 - Transdutor de pressão traqueal
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo
- 10 - SCIREQ
- 11 - Conversor analógico-digital de 12 bits
- 12 - Microcomputador

4.5 Remoção dos pulmões

Após a mensuração da mecânica respiratória foi injetado na veia cava inferior 1 mL de heparina e, após 1 minuto, o animal foi imediatamente sacrificado por seção da aorta abdominal e veia cava inferior. A seguir, a traquéia foi ocluída ao final da expiração (PEEP=2cmH₂O) com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática e 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 bloco coração-pulmões das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio de algodão e o esôfago e o coração foram separados do conjunto por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O conjunto (pulmões-vias aéreas) foi separado para posterior estudo histológico.

4.6 Estudo da histologia

4.6.1 Microscopia óptica

4.6.1.1 Fixação e preparo das lâminas

Os pulmões foram perfundidos com solução salina 0,9% e, posteriormente, com formol-Millonig através de um escalpe 19G inserido no ventrículo direito do coração do animal. Os pulmões foram, então, retirados em bloco e fixados em formol tamponado a 10%.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 µm de espessura. As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

4.6.1.2 Análise histológica e morfométrica

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (microscópio Olympus; BX51; Tóquio, Japão) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para

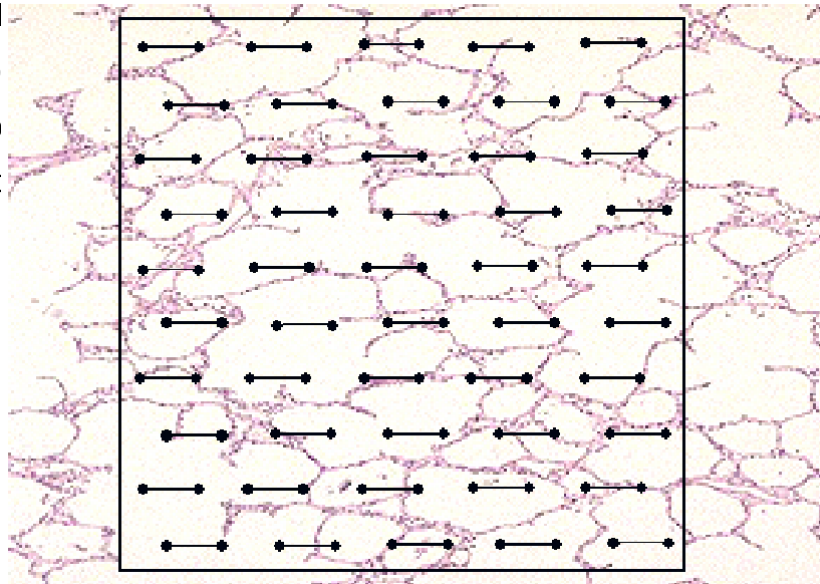
a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100, 200 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (GUNDERSEN e cols., 1988; HSIA e cols., 2010), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 3).

Em um aumento de 100x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, sendo analisadas 6 lâminas por grupo, uma por animal. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (WEIBEL, 1990; HSIA e cols., 2010).

Em um aumento de 1000x foram quantificados os seguintes parâmetros: tecido pulmonar, células polimorfonucleares e células mononucleares em dez campos aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. O resultado foi apresentado como fração de área de tecido pulmonar,

obtido pelo número de pontos do tecido.



o número de células bem como a fração de célula

Figura 3. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

4.6.2 Quantificação de fibras colágenas e elásticas

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas e elásticas no tecido pulmonar. Para analisar as fibras colágenas, os tecidos foram corados em solução de *Sirius Red* dissolvido em solução saturada de ácido pícrico e observados sob microscopia de luz polarizada, uma vez que a acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de polarização de Picrosirius é específica para estruturas colágenas (MONTES, 1996). Na análise das fibras elásticas, foi utilizado o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação (FULLMER e cols., 1974). A quantificação de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar foi feita utilizando-se o *software* Image-Pro[®] Express 6.0 para Windows[®], um computador conectado a uma câmera digital (Olympus, Q-Color 5, Tóquio, Japão) que está acoplada a um microscópio óptico (Olympus; BX51, Tóquio, Japão) (ROCCO e cols., 2001). A área ocupada pelas fibras elásticas e colágenas foi determinada por densitometria digital. Brônquios e vasos sanguíneos foram excluídos das medidas. Para evitar qualquer erro devido a áreas de colapso alveolar, as áreas ocupadas pelas fibras elásticas e colágenas foram divididas pelo comprimento do septo estudado. Os resultados foram expressos como quantidade de fibras elásticas ou colágenas por unidade de comprimento septal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

4.6.3 Microscopia eletrônica

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados três fragmentos de parênquima pulmonar do pulmão direito (lobulado) de 20 animais, com as seguintes dimensões 0,2 x 0,2 x 0,2 cm. Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, por 2 h, sendo posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por ml) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada as preparações

foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo que variou de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo, então, o tecido passado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina (araldite). Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzildimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftaltato). Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias. Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrótopo Porter Blum MT2 (Reichert ultracult S). Tais cortes, com 0,5 µm de espessura, foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, foram selecionadas áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, cortes ultrafinos com espessura em torno de 90 milimicrômetros foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, por citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL, JSM-6100F; Tóquio, Japão). Um escore semi-quantitativo de gravidade foi usado para mensuração das seguintes estruturas: a) lesão de células epiteliais tipo I, b) lesão de células epiteliais tipo II, c) desnudamento da membrana basal, d) colapso alveolar, e) lesão endotelial, e f) membrana hialina. Os achados patológicos foram graduados de acordo com um score de gravidade, utilizando-se zero quando não foi contado nenhuma alteração, 1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-

75%) e 4 (76-100%) em 10 campos microscópicos não-coincidentes (SANTOS e cols., 2006; PÁSSARO e cols., 2009).

4.6.4 Microscopia Confocal

Para a análise da microscopia confocal foram retirados três diferentes fragmentos do pulmão direito com as dimensões de 0,2 x 0,2 x 0,2 cm. Esses fragmentos foram fixados em formol tamponado a 3% e embebidos em parafina. O anti-fator de transcrição da tireóide (TTF-1) e o método de imunohistoquímica de fluorescência anti-CD34, foram respectivamente usados para analisar os componentes epitelial e endotelial da barreira alvéolo-capilar.

Células foram incubadas com anti-TTF1 (anticorpo monoclonal, Biotecnologia de Santa Cruz, Santa Cruz, Ca, EUA, 1:25) e anti-CD34 (anticorpo monoclonal, laboratório Novocastra, Reino Unido, 1:400), seguido por dupla coloração com fluoresceína e rodamina (rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG-R, dilution 1:40, Biotecnologia de Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA). Imagens foram obtidas usando um microscópio confocal de varredura a laser ZEISS LSM-410 (Carl Zeiss Canadá, Toronto, ON, Canadá) (OLIVEIRA e cols., 2009).

4.7 Análise do fluido do lavado broncoalveolar (BALF), fluido do lavado peritoneal e plasma

Para análise da celularidade total e diferencial, bem como a de citocinas no BALF, foram utilizados outros 80 camundongos Balb/c (20-25 g), que foram submetidos aos protocolos previamente descritos. Os animais foram sacrificados em uma câmara de CO₂, exangüinados, traqueotomizados, e a coleta do BALF foi realizada lavando-se os pulmões quatro vezes consecutivas com 1,0 ml salina fisiológica estéril (0.9% NaCl, 37° C), através da cânula traqueal. A cavidade peritoneal foi lavada com 5 ml de solução de fosfato tamponado (PBS) 1x, de onde foram obtidas alíquotas do lavado peritoneal. O sangue foi retirado da cauda do animal após serem anestesiados com isoflurano, e foram realizados os esfregaços nas lâminas.

A contagem total de leucócitos do sangue periférico, no fluido do lavado broncoalveolar e do lavado peritoneal foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10 x), após diluição (40 x) das mesmas em solução de Turk (ácido acético 2%). A análise diferencial de leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços obtidos em citocentrífuga (Shandon – 450 rpm por 5 minutos), corados pelo método May Grunwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas no May Grunwald por 3 minutos para fixação e coloração de grânulos celulares, 2 minutos em água para retirada de excesso de corante e 15 minutos no Giemsa, onde o núcleo será corado. Os níveis de citocinas no sangue foram avaliados após centrifugação (2.000 rpm por 5 min) do mesmo para a separação do plasma. O plasma foi dividido em duas alíquotas. Foram utilizados kits ELISA comercialmente disponíveis para medida de IL-6, KC (análogo da IL-8), IL-10, TNF- α e TGF- β no fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Todas as medidas foram analisadas em duplicata (PECINALI e cols., 2005).

4.8 Quantificação de células epiteliais apoptóticas

Para quantificar o número de células epiteliais apoptóticas no pulmão, fígado, intestino e rins, os órgãos foram fixados em formaldeído a 2%, e posteriormente colocados em sacarose. Para a detecção da apoptose, foi utilizado o método de TUNEL de imunomarcção para desoxinucleotídeo transferase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), onde o núcleo com fragmentação de DNA cora-se em marrom. O núcleo sem fragmentação de DNA cora-se em azul quando contra-corado com hematoxilina. O estudo semiquantitativo foi realizado através da atribuição de escores que variam de 0 a 4 cruces de acordo com a densidade de células apoptóticas observadas. O grau de apoptose foi graduado como: negativo = 0 (parênquima pulmonar normal), leve = 1 (0-25%), moderado = 2 (25-50%), alto = 3 (50-75%), e grave = 4 (75-100%) em 10 campos não-coincidentes (400 x) (OLIVEIRA E COLS., 2009).

5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). A normalidade dos dados (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors) e a homogeneidade das variâncias foram testadas (teste de Levene). Caso os dados passassem pelos dois testes, utilizou-se o teste *Two way* ANOVA seguido do teste de Tukey. Caso os dados não passassem pelo testes acima relatados, utilizou-se teste de *Two way* ANOVA *on ranks* seguido pelo teste de Dunn. Os dados com distribuição normal foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM), enquanto que os que não apresentavam distribuição normal foram expressos como mediana (intervalo interquartil). As diferenças na mortalidade foram comparadas utilizando-se o Teste de Fisher. Uma vez que não houve alteração significativa entre os grupos C-LPS e C-CLP, optamos em utilizar somente um grupo controle. Adotou-se $p < 0,05$ como valor significativo.

6. Resultados

A mortalidade do grupo LPA-CLP foi de 40% enquanto que a do grupo LPA-LPS de 10% 7 dias após a indução da lesão.

6.1 Mecânica Pulmonar

A tabela 1 mostra os valores de fluxo e volume 1 e 7 dias após indução da lesão pulmonar aguda. Não houve diferença de fluxo e volume entre os grupos ($p < 0,05$).

A figura 4 mostra o comportamento da elastância estática e componentes viscoelástico ($\square P2$) e resistivo ($\square P1$) do pulmão nos grupos controle (C) e LPA analisados 1 e 7 dias após indução de lesão. Como não foi observada diferença significativa entre os grupos controle C-LPS e C-CLP, foi utilizado apenas um grupo controle (C). Est, $\square P1$ e $\square P2$ se elevaram similarmente em ambos os grupos LPA comparados ao grupo controle no 1º dia após indução da LPA. Entretanto, no 7º dia, Est, $\square P1$ e $\square P2$ foram menores ao se comparar com ambos os grupos LPA no 1º dia após indução da LPA, principalmente no grupo LPA-LPS.

GRUPOS	FLUXO (mL/s)	VOLUME (mL)
DIA 1		
C-LPS	1,03± 0,01	0,20± 0,00
C-CLP	1,00± 0,00	0,20± 0,00
LPA-LPS	1,01± 0,03	0,21± 0,00
LPA-CLP	1,00± 0,00	0,20± 0,00
DIA 7		
C-LPS	1,00± 0,00	0,20± 0,00
C-CLP	0,99± 0,00	0,20± 0,00
LPA-LPS	0,99± 0,00	0,20± 0,00
LPA-CLP	1,00± 0,00	0,20± 0,00

Tabela 1. Fluxo e volume utilizados para análise da mecânica. Os valores correspondem à média ± EPM de 7 animais em cada grupo. EPM, erro padrão da média; **volume**, volume corrente; **fluxo**, fluxo inspiratório. Grupo **C-CLP** corresponde ao grupo submetido a laparotomia com exposição do ceco e o grupo **C-LPS** corresponde ao grupo controle que recebeu salina i.p. O grupo **LPA-CLP** corresponde ao grupo que foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco e o grupo **LPA-LPS** corresponde ao grupo que recebeu 125 µg de LPS i.p.. Todos os grupos foram analisados 1 e 7 dias após a indução da lesão.

