

CHRISTIANE COSTA CALCIOLARI

**Modulação da expressão gênica de
componentes envolvidos no processo de
remodelamento pulmonar em diferentes
modelos de lesão induzida pela ventilação
mecânica**

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

Programa de: Patologia

Orientadora: Profa Dra. Elnara Márcia Negri

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

reprodução autorizada pelo autor

Calciolari, Christiane Costa

Modulação da expressão gênica de componentes envolvidos no processo de remodelamento pulmonar em diferentes modelos de lesão induzida pela ventilação mecânica / Christiane Costa Calciolari. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Elnara Márcia Negri.

Descritores: 1.Lesão pulmonar aguda 2.Expressão gênica 3.Mecanotransdução celular 4.Matriz extracelular 5.Ventilação mecânica

USP/FM/DBD-242/10

DEDICATÓRIA

Aos meus verdadeiros e eternos mestres, *Rose e Tércio* (in memorium), pela
doação incondicional e pelo esforço em nos preparar para a vida.

Às duas preciosidades que Deus colocou em minha vida, *Lucas e Eurico*,
que me mostram, diariamente, a alegria da vida.

Aos meus irmãos, *Claudia e Marcos*, pelo laço que nos une.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Elnara Márcia Negri que se mostrou uma verdadeira mestra no desafio de me orientar. Obrigada pela confiança, amizade, paciência em ensinar e compreensão diante dos problemas e dificuldades encontradas.

Às companheiras de experimento, Vivien S. Piccin e Kelly Yoshizake, que não só acompanharam, mas também sofreram junto diante das dificuldades encontradas no desenvolvimento do estudo.

Aos companheiros do LIM 09, em especial à Susimeire Gomes e Otília, que tornaram possível a realização do experimento.

Aos colegas do laboratório de Biologia celular, Cristina, Valéria, Gildásio, Felipe, Nilza, Maria Ines, Adão, pela competência e prontidão em ajudar.

À Dra Marisa Dolhnikoff e Tatiana Lanças pelo auxílio nas técnicas empregadas.

Aos amigos do LIM 51 pelo carinho e pela colaboração plena em todos os momentos de precisão.

Um agradecimento especial à Denise F. Barbeiro, que se tornou uma grande amiga, obrigada pela paciência e dedicação em me ensinar.

À Liduvina Barros, mais do que uma secretária competente, uma pessoa pronta a ajudar em qualquer situação.

Aos amigos que ajudaram direta ou indiretamente na realização desta Tese.

Agradeço à Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) pela concessão da bolsa e
apoio financeiro. Processo 07/55285-9

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	02
1.1	Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica.....	02
1.2	Mecanotransdução.....	06
1.3	Matriz Extracelular.....	07
1.4	Proteoglicanos.....	08
1.5	Ventilação Mecânica x MEC.....	09
1.6	Heterogeneidade do Parênquima Pulmonar.....	11
2	Objetivos	14
3	Métodos	16
3.1	Grupo Experimental.....	16
3.2	Protocolo da Ventilação Mecânica.....	18
3.3	Expressão Gênica.....	20
3.3.1	Extração de RNA.....	21
3.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase.....	22
3.4	Morfometria.....	25
3.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	25
3.6	Análise Estatística.....	26
4	Resultados	28
4.1	Sinais Vitais durante o Experimento.....	28
4.2	Mecânica Respiratória.....	28

4.3	Exames laboratoriais.....	30
4.4	Morfometria.....	30
4.4.1	Infiltrado Inflamatório.....	31
4.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	33
4.6	Expressão Gênica.....	36
4.6.1	Obtenção da 1ª fita de DNA complementar (cDNA).....	37
4.6.2	Eletroforese em gel agarose dos primers utilizados.....	38
4.6.3	Análise da PCR.....	41
5	Discussão.....	44
6	Conclusões.....	51
7	Referências	53