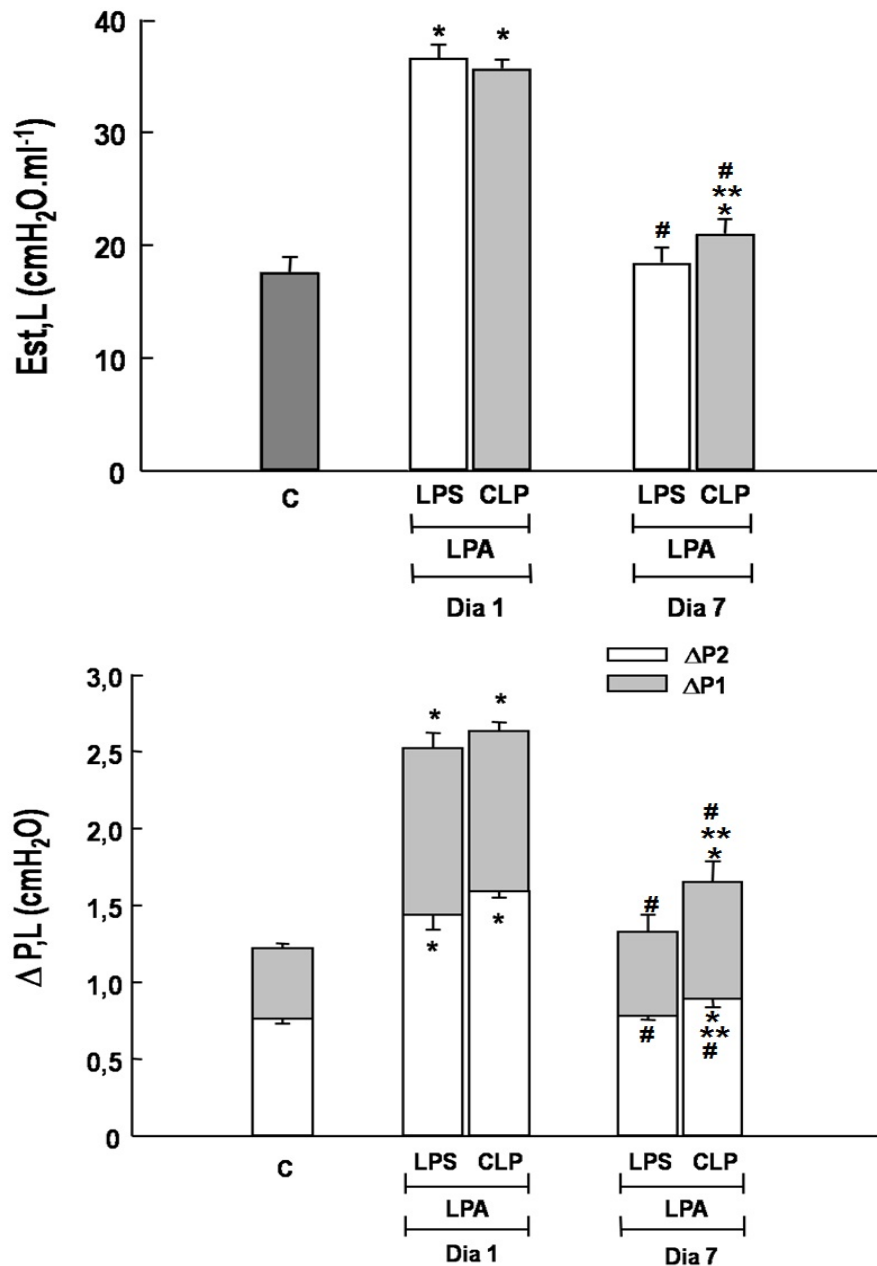


Figura 4. Elastância estática (Est,L) e variação de pressão ($\Delta P,L$) do pulmão. As barras cinzas representam a pressão viscoelásticas/inomogênea ($\Delta P2$) do pulmão, as barras brancas a pressão resistiva ($\Delta P1$) e a coluna inteira representa a variação de pressão total (ΔP_{tot}). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μ g LPA-LPS) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPA-CLP). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles (C-LPS e C-CLP), foi usado apenas um grupo controle (C). Todos os grupos foram analisados 1 e 7 dias após a indução da lesão. Os valores representam as médias + EPM de 6 animais/grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$).

**Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

6.2 Análise histológica

6.2.1 Microscopia óptica

6.2.1.1 Análise morfométrica

A figura 5 representa os parâmetros morfométricos como fração de área de alvéolos normais e colapsados do parênquima pulmonar (painel superior) e a fração de área ocupadas por células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) (painel inferior), 1 e 7 dias após indução da LPA. Observou-se que a fração de área de alvéolos colapsados e de células totais e PMN foram maiores nos grupos LPA-LPS e LPA-CLP no 1º dia, em comparação ao grupo C. Não foram observados alvéolos hiperinsuflados. No 7º dia, constatou-se que a fração de área de alvéolos colapsados retornou aos valores controle no grupo LPA-LPS, entretanto, no grupo LPA-CLP, a fração de área de colapso alveolar e o número de células totais e PMN permaneceram aumentadas, embora tenham diminuído com o tempo (figura 5).

A figura 6 apresenta fotomicrografias de parênquima pulmonar dos grupos C e LPA analisados 1 e 7 dias após indução da LPA. A histologia do parênquima pulmonar foi similar nos grupos controles. Após o 1º dia de indução da LPA, os grupos LPA-LPS e LPA-CLP apresentaram atelectasia, edema intersticial e infiltrados inflamatórios com presença de células PMN. Já após 7 dias, observou-se diminuição do edema intersticial, porém o espessamento septal perdurou com maior intensidade, assim como o colapso alveolar no grupo LPA-CLP (figura 6).

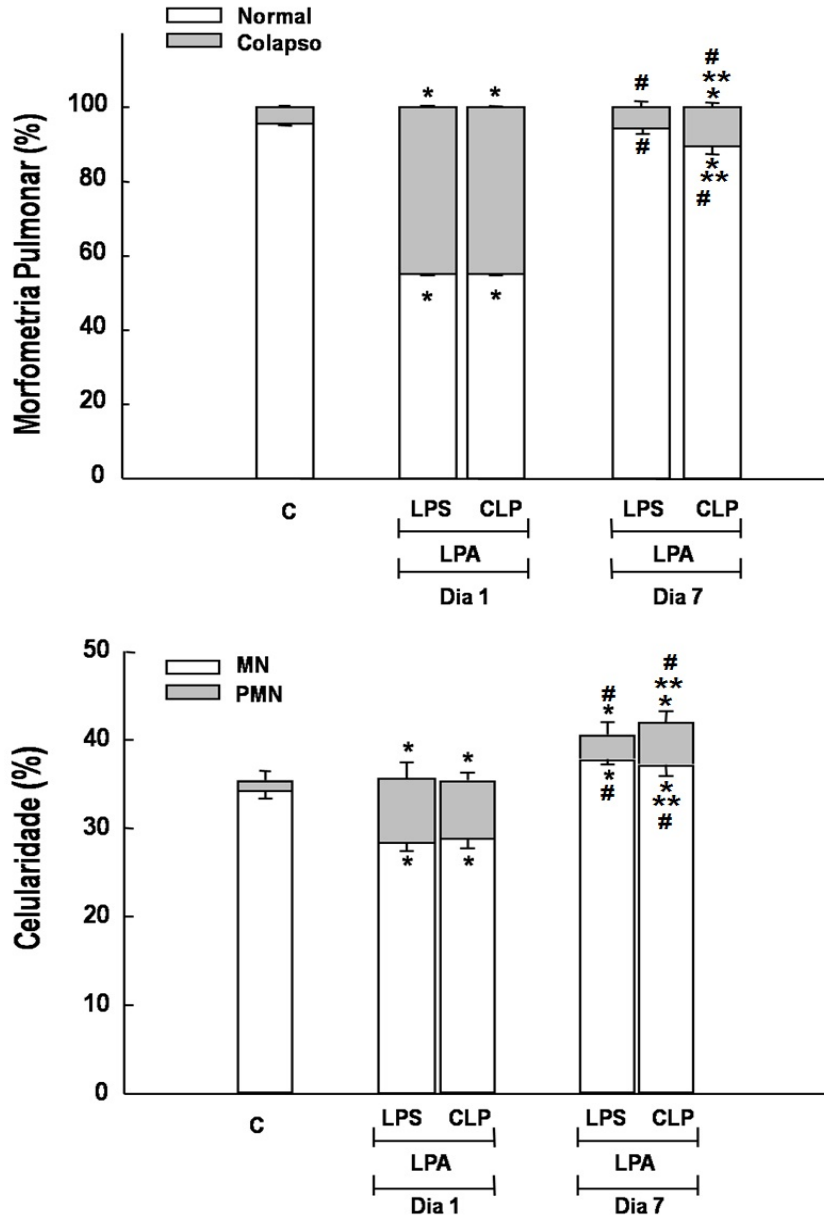


Figura 5. Parâmetros morfométricos no parênquima pulmonar 1 e 7 dias após indução da lesão pulmonar aguda (LPA). No painel superior: as barras sombreadas representam a fração de área de colapso alveolar e as barras abertas representam a fração de áreas dos alvéolos normais. No painel inferior: as barras sombreadas representam a fração de áreas ocupadas por células polimorfonucleares (PMN) e as barras abertas representam a fração de áreas ocupadas por células mononucleares (MN). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μ g, LPA-LPS) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPA-CLP). Nos respectivos grupos controles, os animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (C). Os valores representam as médias + EPM

de 6 animais/grupo. Foram avaliados 10 campos aleatórios e não-coincidentes por camundongo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

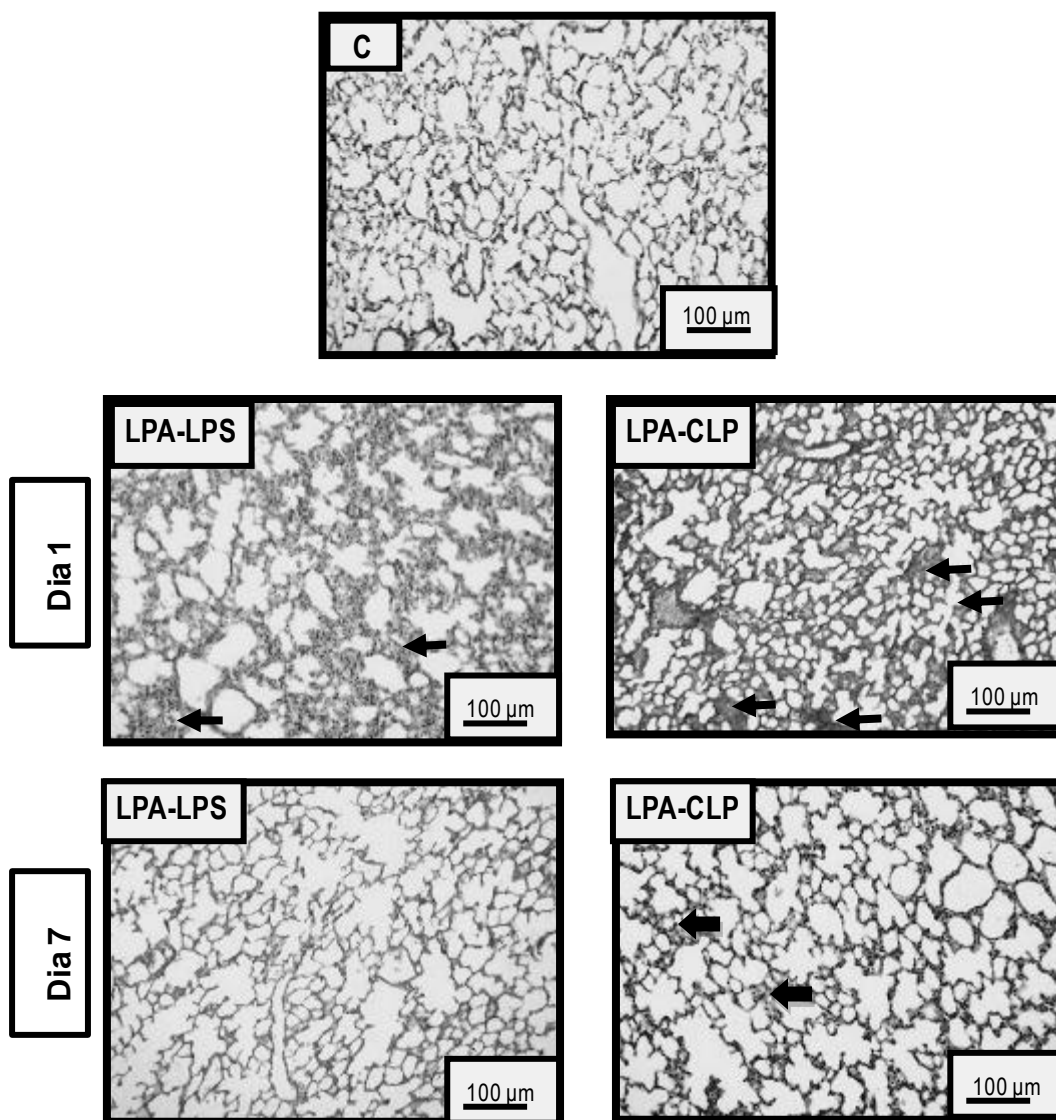


Figura 6. Fotomicrografias do parênquima pulmonar corados com hematoxilina-eosina 1 e 7 dias após indução da lesão pulmonar aguda (LPA). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 µg, LPA-LPS) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPA-CLP). Nos respectivos grupos controles, os animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (C). Aumento 100x. Note o colapso alveolar na ponta das setas.

6.2.1.2 Fibras colágenas e elásticas

A figura 7 representa o conteúdo de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar de animais dos grupos controle e com LPA. O conteúdo de fibras colágenas foi significativamente maior nos grupos LPA-LPS e LPA-CLP em comparação ao C, após o 1º dia de indução da lesão. Após 7 dias da indução da lesão, observou-se queda desse conteúdo apenas no grupo LPA-LPS, enquanto o LPA-CLP manteve-se aumentado. O conteúdo de fibras elásticas aumentou apenas no grupo LPA-CLP, 7 dias após a indução de LPA (figura 7).

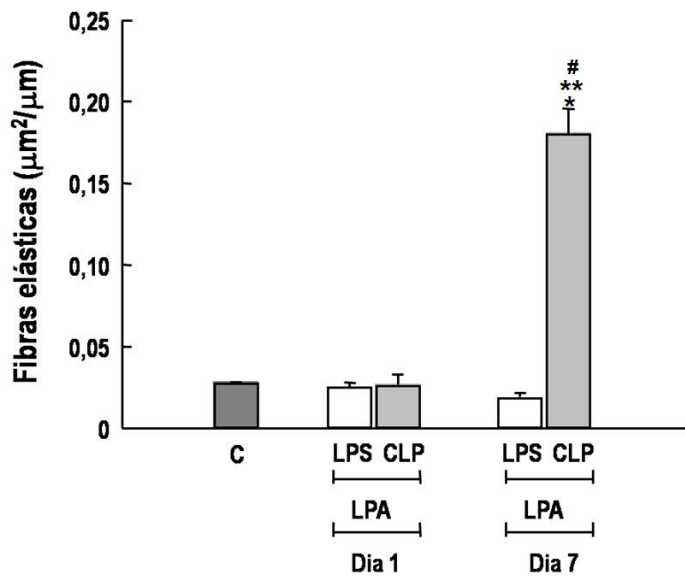
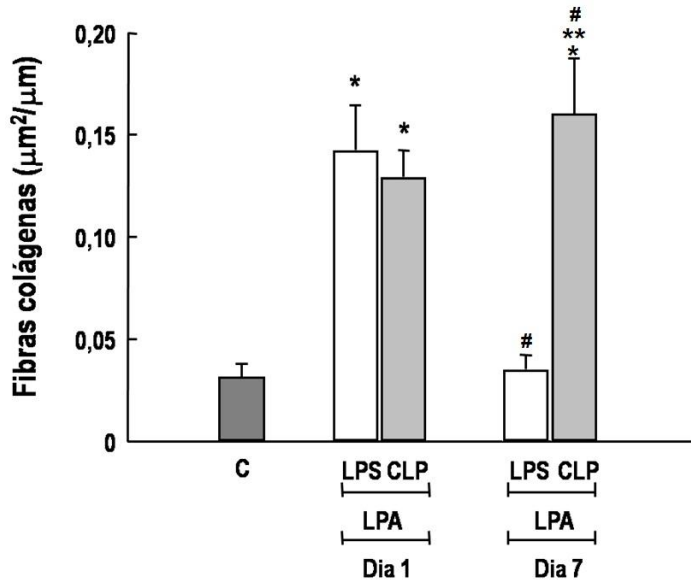


Figura 7. Conteúdo de fibras colágenas (painel superior) e elásticas (painel inferior) no parênquima pulmonar 1 e 7 dias após indução da lesão pulmonar aguda (LPA). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 µg, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). Os valores representam média + EPM de 6 animais/grupo. Foram avaliados 10 campos

aleatórios e não-coincidentes por camundongo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). **Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

6.3 Análise da celularidade no fluido do lavado peritoneal, sangue e lavado broncoalveolar

A figura 8 mostra o número de neutrófilos no fluido do lavado peritoneal, sangue e fluido do lavado broncoalveolar. No 1º dia, o número de neutrófilos no fluido do lavado peritoneal, sangue e BALF foi maior nos grupos LPA-LPS e LPA-CLP do que no C, sem diferença significativa entre eles; porém, no 7º dia, houve redução do número de neutrófilos no sangue, BALF e peritônio comparado ao 1º dia no grupo LPA-LPS. Entretanto, no grupo LPA-CLP não houve diferença significativa no número de neutrófilos no sangue e no BALF ao longo do tempo de lesão pulmonar, mas sim uma redução significativa no lavado do fluido peritoneal.

A figura 9 representa os níveis de citocinas IL-6, KC (homólogo da IL-8), IL-10, TNF α e TGF- β no fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Constatou-se no 1º dia de LPA, que todas as citocinas foram maiores nos grupos LPA-LPS e LPA-CLP do que no grupo C (Fig. 9). TNF α , IL-6 e TGF- β foram maiores no grupo LPA-CLP do que no grupo LPA-LPS, enquanto os níveis de KC e IL-10 foram similares em ambos os grupos LPA. No 7º dia, os níveis de citocinas retornaram a valores controle no grupo LPA-LPS. No grupo LPA-CLP, TNF α e IL-10 também retornaram a valores controle, mas os níveis de IL-6 e KC foram similares ao 1º dia, enquanto TGF- β foi menor no 7º dia ao se comparar ao 1º dia (figura 9).

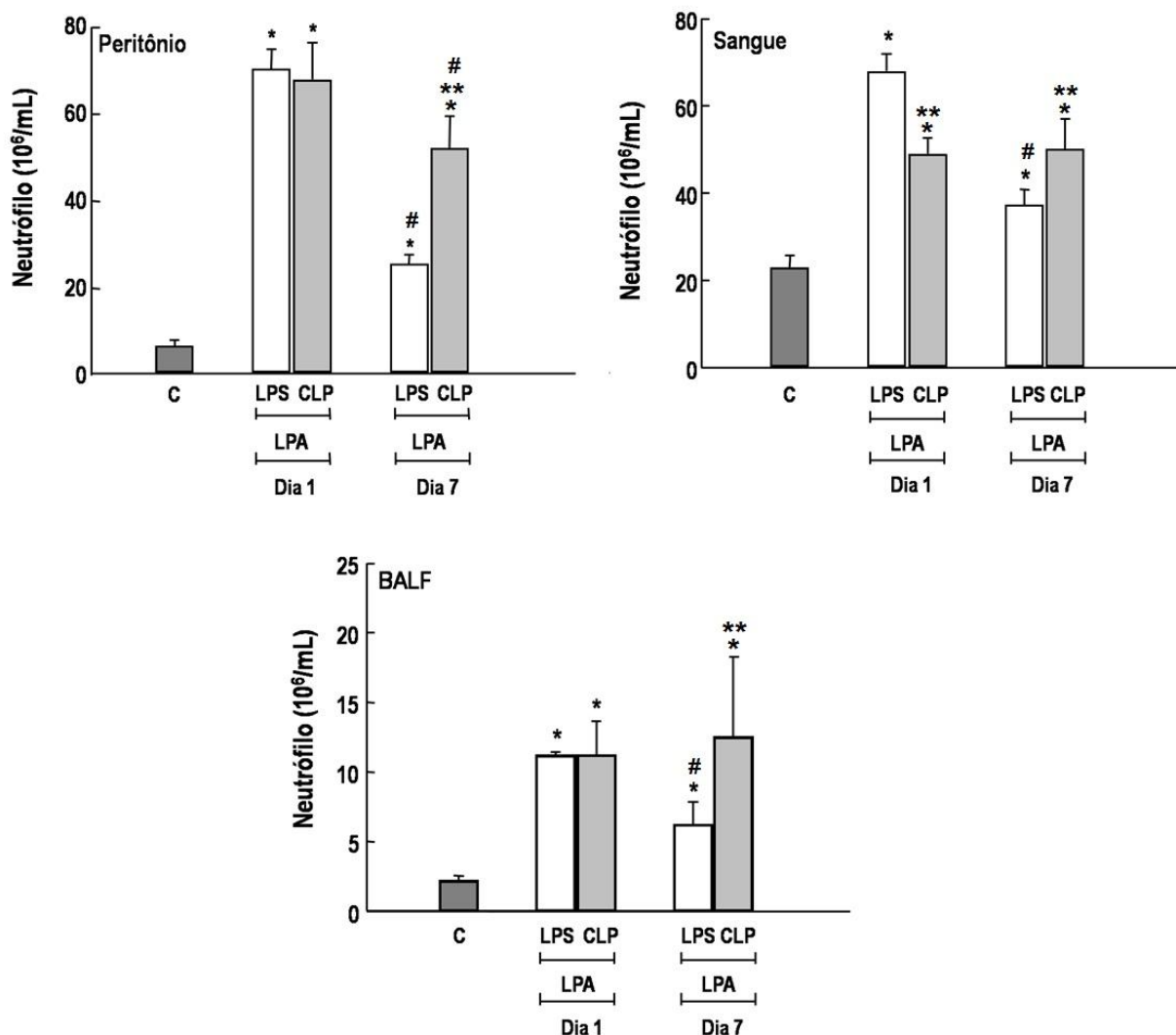


Figura 8. Análise do conteúdo de neutrófilos no fluido do lavado peritoneal, sangue e no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) analisados 1 e 7 dias após indução da LPA. Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μg , **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). Os valores representam média + EPM de 6 animais/grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). **Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

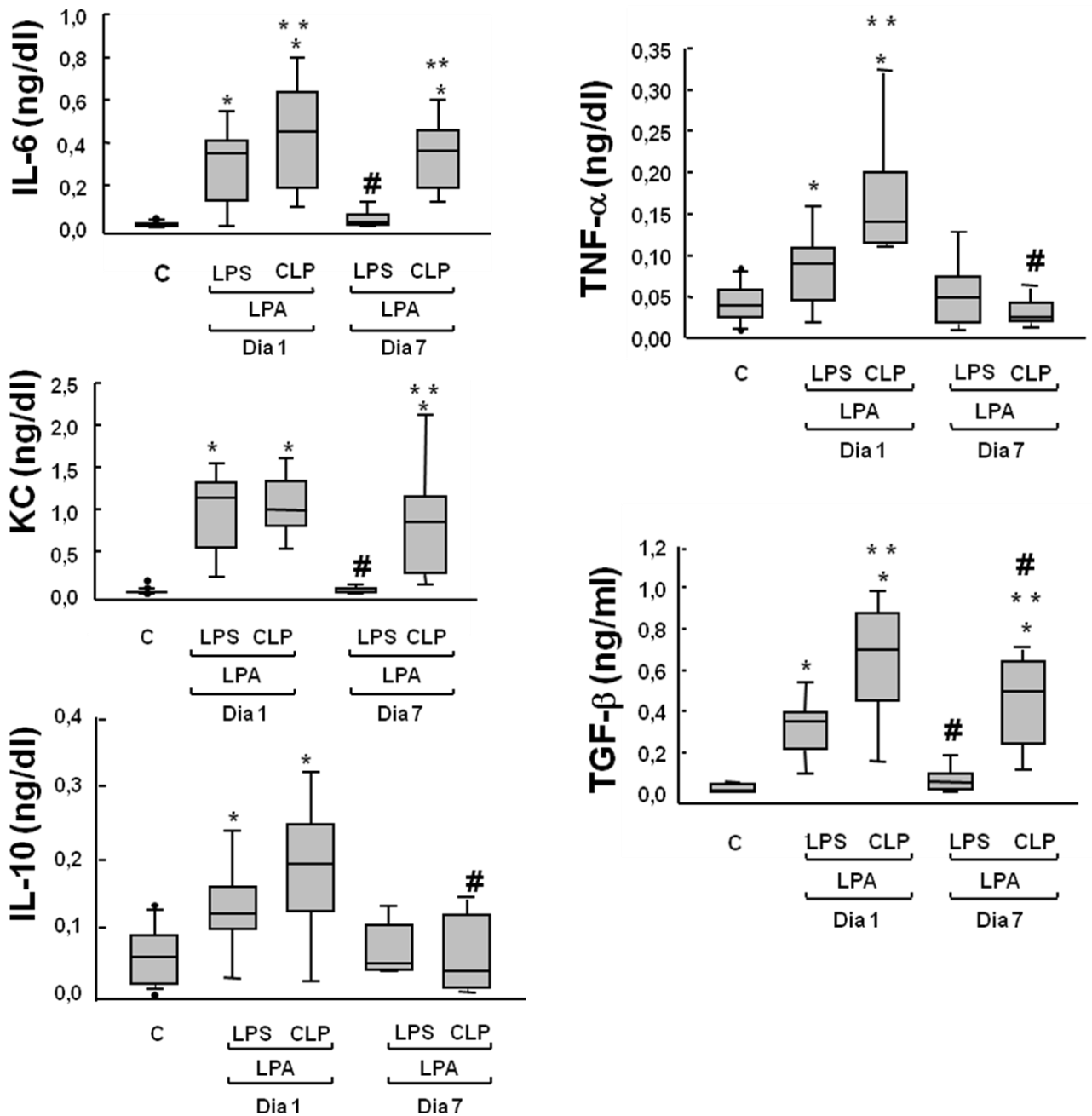


Figura 9. Análise das citocinas no fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Gráfico de caixa representativo das interleucinas (IL)-6, KC (homólogo da IL-8), IL-10, TNF- α e TGF- β analisados nos dias 1 e 7 após indução da LPA. Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μ g, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram

submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (C). Os valores representam média + EPM de 6 animais/grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). **Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

6.4 Análise da apoptose de células epiteliais no pulmão, rim, fígado e intestino

A tabela 2 representa análise semi-quantitativa das células em apoptose no pulmão, rim, fígado e intestino nos grupos C e LPA, 1 e 7 dias após indução de lesão pulmonar. No 1º dia, ambos os grupos LPA-LPS e LPA-CLP apresentaram aumento no número de células epiteliais apoptóticas em comparação ao grupo C. O número de células apoptóticas no pulmão, rim e intestino foi maior no grupo LPA-CLP do que no grupo LPA-LPS. Já após 7 dias, o número de células apoptóticas no rim foi menor do que no 1º dia, em ambos os grupos. O número de células apoptóticas no pulmão, fígado, e vilosidades do intestino foi similar em ambos os grupos LPA nos dias 1 e 7 (Tabela 2).