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP	alta pressão
AV	alto volume
CCL2/MCP-1	quimiocina ligante 2 / proteína quimiotática monocítica
CCL5/RANTES	quimiocina ligante 5
Cdin	complacência dinâmica
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂	dióxido de carbono
CTR	grupo controle
CXCL8/IL-8	quimiocina/interleucina – 8
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EtCO₂	dióxido de carbono exalado total
FC	freqüência cardíaca
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FiO₂	fração inspirada de oxigênio
FR	frequência respiratória
GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
HCO₃	Bicarbonato
HE	hematoxilina-eosina
IL	Interleucina
LPA	lesão pulmonar aguda
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase de matriz
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NLRP3/ASC	“nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family members”
oligoDT	Oligonucleotídeo
P2X₄/P2X₇	receptores purigérgicos

PaCO₂	pressão arterial de Dióxido de carbono
PAF	fator de agregação plaquetária
PAM	pressão arterial media
PaO₂	pressão arterial de oxigênio
pb	par de base
PCIII	procolágeno III
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEEP	pressão expiratória final positiva
PG	Proteoglicano
PImax	pressão inspiratória máxima
Pmédia	pressão média
Ppico	pressão de pico
Pplatô	pressão platô
RNA	ácido desoxirribonucléico
RNAsin	ribonuclease inhibitor
rRNA	ácido desoxirribonucléico ribossomal
Rt	Resistência
RT	transcriptase reversa
SaO₂	saturação arterial da oxihemoglobina
SD	desvio padrão
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
SLRP	pequenos proteoglicanos ricos em leucina
SPSS	“Statistical Package for the Sciences
TGF	fator de crescimento de transformação
TLR	receptores toll-like
TNF-α	fator de necrose tumoral – alfa
TXB2	tromboxano B2
VC	volume corrente
VILI	ventilator induced lung injury
VM	ventilação mecânica
Vt	tidal volume

TABELAS

Tabela 1	–	Protocolo de Ventilação Mecânica.....	19
Tabela 2	–	Relação dos <i>Primers</i> utilizados para realização da PCR.....	24
Tabela 3	–	Análise descritiva dos sinais vitais e balanço hídrico.....	28
Tabela 4	–	Variáveis ventilatórias e valores descritivos da mecânica pulmonar.....	29
Tabela 5	–	Exames laboratoriais.....	30
Tabela 6	–	Média de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar.....	32

FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar.....	31
Figura 2 – Infiltrado inflamatório da região não dependente e dependente	32
Figura 3 – Microscopia Eletrônica do grupo Controle, amplificação 1850x	33
Figura 4 – Microscopia Eletrônica do grupo Controle, amplificação 6200x	34
Figura 5 – Microscopia Eletrônica do grupo Alto Volume, amplificação 1850x	34
Figura 6 – Microscopia Eletrônica do grupo Alto Volume, amplificação 6200x	35
Figura 7 – Microscopia Eletrônica do grupo Alta Pressão, amplificação 1850x	35
Figura 8 – Microscopia Eletrônica do grupo Alta Pressão, amplificação 6200x	36
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> GAPDH	37
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Decorina	38
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Versican	39
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Biglican	39
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Lumican	40
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Alfa-actina	40
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o <i>primer</i> Interleucina-8	41
Figura 16 – Gráficos da Expressão Gênica dos componentes da Matriz Extracelular	42

RESUMO

Calciolari CC. *Modulação da expressão gênica de componentes envolvidos no processo de remodelamento pulmonar em diferentes modelos de lesão induzida pela ventilação mecânica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 61p.