Grupos	Pulmão	Rim	Fígado	Intestino
DIA 1				
C	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
LPA-LPS	2 (1-2)*	2 (2-3)*	2 (1-2)*	2 (1-2.25)*
LPA-CLP	3 (2.75-3.25)*,**	4 (3-4)*,**	2 (1-2.25)*	3 (2.75-3.25)*,**
DIA 7				
C	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
LPA-LPS	1 (1-1.25)*	1 (1-2)*,#	1 (1-1.25)*	1 (1-2)*
LPA-CLP	2 (2-3)*,**	3 (2-3)*,**,#	2 (1.75-2.25)*	3 (2-3.25)*,**

Tabela 2. Escore de células apoptóticas no pulmão, rim, fígado e intestino. Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 µg, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). Valores representam a mediana (percentis 25% -75%) de 5 camundongos em cada grupo. Os achados patológicos foram graduados de acordo com escore semi-quantitativo com base na gravidade: negativo=0, 1 = (0-25%), 2 = (26-50%), 3 = (51-75%) e 4 = (76-100%) do tecido

analisado. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). **Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p < 0,05$).

6.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A tabela 3 representa a análise semi-quantitativa das alterações ultraestruturais do parênquima pulmonar e a figura 10 representa as fotomicrografias da microscopia eletrônica de transmissão nos grupos C e LPA nos dias 1 e 7 após indução da LPA. No grupo C observou-se integridade da membrana alvéolo-capilar, membrana basal, célula endotelial (End), espaço alveolar e pneumócitos tipo II (PII) preservados, com numerosos corpos lamelares e microvilosidades típicas, projetando-se de sua superfície (figura 10a). No 1º dia após indução da LPA, os grupos LPA-LPS (figura 10b) e LPA-CLP (figura 10c) mostraram lesão em células epiteliais dos tipos I e II, ausência de microvilosidades em PII, colapso alveolar e membrana hialina (Tabela 3). O grau de lesão endotelial, apoptose e desnudamento da membrana basal foi maior no grupo LPA-CLP do que no grupo LPA-LPS (figuras 10b e 10c, Tabela 3). No 1º dia, o interstício encontrava-se espesso por causa do aumento do conteúdo de elementos da matriz extracelular, como fibras colágenas em ambos os grupos. No 7º dia, a lesão de células epiteliais dos tipos I e II, o desnudamento da membrana basal e a lesão endotelial reduziram no grupo LPA-LPS (figura 10d), mas não retornou aos valores controle. Todas essas alterações ultraestruturais permaneceram aumentadas no grupo LPA-CLP (figura 10e e Tabela 3). No grupo LPA-CLP, a razão entre fibras colágenas tipo I e III foi maior no 7º dia.

A figura 11 representa a microscopia confocal do parênquima pulmonar nos dias 1 e 7 após a indução da lesão pulmonar aguda (LPA). As amostras foram coradas com dupla imunofluorescência para TTF1 (fator de transcrição da tireóide-1, epitélio alveolar) e CD34 (endotélio). No dia 1, embora o processo inflamatório tenha sido semelhante em ambos os grupos LPA (LPA-LPS e LPA-CLP), a lesão endotelial foi maior no grupo LPA-CLP (figuras 11a e 11b). No dia 7, pôde-se observar a redução do processo inflamatório no grupo LPA-LPS, com reparo parcial das lesões epitelial e endotelial (figura 11c). Contudo, o grupo LPA-CLP continuou mantendo o processo inflamatório no parênquima pulmonar e lesão endotelial (figura 11d).

GRUPOS	Lesão célula epitelial tipo I	Lesão de célula epitelial tipo II	Desnudamento da membrana basal	Colapso alveolar	Lesão endotelial	Apoptose da célula endotelial	Membrana hialina
C	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
DIA 1							
LPA-LPS	3 (2-3)*	3 (2-3)*	2 (2-2)*	4 (3-4)*	2 (1.75-3)*	2 (2-2)*	2 (1.75-2)*
LPA-CLP	3 (3-3.25)*	3 (3-3.25)*	3 (2-3)*,**	4 (3-4)*	3 (3- 3.25)*,**	3 (2-3)*,**	2 (1.75-2)*
DIA 7							
LPA-LPS	1 (1-2)*,#	1 (1-2)*,#	1 (1-2)*,#	2 (1-2)*,#	1 (1- 1.25)*,#	1 (1-2)*,#	0 (0-0.25)#
LPA-CLP	3 (2.75- 3.25)*,**	3 (2.75- 3.25)*,**	3 (2.75-3)*,**	3 (2-3)*,**,#	3 (2-3)*,**	3 (2.75- 3)*,**	1 (0-1)#

Tabela 3. Análise semi-quantitativa das alterações ultraestruturais do parênquima pulmonar. Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 µg, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos

controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). Valores representam a mediana (percentis 25% -75%) de 5 camundongos em cada grupo. Os achados patológicos foram graduados de acordo com escore semi-quantitativo com base na gravidade: negativo=0, 1 = (0-25%), 2 = (26-50%), 3 = (51-75%) e 4 = (76-100%) do tecido analisado. *Significativamente diferente do grupo C ($p<0,05$). **Significativamente diferente do grupo LPA-LPS ($p<0,05$). #Significativamente diferente do 1º dia ($p<0,05$).

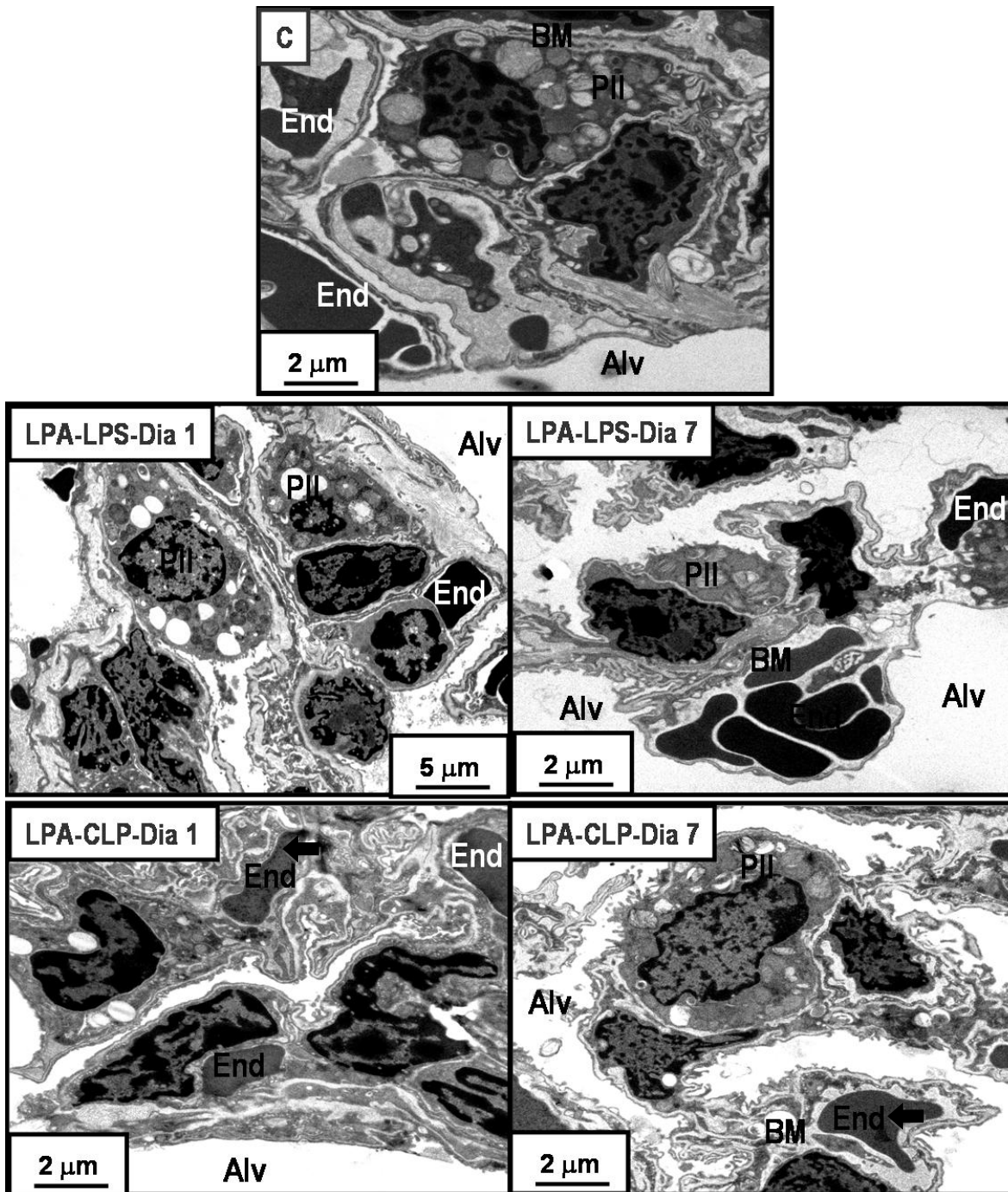


Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas do parênquima pulmonar analisadas 1 e 7 dias após indução da lesão pulmonar aguda (LPA). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μ g, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). **BM**: membrana basal. **End**: endotélio. **Alv**: espaço alveolar. **PII**:

pneumócitos tipo II. Note na setas, a maior lesão endotelial no grupo LPA-CLP e a perpetuação da mesma após 7 dias de indução da lesão.

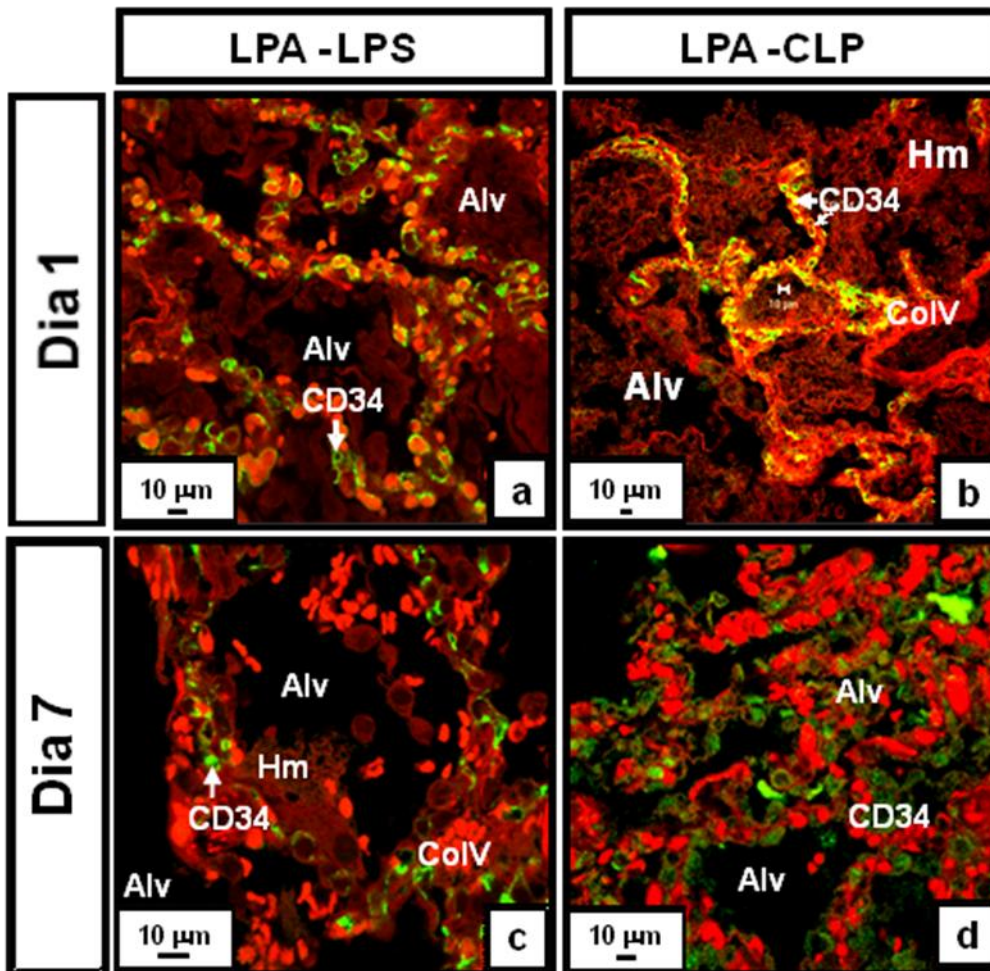


Figura 11. Fotomicrografias confocal representativas do parênquima pulmonar nos dias 1 e 7 após indução da lesão pulmonar aguda (LPA). As amostras foram coradas com dupla imunofluorescência para TTF1 (fator de transcrição da tireóide-1, epitélio alveolar) e CD-34 (endotélio). Nos grupos LPA, camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (125 μg, **LPA-LPS**) ou foi submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (**LPA-CLP**). Nos respectivos grupos controles, animais receberam solução salina intraperitonealmente (0,5 ml – C-LPS) ou foram submetidos a cirurgia *sham* (C-CLP). Contudo, como não foi observado diferença significativa entre os grupos controles C-LPS e C-CLP, foi usado apenas um grupo controle (**C**). Observe a maior lesão endotelial no grupo LPA-CLP (corado em verde) após 7 dias de indução da lesão.

7 Discussão

O presente estudo demonstrou, através de modelos experimentais de lesão pulmonar aguda extrapulmonar induzidos por LPS ou CLP com graus similares de comprometimento da mecânica pulmonar, lesão epitelial e inflamação intraperitoneal na fase precoce da lesão, que o modelo de LPA-CLP induziu fibroelastogênese associada a alteração na mecânica pulmonar, enquanto o modelo de LPA induzido por LPS desenvolveu somente fibrose que foi reparada na fase precoce da lesão. Tal fato sugere que o grau de lesão no endotélio também participa do processo de remodelamento.

Devido à grande dificuldade em se realizar e interpretar estudos em humanos, em função da possibilidade de que lesões diretas e indiretas possam coexistir no mesmo paciente, a maior parte de nosso conhecimento a respeito da fisiopatologia da SDRA é proveniente de experimentação animal (ROCCO E ZIN, 2002; ROCCO E PELOSI, 2008). Apesar dos grandes avanços na fisiopatologia da LPA/SDRA a mortalidade perdura elevada (ERICKSON e cols., 2009), sendo a sepse a principal causa (SEVRANSKY e cols., 2008). Apesar da diversidade de espécies animais, optamos por utilizar camundongos BALB/c, já que a partir de um estímulo letal, eles reproduzem características similares às da LPA humana e não necessitam de um período muito longo de vida para estarem aptos para o estudo.

Diversos modelos experimentais vêm tentando mimetizar a sepse e entender seu mecanismo de ação, seja através de infecções causadas por bactérias gram-negativas ou através da administração de endotoxina (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006; LEITE-JUNIOR e cols., 2008), que provoca uma

casca de reações inflamatórias, estimulando uma resposta inflamatória aguda (KABIR e cols; 2002). Um dos modelos que utilizamos, foi o de ligadura e perfuração do ceco (WICHTERMAN e cols., 1980; RITTIRSCH e cols., 2009; OLIVEIRA e cols., 2009), onde há liberação da flora bacteriana. É um modelo reprodutível que mais se assemelha com a sepse cirúrgica em humanos; associado a apoptose de tipos celulares selecionados e resposta imune (ORFANOS e cols., 2004; HUBBARD e cols., 2005). Entretanto, esse modelo de sepse apresenta diferentes formas de apresentação em função da quantidade de furos realizados no ceco, a porção do ceco a ser ligada e o calibre da agulha (RITTIRSCH e cols., 2009). Como nossa intenção também era de estudar um modelo temporal (nos dias 1 e 7), optamos por um modelo que provocasse uma menor mortalidade e que proporcionasse um aumento de 1,5 vezes na elastância estática do pulmão em relação ao grupo C (MENEZES e cols., 2005). O modelo de LPA induzido por LPS de *E.coli* já foi previamente descrito por nosso grupo (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006). O uso desses modelos de LPA é vantajoso já que é possível controlar com precisão o momento da análise e manter os animais ventilando espontaneamente, evitando assim, os efeitos colaterais resultantes da ventilação mecânica. Além disso, é possível fornecer informações adicionais para a patogênese da lesão endotelial (MATTHAY e cols., 2003).

Dentre os métodos para análise da mecânica pulmonar, utilizamos o método de oclusão ao final da inspiração, este método permite a identificação dos componentes elásticos, resistivos, viscoelástico e/ou inomogêneos (BATES e cols., 1985; BATES e cols., 1988). Em nosso experimento, não obtivemos os valores referentes à mecânica da parede torácica e do sistema respiratório, pois realizamos a retirada da porção anterior do gradil costal. Logo, avaliamos os componentes resistivo, elástico e viscoelástico pulmonares. Em função dessa cirurgia, utilizamos um nível de aproximadamente 2 cmH₂O de PEEP (SALDIVA e cols., 1992) para evitar o colapso dos espaços aéreos e manter a capacidade residual funcional. Ademais, os efeitos da PEEP se tornam menos acentuados na presença de tórax aberto, uma vez que na ausência da parede torácica não há compressão da veia cava nem da aorta pela pressão positiva, com consequente

redução do retorno venoso e débito cardíaco. As influências das variações de V_T e V' sobre os parâmetros de mecânica, já previamente constatadas em pacientes com SDRA (EISSA e cols., 1991), foi evitada em nossos experimentos com a utilização de V_T e V' similares a todos os grupos estudados, não contribuindo para as diferenças encontradas nos parâmetros ventilatórios entre os grupos.

Em nosso experimento observamos um incremento em proporção similar do componente elástico do pulmão (Est,L), resistivo ($\square P1,L$) e viscoelástico ($\square P2,L$) no 1º dia após indução da lesão nos grupos LPA-LPS e LPA-CLP (figura 4) (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006; LEITE-JUNIOR e cols., 2008). Essa alteração na Est,L e $\square P2,L$ pode ser explicada por um aumento no percentual de alvéolos colapsados, espessamento dos septos alveolares, elevação no percentual de células polimorfonucleares na análise morfométrica (figura 5), edema intersticial (figuras 6 e 10) e mudanças nos componentes da matriz extracelular (figura 7). Além disso, alterações na pressão resistiva podem estar relacionadas à redução do calibre brônquico causado pelo processo inflamatório das vias aéreas (ROCCO e cols., 2004; MENEZES e cols., 2005). A microscopia eletrônica, evidenciou em ambos os grupos LPA, lesão nos pneumócitos tipo II e distorção dos corpos lamelares, bem como lesão nas células tipo I no 1º dia em ambos os modelos de LPA. Por outro lado, no 1º dia após indução da lesão, o desnudamento da membrana basal e o grau de lesão endotelial foram maiores no grupo LPA-CLP em comparação com o grupo LPA-LPS (Tabela 3). Além disso, os mediadores inflamatórios no BALF foram maiores em ambos os grupos comparados ao controle, mas os níveis de IL-6, TNF- \square e TGF- β foram mais elevados no grupo LPA-CLP ao se comparar com o grupo LPA-LPS. Baseado nesses dados, podemos supor que: 1) esses dois modelos podem ter diferentes mecanismos de ativação dos níveis de IL-6, TNF- \square e TGF- β , que são responsáveis pelo maior dano endotelial e desnudamento da membrana basal, ou 2) tais modelos promovem diferentes graus de lesão endotelial e na membrana basal, que por sua vez podem promover diferente ativação nos mediadores inflamatórios e fibrogênicos. Além disso, observamos que a resposta fibrogênica na fase inicial da LPA foi parcialmente dissociada do grau de resposta

inflamatória, como previamente descrito (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006).

No 7º dia de lesão pulmonar, o grupo LPA-LPS obteve o retorno de todos os parâmetros mecânicos (figura 4), associado com reparo parcial do epitélio e endotélio e uma redução progressiva nos mediadores inflamatórios e fibrogênicos, e da atelectasia (ROJAS e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006), apresentando a ultraestrutura do parênquima pulmonar mais próximo ao do grupo controle. Por outro lado, o grupo LPA-CLP apresentou melhora nos parâmetros mecânicos em relação ao 1º dia, mas permaneceram anormalmente aumentados no grupo LPA-LPS provavelmente em função da persistência dos processos inflamatórios e fibrogênicos e menor redução da atelectasia. Essa correlação entre colapso alveolar, no âmbito da inhomogeneidade pulmonar, e alterações dos parâmetros viscoelásticos foi bem definida por BATES e cols. (1988) ao realizarem a medida da pressão alveolar em cães com tórax aberto. A ventilação na LPA/SDRA é inhomogênea, com diferentes constantes de tempo, acarretando aumento de ΔP_2 (EISSA e cols., 1992). Além disso, no grupo LPA-CLP o número de células polimorfonucleares e o nível de IL-6, KC e TGF- β permaneceram elevados, embora TNF- α tenha diminuído.

O estudo da matriz extracelular (MEC) tem recebido grande atenção ultimamente, na tentativa de correlacionar as alterações nos seus componentes com achados patológicos na mecânica pulmonar. Todo tecido conectivo é formado por células e matriz extracelular, sendo as fibras elásticas e colágenas os principais componentes, podendo influenciar diretamente as propriedades elásticas do tecido pulmonar. Diversas doenças podem alterar a organização da matriz extracelular, podendo ocasionar alterações irreversíveis na histoarquitetura pulmonar. Nesse contexto, a atuação das células inflamatórias sobre a MEC, através da liberação de enzimas proteolíticas como as elastases e colagenases são de grande importância nos processos de degradação da MEC (TASAKA e cols., 2002). Nesse contexto, foi observado com este estudo, que as fibras de colágeno permaneceram elevadas no grupo LPA-CLP, mas reduziu no grupo LPA-LPS. Uma possível explicação quanto ao ocorrido no grupo LPA-LPS, poderia estar

relacionado a redução nos mediadores inflamatórios, bem como reparo epitelial e endotelial progressivo.

Assim como as fibras colágenas, as fibras elásticas também são reorganizadas durante o remodelamento da MEC. Devido as suas propriedades mecânicas, as fibras elásticas contribuem para o recolhimento elástico do pulmão, restaurando sua configuração de repouso depois de finda a inspiração (COTRAN e cols., 1999). No presente estudo, observou-se aumento no conteúdo de fibras elásticas somente no grupo LPA-CLP. Tal fato pode estar relacionada a manutenção do processo inflamatório associada ao grau de lesão endotelial.

A integridade da membrana celular endotelial é extremamente importante na fisiopatologia da SDRA, uma vez que sua ruptura leva a perda da integridade endotelial, levando a ativação de neutrófilos e de seus produtos liberados (elastase neutrofílica), modulando o processo inflamatório (INGBAR, 2000; ZEIHNER e cols., 2004). Nossos dados sugerem que a lesão no endotélio pulmonar pode desempenhar um importante papel na patogênese e no remodelamento do pulmão já que o endotélio também: a) afeta a homeostasia pulmonar e sistêmica; b) participa da adesão de neutrófilos; e c) altera a permeabilidade de barreira alvéolo-capilar, promovendo formação de edema pulmonar (PITTER e cols., 1997). As células endoteliais podem ser alvo e produtoras de citocinas. IL-6, TNF- α e KC são na sua maioria produzidas pela ativação de células endoteliais e alveolares (primariamente macrófagos), fagócitos e células endoteliais. Citocinas produzidas pelas células endoteliais ou outras células podem servir como mensageiros químicos entre as células, bem como estão envolvidos nos processos de crescimento e diferenciação celular, reparo tecidual e remodelamento e regulação da resposta imune (OBERHOLZER e cols., 2000).

Foi observado que no 7º dia após indução da LPA, a lesão epitelial diminuiu no grupo LPA-LPS, mas não no grupo LPA-CLP. Isto sugere que a lesão endotelial, assim como os níveis de IL-6, TNF- α e TGF- β no BALF, observados no 1º dia após indução da lesão, poderia ter promovido ainda mais danos epiteliais (LUCAS e cols., 2009). Não podemos excluir também, o papel fundamental do KC, que permaneceu elevado no BALF após 7 dias de indução da LPA e foi

relacionado ao aumento do número de neutrófilos (GOVINDARAJU e cols., 2006). Em geral, os dados sugerem que é possível que o endotélio possa desempenhar um papel relevante no processo de reparo das células epiteliais na fase inicial da LPA. De fato, os níveis de IL-6 e TGF- β foram maiores no grupo LPA-CLP no 7º dia de LPA, indicando um processo inflamatório ativo.

IL-10, um mediador anti-inflamatório, também se elevou 1 dia após indução de LPA, mas após 7 dias, retornou a valores semelhantes aos do controle em ambos os modelos. Mesmo que somente um mediador anti-inflamatório tenha sido pesquisado, nossos dados sugerem que lesão endotelial não afeta a resposta anti-inflamatória. Além disso, a resposta anti-inflamatória não parece estar associada com colágeno ou remodelamento das fibras elásticas.

O reparo e o remodelamento do tecido pulmonar são conseqüências da agressão ao tecido pulmonar e da cascata inflamatória envolvida no processo de lesão, ou seja, é um processo dinâmico que interpõe lesão inflamatória e reparo tecidual, e parecem depender do alvo primário da agressão. Esse processo, passível de acontecer em todos os órgãos, tanto pode levar à reconstrução nos moldes anteriores (“tornar a modelar”) como em moldes anormais (“refazer com modificações intensas”). Poucos estudos abordam a questão do reparo do tecido epitelial após o início da lesão (KUNIG e cols., 2006; ZHAO e cols., 2006; QUADRI e cols., 2007). Estudos clínicos têm descrito a manutenção da alveolite inflamatória e elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios no BALF como possíveis mecanismos responsáveis pela lesão contínua da membrana alveolar e consequente fibrose em pacientes com desordens pulmonares progressivas (WEINBERGER e cols., 1978). Os fatores que irão determinar se ocorrerá fibrose pulmonar ou se a arquitetura pulmonar será restaurada permanecem desconhecidos, porém sabe-se que para o reparo do pulmão lesado há a necessidade de uma barreira epitelial íntegra, pois o reparo envolve complexa interação entre células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas, fatores de crescimento e pneumócitos tipo II intactos (BERTHIAUME e cols., 2001). TGF- β desempenha um papel fundamental nas respostas do pulmão (MUNGER e cols., 1999; PITTET e cols., 2001; DHAINAUT e

cols., 2003) na LPA/SDRA uma vez que induz a expressão gênica das moléculas de matriz extracelular e fibroproliferação.

A apoptose, ou seja, “morte celular programada” tem um importante papel no sistema imune e reparo tecidual na LPA/SDRA (LI e cols., 2004). FIALKOW e cols. (2006) observaram em pacientes clínicos, que a apoptose neutrofílica pode ser um marcador de gravidade na sepse, já a sua inibição resultaria em um número aumentado de neutrófilos, induzindo necrose e contribuindo para a perpetuação do processo inflamatório (MATUTE-BELLO e cols., 1997). A apoptose na fase tardia da LPA, também tem um importante papel no reparo, eliminando tecido de granulação, além de remover o excesso de pneumócito tipo II do epitélio alveolar (GALEN e cols., 1999). Recentes estudos sugerem que a apoptose neutrofílica está reduzida na sepse (SAYEED E COLS., 2004; JIA E COLS., 2004; WESCHE E COLS., 2005; FIALKOW e cols., 2006) e na SDRA (MATUTE-BELLO e cols., 2000; MAIANSKI e cols., 2004; FIALKOW E COLS., 2006). Nesse estudo, pôde-se observar que desde o 1º dia após indução da LPA, a apoptose celular foi maior no grupo LPA-CLP, não apenas no pulmão, como nas vilosidades do intestino e rim. Isto se dá provavelmente, devido ao aumento lesão abdominal no modelo de CLP, que também foi associado ao aumento de neutrófilos no peritônio, mas não no sangue. Tais resultados foram corroborados por CHOPRA e cols. (2009) que evidenciaram que o aumento da duração da sepse estimula a apoptose no tecido pulmonar. Já após 7 dias da indução da lesão, foi observado no grupo LPA-CLP, maior perpetuação da lesão nas vilosidades do intestino e no rim.

8 Limitações

O presente estudo apresenta várias limitações: 1) mesmo sabendo que o modelo de LPA induzido por endotoxina seja frequentemente usado, não imita totalmente a LPA em humanos. Ao se tentar utilizar bactérias para induzir LPA com grau semelhante de lesão pulmonar constatou-se grande variabilidade da lesão; 2) a mortalidade no grupo LPA-CLP foi maior ao se comparar com o grupo LPA-LPS. Assim, não podemos excluir completamente que havia um tipo de viés natural e uma população involuntariamente selecionada com tolerância a sepse; 3) Embora tenha sido investigado o papel desses mediadores inflamatórios, não podemos excluir a possível influência de outros mediadores nas células endoteliais; 4) O estudo avaliou as citocinas apenas no BALF, mas os neutrófilos foram avaliados no BALF, peritônio e sangue; 5) Avaliou-se o remodelamento do parênquima pulmonar até o 7º dia após indução da LPA, portanto, não se sabe o comportamento do remodelamento após esses 7 dias; e 6) nossos resultados não podem ser transferidos diretamente para a prática clínica, necessitando de mais estudos. Entretanto, os dados apresentados podem aprimorar nosso conhecimento sobre a associação entre o processo inflamatório e remodelamento do parênquima pulmonar na LPA/SDRA.

9 Conclusão

Ambos os modelos de LPA extrapulmonar induzido por endotoxina ou por cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresentaram respostas inflamatórias e de remodelamento similares na fase inicial da lesão. Contudo, a LPA induzida por CLP apresentou maior infiltração neutrofílica no peritônio e sangue, acompanhado por aumento no conteúdo de fibras elásticas e colágenas. Logo, a manutenção do processo inflamatório intraperitoneal promove fibroelastogênese em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. **Neutrophils and acute lung injury**. Crit Care Med 2003; 31:S195-199.

AKIRA, S; UEMATSU, S; TAKEUCHI O. **Pathogen recognition and innate immunity**. Cell 2006; 124: 783-801.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4ª edição, ed: Artmed, 2004; 1453-1462.

ANDRADES, M. et al. **Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development**. J Surg Res 2005; 125:68-72.

ARMSTRONG, L; MILLA, A.B. **Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome**. Thorax 1997; 52: 442-446.

ARMSTRONG, L. et al. **Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome**. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1910-1915.

ARTIGAS, A. et al. **The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2**. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1332-1347.

ARTIGAS, A.J. et al. **Clinical presentation, prognostic factors and outcome of ARDS in the European Collaborative Study (1985-1987): a preliminary report**. In Zapol WM and Lemaire F, eds. Adult Respiratory Distress Syndrome. Marcel Dekker, New York:1991,37-64.

ASHBAUGH, D.G. et al. **Acute respiratory Distress in adults.** Lancet 1967; 12:319-322.

ATKINSON, J.J; SENIOR, R.M. **Matrix metalloproteinase 9 in lung remodeling-translational review.** Am. J. Respir. Cell Mol Biol 2003; 28: 12-24.

AYALA, A. et al. **Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/ FasL deficiency.** Am J Patol 2002; 161: 2283-2294.

BABAYIGIT, H. et al. **Protective effect of β -glucan on lung injury after cecal ligation and puncture in rats.** Intensive Care Med 2005; 31: 865-870.

BACHOFEN, M; WEIBEL, E.R. **Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome.** Clinics in Chest Medicine 1982; 3: 35-56.

BAEURLE, P.A; BALTIMORE, D. **NF-Kappa B: ten years after.** Cell 1996; 87:13-20.

BAGBY, G.J. et al. **Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis.** J Infect Dis 1991; 163: 83-88.

BAKER, C.C. et al. **Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model.** Surgery 1983; 94: 331-335.

BARICHELLO, T. et al. **Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation.** Crit Care Med 2005; 33: 221-223.

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

BATES, J.H.T. et al. **Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption.** J Appl Physiol 1989; 67:488-492.

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

BHATIA, M. **Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome.** Curr Drug Targets - Infl Allergy 2002; 1: 343-351.

BAUER, T.T; MONTON, C; TORRES, A. **Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia and controls.** Thorax 2000; 55: 46-52.

BAUGHMAN, R.P. et al. **Changes in the inflammatory response of lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators.** Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 76-81.

BAUMGARTEN, G. et al. **In Vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4.** J Infect Dis 2001; 183: 1617-1624.

BAUMGARTEN, G. et al. **Role of Toll-Like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in gram-negative sepsis.** Eur J Anaesth 2006; 23:1041-1048.

BELLINGAN, G.J. **Resolution of inflammation and repair.** Eur Resp Mon 2002; 7:70-82.

BENJAMIM, C.F. **Present understanding of mediators and experimental models of sepsis.** Medicina 2001; 34: 18-26.

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

BERNARD, G.R. **Acute Respiratory Distress Syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:798-806.

BERTHIAUME, Y; FOLKESSON, H.G; MATHAY, M.A. **Lung edema clearance: 20 years of progress.** Invited review: Alveolar edema fluid clearance in the injured lung. J Appl Physiol 2001; 2207-2213.

BEUTLER, B. **Innate Immunity: an overview.** Mol Immunol 2004; 40: 845-859.

BREEN, E.C. **Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro.** J Appl Physiol 2000; 88: 203-209.

BROEKELMANN, T. et al. **Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis.** Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6642-6646.

BURBURAN, S.M. et al. **Lung mechanics and histology during sevoflurane anesthesia in a model of chronic asthma.** Anesth Analg 2007; 104:631-637.

CALFEE, C.S. et al. **Trauma –associated lung injury differs clinically and biologically from acute lung injury due to other clinical disorders.** Am J Respir Crit Care Med 2007; 35: 2243-2250.

CALLISTER, M.E.J; EVANS, T.W. **Pulmonary versus extrapulmonary acute respiratory distress syndrome different diseases or just a useful concept?** Current Opinion In Critical Care 2002; 8:21-25.

CAPELOZZI, V.L. et al. **Pulmonary and extrapulmonary acute distress syndrome: inflammatory and ultrastructural morphometric analysis.** Eur Respir J 2002; 20: 339-343.

CARDEN, D. et al. **Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins.** Am J Physiol 1998; 275: 385-392.

CARVALHO, R.S. et al. **Análise da mecânica pulmonar em modelo experimental de sepse.** J Bras Pneumol 2006; 32:316-321.

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

CHANUT-DELALANDE, H. et al. **Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers.** Molecular and Cellular Biology 2004; 23: 6049-6057.

CHEN, C.M; FANG, C.L; CHANG, C.H. **Surfactant and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury.** Crit Care Med 2001; 29:2169-75.

CHOI, K.H. et al. **The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cryptogenic organizing pneumonia.** Chest 2002; 121: 1478-1485.

CHOLLET-MARTIN, S. **Polymorphonuclear neutrophil activation during the acute respiratory distress syndrome.** Intensive Care Med 2000; 26: 1575-1577.

CHOPRA, M; REUBEN, J.S; SHARMA, A.C. **Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms.** Exp Biol Med 2009; 234: 361-371.

CHOW, C.W. et al. **Oxidative stress and acute lung injury.** Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29:427-431.

CHUANG, C.C. **Increases in serum macrophage migration inhibitory factor in patients with severe sepsis predict early mortality.** Shock 2007; 27: 503-506.

COHEN, J. **The immunopathogenesis of sepsis.** Nature 2002, 420:19-26.

COTRAN, R.S; KUMAR, V; ROBBINS, C.T. **Pathology basis of disease.** 6^a ed. Philadelphia, W.B. Saunders 1999; 89-112.

COTRAN, R.S; KUMAR, V; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional.** 5^a ed. Guanabara Koogan, 1996; 45-82.

CROUCH, E. **Pathobiology of pulmonary fibrosis.** Am Physiol Soc 1991; 259: L159-L184.

D' ANGELO, E. et al. **Chest Wall interrupter resistance in a anesthetized paralyzed humans.** J Appl Physiol 1994; 77: 883-887.

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

DE HEMPTINNE, Q. ET AL. **ARDS: a Clinicopathologic Confrontation.** Chest 2008; 31: 1708-1741.

DEITCH, E.A. et al. **Evidence favoring the role of the gut as a cytokine generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock.** Shock 1994; 1: 141-146.

DEITCH, E.A. **Rodent models of intra-abdominal infection.** Shock 2005; 1:19-23.

DELLINGER, R.P. et al. **For the surviving sepsis campaign management guidelines committee. Surviving sepsis guidelines for management of severe sepsis and septic shock.** Crit Care Med 2004; 32: 858-873.

DESAI, S.R. et al. **Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary injury: a comparative CT study.** Radiology 2001; 218: 689-693.

DHAINAUT, J.F. et al. **Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multiple organ dysfunction: data from the PROWESS trial.** Intensive Care Med 2003; 29:894-903.

DINARELLO, C.A. **Proinflammatory cytokines.** Chest 2000; 118: 503-508.

DOMBROVSKIY, V.Y, et al. **Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003.** Crit Care Med 2007; 35: 1244-1250.

DONATI, S.Y; PAPAIZIAN, L. **Role of open-lung biopsy in acute respiratory distress syndrome.** Curr Opin Crit Care 2008; 14: 75-79.

EBIHARA, T. et al. **Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects.** Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 1569-1576.

EGGIMANN, P. et al. **Acute respiratory distress syndrome after bacteremic sepsis does not increase mortality.** Am J Respir Care Crit Med 2003; 167:1210-1214.

EISSA, N.T. et al. **Effect of PEEP on the mechanics of the respiratory system in ARDS patients.** J Appl Physiol 1992; 73: 1728-1735.

ENOH, V.T. et al. **Mice depleted of $\alpha\beta$ but not $\gamma\delta$ T cells are resistant to mortality caused by cecal ligation and puncture.** Shock 2007; 27: 507-519.

ENTZIAN, P. et al. **Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients: pronounced augmented concentrations in the adult respiratory distress syndrome.** The American Review of Respiratory Disease 1990; 142: 1079-1082.

ERICKSON, S.E, et al. **Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005.** Crit Care Med 2009; 37:1574-1579.

ESMON, C.T. **Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?** Crit Care Med 2004; 32:19-22.

FAFFE, D.S, et al. **Mouse strain dependence of lung tissue mechanics: Role of specific extracellular matrix composition.** Respir Physiol Neurobiol 2006; 152:186-196.

FAFFE, D.S, et al. **Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice.** Eur Respir J 2000; 15: 85-91.

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

FEIN, A.M; CALALANG-COLUCCI, M.G. **Sepsis and Septic Shock: Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock.** Crit Care Clin 2000; 16: 289-317.

FIALKOW , L. et al. **Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome.** Critical Care 2006; 10: 1-14.

FLIGIEL, S.E.G. et al. **Matrix Metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury.** Hum Pathol 2006; 37: 422-430.

FLORI, H.R. et al. **Early elevation of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 in pediatric acute lung injury identifies patients at increased risk of death and prolonged mechanical ventilation.** Pediatr Crit Care Med 2003; 4: 315-321.

FUJISHIMA, S. et al. **Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients.** Biomed. Pharmacother 2008;. 62, 333-338.

FUKUDA, Y. et al. **The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage.** Am J Pathol 1987;126:171-182.

FULLMER, H.M; SHEETZ, J.H; NARKATES, A.J. **Oxytalan connective tissue fibers: a review.** J Oral Pathol 1974; 3: 291-316.

GAGGAR, A; OLMAN, M.A. **Biologic markers of mortality in acute lung injury.** Clin Chim Acta 2006; 372: 24-32.

GALANOS, C; FREUDENBERG, M.A. **Mechanism of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity.** Immunobiology 1993, 187: 346-356.

GALEN, B; TOEWS, M.D. **Cellular alterations in fibroproliferative lung disease.** Chest 1999; 116: 112-116.

GARCIA, C.S.N.B; PELOSI, P; ROCCO, P.R.M. **Síndrome do Desconforto Respiratório agudo pulmonar e extrapulmonar: existem diferenças?** Revista Brasileira de Terapia Intensiva 2008; 20: 178-183.

GARG, H.G; ROUGHLEY, P.J; HALES, C.A. **Proteoglycans in lung disease. Lung Biology in Health and Disease.** Marcel Dekker, New York: 2003.

GARRIDO, A.G; FIGUEIREDO, L.F.P; SILVA, M.R. **Experimental models of sepsis and septic shock: an overview.** Acta Cir Bras 2004; 19:82-88.

GATTINONI, L. et al. **Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by Pulmonary and Extrapulmonary Disease.** Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:3-11.

GEISER, T. **Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury- a translational approach.** SWISS MED WKLY 2003; 133:586-590.

GOLDSTEIN, R.H. **Control of type I collagen formation in the lung.** Am. J. Physiol. 1991; 5: L29-40.

GOODMAN, L. et al. **Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlations.** Radiology 1999; 213: 545-552.

GOVINDARAJU, V. et al. **Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration.** Am. J. Physiol.Cell. Physiol. 2006; 291: C957-965.

GREENLEE, K.J; WEBB, Z; KHERADMAND, F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. **Physiol. Rev. 2007; 87: 69-98.**

GREGORY, T.J. et al. Surfactant chemical composition and biophysical in acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Clinical Investigation 1991; 88:1976-1981.**

GROENEVELD, A.B. et al. **Circulating inflammatory mediators predict shock and mortality in febrile patients with microbial infection.** Clin Immunol 2003; 106:106-115.

GUNDERSEN K. et al. **Fibre types, calcium-sequestering proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat.** J Physiol 1988; 398:177-189.

GURLEYIK, G. et al. **Effects of granulocyte-colony stimulating factor on the polymorphonuclear leukocyte activity and the course of sepsis in rats with experimental peritonitis.** Surg Today 2007; 37: 401-405.

HAC, S. et al. **Method Improvement: released cecal ligation-septic shock model.** Pathophysiology 2004; 11:103-105.

HADJIMINAS, D.J. et al. **Enhanced survival from cecal ligation and puncture with pentoxifyline is associated with altered neutrophil trafficking and reduced interleukin-1 beta expression but not inhibition of tumor necrosis factor synthesis.** Surgery 1994; 116:348-355.

HALLMAN, M. et al. **Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure.** J Clin Invest.1982; 673-683.

HAMACHER, J. et al. **Tumor necrosis factor-alfa and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 983-991.

HARTOG, C.M. et al. **Pulmonary matrix metalloproteinase excess in hospital-acquired pneumonia.** Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 593-598.

HIRANI, N; DONNELLY, SC. **The early inflammatory response in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS).** In: Snajder, Ma (ed.) Acute Respiratory Distress Syndrome: Cellular and molecular mechanisms and clinical management. New York: Plenum Press, 1998.

HOELZ, C. et al. **Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies.** Pathol Res Pract 2001; 197:521-530.

HOTCHKISS, R.S; KARL, I.E. **The Pathophysiology and Treatment of Sepsis.** N Engl J Med 2003; 348:138-150.

HSIA, C.C, et al. **An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative**

assessment of lung structure. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010; 181: 394-418.

HUANG, D.T; ANGUS, D.C. **Designing clinical trials in acute lung injury / acute respiratory distress syndrome.** Curr Opin in Crit Care 2006; 12: 32-36.

HUBBARD, W.J. et al. **Cecal ligation and puncture.** Shock 2005; 24:52-57.

HUNTER, P. **Sepsis under siege. A new understanding of sepsis might lead to the development of therapies to treat septic shock.** Eur Mol Biol Org 2006; 7: 667-669.

IDELL, S. **Coagulation, fibrinolysis and fibrin deposition in acute lung injury.** Crit Care Med 2003; 31: S213-S220.

IMAI, Y. et al. **Injurius Mechanical Ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of Acute Distress Syndrome.** Jama 2003; 289: 2104-2112.

INGBAR, D.H. **Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury.** Clin Chest Med 2000; 21: 589-616.

INOUE, G. **Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS induced acute lung injury.** *J Infect Chemother* 2000; 6: 51–60.

JEAN-BAPTISTE, E. **Cellular Mechanisms in sepsis.** J Intensive Care Med 2007; 22:63-72.

JIA, S.H. et al. **Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis.** J Clin Invest 2004, 113:1318-1327.

KABIR, K. et al. **Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury.** Shock 2002; 17: 300-303.

KAO S.J. et al. **Endotoxin-induced acute lung injury and organ dysfunction are attenuated by pentobarbital anaesthesia.** Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34: 480-487.

KASAMA, T. et al. **Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10.** *J Immunol* 1994; 152: 3559–3569.

KAWABATA, K; HAGIO, T; MATSUOKA, S. **The role of neutrophil elastase in acute lung injury.** *Eur J Pharmacol* 2002; 451:1-10.

KIM, S.J. et al. **Recovery from lung injury in survivors of acute respiratory distress syndrome: difference between pulmonary and extrapulmonary subtypes.** *Intensive Care Med* 2004; 30:1960-1963.

KNOBEL, E. **Conduitas no paciente grave.** 2ª edição, Atheneu, São Paulo: 2002, 18-46.

KOCHI, T. et al. **Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats.** *J Appl Physiol* 1988; 64: 441-450.

KOPP, E.B; MEDZHITOV, R. **The Toll-receptor family and control of innate immunity.** *Curr Opin Immunol* 1999; 11:13-18.

KREIN, P.M, et al. **Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 83-90.

KREIN, P.M; WINSTON, B.W. **Roles of insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease.** *Chest* 2002; 122:289-293.

KUNIG, A.M. et al. **Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006; 291: L1068-1078.

LACHMANN, B; ROBERTSON, B; VOGEL, J. **In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome.** *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24: 231-236.

LAENNEC, R.T.H. **A treatise on the diseases of the chest: In which they are described according to their anatomical characters, and their diagnosis**

established on a new principle by means of acoustic instruments. Translated by Forbes. Birmingham, AL: Classics of Medicine Library; 1979.

LEITE-JUNIOR, J.H. et al. **Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice.** *Crit Care Med* 2008; 36: 2621-2628.

LEON, L.R; WHITE, A.A; KLUGER, M.J. **Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice.** *Am J Physiol* 1998; 275:269-277.

LI, X. et al. **Apoptosis in lung injury and remodeling.** *J Appl Physiol* 2004; 97: 1535-1542.

LI, Z. et al. **Dynamic changes of tissue factor pathway inhibitor type 2 associated with IL-1 beta and TNF-alfa in the development of murine acute lung injury.** *Thrombosis Research* 2008; 123: 361-366.

LO, C.J; FU, M; CRYER, H.G. **Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome.** *J Surg Res* 1998; 79:179–184.

LLORING, S.H; MEAD, J. **Action of the diaphragm on the rib cage inferred from forced-balance analysis.** *J Appl Physiol* 1982; 53:756-60.

LU, Q; HARRINGTON, E.O; ROUNDS, S. **Apoptosis and lung injury.** *Keio J Med* 2005; 54:184-189.

LUCAS, R. et al. **Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury.** *Biochem. Pharmacol.* 2009; 77: 1763-1772.

MACCALLUM, N.S; EVANS, T.W. **Epidemiology of acute lung injury.** *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:43-49.

MAIANSKI, N.A; MAIANSKI, A.N; KUIJPERS, T.W; ROOS, D. **Apoptosis of neutrophils.** *Acta Haematol* 2004, 111:56-66.

MAIER, S. et al. **Cecal Ligation and Puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis.** Shock 2004; 21:505-511.

MALLOY, J. **Alterations of the Endogenous Surfactant System in Septic Adult Rats.** Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 617-623.

MANNEL, D.N. **Advances in Sepsis research derived from animal models.** Int. J. Med. Microbiol 2007.

MANIATIS N.A, et al. **Endothelial pathomechanisms in acute lung injury.** Vascul Pharmacol 2008; 49: 119-133.

MANIATIS, N.A; ORFANOS, S.E. **The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.** Curr. Opin. Crit. Care 2008; 14: 22-30.

MARSHALL, J.C. et al. **Source Control in the management of severe sepsis and septic shock: An evidence-based review.** Critl Care med 2004; 32:S513-S526.

MARSHALL R.P. et al. **Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome.** Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1783-1798.

MARTIN, G.S; BERNARD, G.R. **Management of respiratory dysfunction in patients with severe sepsis.**The sepsis text. Kluwer Academic Publishers 2002; 455-477.

MARTIN, T.R; NAKAMURA, M; MATUTE-BELLO, G. **The role of apoptosis in acute lung injury.** Crit Care Med 2003; 31:184-188.

MATHAY, M.A; H.G. FOLKESSON; A.S. VERKMANAS. **Salt and water distal airway epithelia in the adult lung.** Am J Physiol (Lung Cell Mol. Physiol) 1996; 270: L487-L503.

MATUTE-BELLO, G. et al. **Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 1997; 156:1969-1977.

MMATUTE-BELLO, G. et al. **Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome.** Crit Care Med 2000, 28:1-7.

MEDURI, G.U. **An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis:disease pathophysiology and the design of treatment investigation.** Sepsis 1999; 3: 21-28.

MEDURI, G.U. **Glucocorticoid treatment of sepsis and acute respiratory distress syndrome. Time for a critical reappraisal.** Crit Care Med 1998; 26: 630-633.

MEDURI, G.U. **Host defense response and outcome in ARDS.** Chest 1997; 112: 1154-1158.

MEDURI, G.U. **The role of host defense response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiologic correlations and response to glucocorticoid treatment.** Eur Respir J 1996; 9: 2650-2670.

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

MENEZES, S.L.S. et al. **Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses.** J Appl Physiol 2005; 98: 1777-1783.

MILBERGH, J.A. et al. **Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS):1983-1993.** JAMA 1995; 273:306-309.

MIJAILOVICH, S.M; STAMENOVIC, D; FREDBERG, J.J. **Toward a kinetic theory of connective tissue micromechanics.** J Appl Physiol 1993; 74: 665-681.

MONTES, G.S. **Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibres in tissues.** J Braz Assoc Adv Sci 1992; 44: 224-233.

MONTES, G.S. **Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic system.** Cell Biology International 1996; 20: 15-27.

MOORE, F.A. et al. **Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma.** J Trauma 1991; 31: 629-638.

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

MUNGER, J.S. et al. **The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.** Cell 1999; 96:319–328.

MUTHU, K. et al. **Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis.** Journal of Neuroimmunol 2005; 158:50-57.

NAGATA, S. **Apoptosis by death factor.** Cell Press 1997; 88: 355-365.

NEGRI, E.M. et al. **Acute remodelling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen elastic system fibers.** Pathol Res Pract 2002; 198: 355-361.

NELSON, A.R. et al. **Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications.** J Clin Oncol 2000; 18: 1135-49.

NUNES, S; VALTA, P; TÁCALA, J. **Changes in respiratory and gas exchange during the acute respiratory distress syndrome.** Acta Anaesthesiol Scand 2006; 50:80-91.

OBERHOLZER, A; OBERHOLZER, C; MOLDAWER, L.L. **Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states.** Crit. Care Med. 2000; 28: N3-12.

OLIVEIRA, G.P. et al. **Intravenous glutamine decreases lung and distal organ injury in a experimental modelo f abdominal sepsis.** Crit Care Med 2009; 13:1-11.

ORFANOS, S.E. et al. **Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill.** Intensive Care Med 2004; 30: 1702-1714.

PAPAZIAN, L. et al. **A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients.** Crit Care Med 2007; 35: 755-762.

PARK, W.Y. et al. **Cytokine balances in the lung of patients with acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care 2001; 164: 1896-1903.

PARSONS, P.E. et al. **Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury.** Crit Care Med 2005; 33:1-6.

PÁSSARO C.P. et al. **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: 1011-1017.

PECIANLLI, N.R, et al. **Influence of murine toxocara canis infection on plasma and Bronchial Alveolar Lavage Fluid eosinophil numbers and it's correlation with cytokine levels.** Veterinary Parasitology 2005; 134: 121-130.

PELOSI, P. et al. **Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different.** Eur Respir J 2003; 22: 48s-56s.

PELOSI, P; GATTINONI, L. **Acute respiratory distress syndrome of pulmonary and extrapulmonary origin: fancy or reality?** Intens Care Med 2001, 27:457-460.

PELOSI, P; ROCCO, P.R.M. **Airway closure: the silent killer of peripheral airways.** Crit Care Med 2007; 11:114.

PHUA, J. et al. **Has mortality from acute respiratory distress syndrome decrease over time? : a systematic review.** Am J Respir Crit Care Med 2009; 179: 220-227.

PITTET, J.F. et al. **Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 155: 1187-1205.

PITTET, J.F. et al. **TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury.** J Clin Invest 2001; 107:1537-1544.

PUGIN, J. et al. **Activation of human macrophags by mechanical ventilation in vitro.** Am J Phisiol 1998; 275:1040-1050.

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

QUADRI, S.K; BHATTACHARYA, J. **Resealing of endothelial junctions by focal adhesion kinase.** Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.2007; 292: L334-L342.

RAGHOW, C.C; HOLADAY, D.A. **Constant flow inflation of the lungs. Theoretical analysis.** Acta Anaesthesiol Scand 1966; 23:S211-223.

RAGHOW, R. **The role of extracellular matríz in postinflammatory wound healing and fibrosis.** The FASEB Journal 1994; 8: 823-831.

RAZAVI, H.M. et al. **Pulmonary Neutrophil Infiltration in Murine Sepsis.** Am J Respir Crit Care Med 2004; 170:227-233.

REMICK, D.G. et al. **Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysacharide vs cecal ligation and puncture.** Shock 2000; 13: 110-116.

REMICK, D.G. et al. **Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days.** Shock 2002; 17: 463–467.

RITTIRSCH, D. et al. **Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture.** Nature Protocols 2009; 4:31-36.

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

ROCCO, P.R.M, et al. **Lung Tissue Mechanics Extracellular Matríz Remodelling in Acute Lung Injury.** Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1067-1071.

ROCCO, P.R.M; NEGRI, E.M. **Understanding pulmonary and extrapulmonary ARDS by a novel experimental model in Anaesthesia, pain, Intensive Care and Emergency Medicine.** Gulo A. Springer-Verlag, Milão: 2004.

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

ROCCO, P.R.M. et al. **Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodelling at an early phase of acute lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 677-684.

ROCCO, P.R.M; ZIN, W.A. **Experimental models of lung disease.** In: *Anesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency.* Gulo A. Springer Verlag: 2002, 51-66.

ROCCO, P.R.M; ZIN, W.A. **Pulmonary and extrapulmonary ARDS: are they different?** *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:10-17.

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

ROCCO, P.R.M; DOS SANTOS C; PELOSI, P. **Lung parenchyma remodelling in acute respiratory distress syndrome.** *Minerva Anesthesiol* 2009; 75: 730-740.

ROJAS, M. et al. **Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 288: L333-L341.

RUBENFELD, G.D. et al. **Incidence and outcomes of acute lung injury.** *N Engl J Med* 2005; 353: 1685-1693.

RUSSEL, J.A, et al. **Changing Pattern of organ dysfunction in early human sepsis is related to mortality.** *Crit Care Med* 2000; 28: 3405-3411.

SAKR, Y. et al. **Time course and relationship between plasma Selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure.** Brit J Anaesth 2007; 1-10.

SALDIVA, PH. et al. **Alveolar pressure measurement in open-chest rats.** Journal of Applied Physiology 1992; 72: 302-306.

SALLES, M.J.C, et al. **Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepse-revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia.** Vet Assoc Med Bras 1999; 45: 86-92.

SANTOS, F.B. et al. **Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury.** J Appl Physiol 2006; 100: 98-106.

SAYEED, M.M. **Delay of neutrophil apoptosis can exacerbate inflammation in sepsis patients: cellular mechanisms.** CritCare Med 2004, 32:1604-1606.

SCHWARZ, M.A. **Acute lung injury:cellular mechanisms and disarrangements.** Pediatr Respir Rev 2001; 2:3-9.

SEVRANSKY, J.E. et al. **Pulmonary vs Nonpulmonary sepsis and mortality in acute lung injury.** Chest 2008; 134: 534-538.

SHEPHERD, K.E, et al. **Elastic fibres and the diagnosis of bacterial pneumonia in ARDS.** Crit Care Med 1995; 23: 1829-1834.

SHIMABUKURU, D.W; SAWA, T; GROPPER, M.A. **Injury and repair in lung and airways.** Crit Care Med 2003; 31: S524-S531.

SINGLETON, K.D, et al. **Glutamine attenuates lung and improves survival after sepsis:role of enhanced heat shock protein expression.** Crit Care Med 2005, 33: 1206-1213.

SOOKHAI, s. et al. **A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil mediated lung injury in vivo.** Ann Surg 2002; 235: 285-291.

SOUZA, A.B. et al. **Lung Tissue Remodeling in the acute respiratory distress syndrome.** J Pneumol 2003; 29: 235-245.

STARCHER, B.C. **Lung elastin and matrix.** Chest 2000; 117: 229-234.

STEINBERG, K.P, et al. **Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1994;150:113-122.

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

SUNTHARALINGAM, G. et al. **Cytokine storm in a phase I trial of the anti-CD 28 monoclonal antibody TGN1412.** N Engl J Med 2006; 355: 1018-1028.

TAKEDA, K. **Evolution and integration of innate immune recognition systems: the toll-like receptors.** J Endotoxin Res 2005; 11:51-55.

TANEJA, R. et al. **Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity.** Crit Care Med 32:1460–1469, 2004.

TASAKA, S; HASEGWA, N; ISHIZAKA, A. **Pharmacology of acute lung injury.** Pulm Pharmacol Ther 2002; 15: 83-95.

TOMASHEFSKI, J.F. **Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome.** Clin Chest Med 2000; 21: 435-466.

TRAN, N. et al. **Toll-like receptor 9 expression in murine and human adrenal glands and possible implications during inflammation.** J Clin Endocrin Metab. 2007.

TURNBULL, I.R. et al. **Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture.** Shock 2003; 19:310-313.

UDOBI, K.F; CHILDS, E; TOUIJER, K. **Acute Respiratory Distress Syndrome.** Am Farm Physician 2003; 67: 315-22.

VAN, D.P.T. et al. **Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis.** *J Immunol* 1995, 155:5397-5401.

VAN DER POLL, T. et al. **MOLDAWER LL. Effects of IL-10 on systemic inflammatory response during lethal primate endotoxemia.** *J Immunol* 1997;**158**: 1971–1975.

VASSELON, T; DETMERS, P.A. **Toll receptors: a central element in innate immune responses.** *Infect Immun* 2002; 70:1033-1041.

VINCENT, J.L. et al. **Sepsis diagnosis and management: work in progress.** *Minerva Anesthesiol* 2006; 72: 87-96.

VISINTIN, A. et al. **Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to toll-like receptor 4.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12156-12161.

WALLACE, W.A.H; DONNELLY, SC. **Pathogenesis of acute microvascular lung injury and the acute respiratory istress syndrome.** *European Respiratory Monography* 2002; 7:22-32.81-

WARD, P.A; HUNNINGHAKE, G.W. **Lung Inflammation and fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: S123-129.

WANG, X.D; ANDERSON, R. **Intestinal brush border membrane function.** *Scand. J Gastroenterol* 1994; 26: 289-299.

WARE, L.B, MATTHAY, M.A.**The Acute Respiratory Distress Syndrome.** *N Engl J Med* 2000; 342: 1334-1349.

WEIBEL, E.R. **Morphometry: stereological theory and practical methods.** In: **J Gil editor. Models of Lung Disease - Microsurgery and Structural Methods.** Marcel Dekker, New York: 1990; 47:199-247.

WEIGERT, C. **Über eine method zur farbung elastischer fasern.** *Zentraibi Allg Pathol Anat* 9: 289-292, 1898).

WEILAND, J.E; WB DAVIS. **Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and Pathophysiologic significance.** Am Rev Respir Dis 1986; 133:218-225.

WEINBERGER, S.E. et al. **Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease.** Ann. Intern. Med. 1978; 89: 459-466.

WESCHE, D.E. et al. **Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock.** J Leukoc Biol 2005, 78:325-337.

WHEELER, A.P; BERNARD, G.R; RINALDO, J.E. **Future clinical trials of pharmacological therapy of adult respiratory distress syndrome.** In Artigas A, Lemaire F, Suter PM, Zapol WM, eds. Adult Respiratory Distress Syndrome. Churchill Livingstone, London: 1991, 499-507.

WHEELER, A.P; BERNARD, G.R. **Treating patients with severe sepsis.** New Engl J Med 1999; 340: 207-215.

WICHTERMANN, K.A; BAUE, A.E; CHAUDRY, I.H. **Sepsis and shock: a review of laboratory models and a proposal.** J Surg Res 1980; 29:189-201.

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

WINKLER, M.K; FOWLKES, J. **Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis?** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: L1-L11.

WISCHMEYER, P.E. **Glutamine and heat shock protein expression.** Nutrition 2002; 18:225-228.

YE, R.D. **Leukocyte inflammatory mediators and lung pathophysiology: an update.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286: 461-462.

YEH, C.C. et al. **The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro.** Life Sci 2007; 80: 1821-1831.

YEH, C.L. et al. **Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokine and interleukin-6 expressions in septic mice.** Cytokine 2005; 31:329-334.

YILMAZ, M. et al. **Six month survival of patients with acute lung injury: prospective cohort study.** Crit Care Med 2007; 35: 2303-2307.

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

ZANETTI, G. et al. **Cytokine production after intravenous of peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice.** J Immunol 1992, 148:1890-1897.

ZANTL, N. et al. **Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendans stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis.** Infect Immun 1998, 66: 2300-2309.

ZEIHER, B.G, et al. **Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study.** Crit Care Med 2004; 32:1695-1702.

ZHAO, Y.Y. et al. **Endothelial cell-restricted disruption of FoxM1 impairs endothelial repair following LPS-induced vascular injury.** J Clin Invest 2006; 116: 2333-2343.

ZIEGER, T.R. et al. **Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients.** Arch Surg 1988; 123:1313-1319.

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](#)