INTRODUÇÃO: Apesar de ser essencial, em algumas situações a ventilação mecânica (VM) pode acarretar danos ao pulmão sadio, evento conhecido como lesão pulmonar induzida pela ventilação ou “ventilator-induced lung injury” – VILI. Esse processo depende da ação de forças mecânicas e da resposta inflamatória pulmonar. **OBJETIVO:** No presente estudo, analisamos a inflamação pulmonar e a expressão gênica de proteoglicanos e proteínas do citoesqueleto em resposta a dois mecanismos de VILI (alto volume e alta pressão). **MÉTODOS:** Vinte e um coelhos foram randomizados em três grupos: Controle (CTR), n=6; VC=8ml/kg, PEEP=5cmH₂O, fluxo= 2l/min; Alto volume (AV), n=7; VC=16 ml/kg, PEEP 5cmH₂O, fluxo= 3 l/min e Alta pressão (AP), n=8; com pressão inspiratória máxima (PIMAX) de 30cmH₂O e PEEP=12cmH₂O, com a intenção de manter o mesmo volume corrente do grupo controle. Os animais foram ventilados por 3h30m e subsequentemente exsanguinados. **RESULTADOS:** Houve redução na complacência dinâmica do grupo AP quando comparado aos grupos CTR (p=.001) e AV (p=.000). A análise histológica não mostrou diferença no infiltrado das células inflamatórias entre os grupos, da mesma forma, não foram encontradas diferenças na expressão gênica da interleucina-8. A expressão gênica da alfa-actina não apresentou nenhuma diferença estatística entre os grupos. Diferenças na expressão dos proteoglicanos, entre as regiões pulmonares, foram observadas somente no grupo AV, com aumento da expressão gênica do biglican (p=.004) e lumican (p=.003) na região não dependente. A comparação da região não dependente entre os grupos mostrou aumento da expressão do biglican no grupo AP versus o CTR (p=.005). A análise entre os grupos da região dependente mostrou aumento da expressão da decorina no grupo AP (p=.049) e aumento da expressão do versican no AV (p=.003) e AP (p=.015) versus CTR; e, o grupo AP apresentou aumento na expressão do biglican (p=.007) e do lumican (p=.021). **CONCLUSÃO:** As forças geradas pela VM agem sobre o parênquima pulmonar determinando alterações na expressão gênica de proteoglicanos, independentemente da resposta inflamatória. Pressão e volume agem de forma diversa, sendo as grandes alterações de força impostas pela ventilação com altos volumes, sentidas mais pelas regiões não dependentes do pulmão. A alta pressão transpulmonar mantida mostrou-se como a maior indutora da expressão de fibrogênese dos componentes estudados da MEC.

Descritores: 1.Lesão pulmonar aguda, 2.Expressão gênica, 3.Mecanotransdução, 4.Matriz extracelular, 5.Ventilação mecânica.

SUMMARY

Calciolari CC. *Gene expression of important components involved in lung remodeling process in ventilator induced lung injury* [thesis]. São Paulo:

“Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 61p.

INTRODUCTION: In spite of being essential, in some situations mechanical ventilation (MV) can lead to damages to the lung, an event known as ventilator-induced lung injury. This process depends on the action of mechanical forces and lung inflammatory response. **OBJECTIVE:** Analyze lung inflammation and gene expression of proteoglycans and cytoskeleton proteins in response to two mechanisms of VILI (high volume and high pressure). **METHODS:** Twenty-one rabbits were randomized into three groups: Control, n=6; VT=8ml/kg, PEEP=5 cm H₂O, flow = 2l/min; High volume (HV), n=7; VT=16 ml/kg, PEEP 5 cm H₂O, flow = 3 l/min and High pressure (HP), n=8; with maximal inspiratory pressure (PIMAX) of 30cmH₂O and PEEP 12cmH₂O, with the intention of maintaining the same tidal volume as the LV group.. Animals were ventilated for 3h30m and subsequently exsanguinated. **RESULTS:** There was a reduction in lung compliance in the HP group when compared to control (p=.001) and HV groups (p=.000). Histological analysis did not show difference in inflammatory cells infiltrate between groups, in the same way, no differences in interleukin 8 gene expression were observed. Alpha-actin gene expression did not show any statistical differences between groups. Differences in proteoglycan expression between lung regions were only noticed in the HV group, with Biglycan (p=.004) and lumican (p=.003) gene expression increased in the non-dependent region. Comparisons between groups concerning the non-dependent region showed increased expression of biglycan in HP versus control (p=.005). Comparisons between groups addressing the dependent region showed increased expression of decorin in HP (p=.049) and increased expression of versican in HV (p=.003) and HP (p=.015) versus control; and the HP group showed the highest Biglycan (p=.007) and lumican (p=.021) expressions. **CONCLUSION:** The forces generated by MV act on the lung parenchyma determining alterations in the gene expression of the proteoglycans, independently of the inflammatory response. Pressure and volume act in different ways, being alterations of force imposed by high volumes, felt more by the non-dependent lung regions. The high transpulmonary maintained pressure was the greatest inducer of expression of fibrogenesis related ECM components.

Descriptors: 1.Acute lung injury, 2.Gene expression, 3.Mechanotransduction, 4.Extracellular matrix, 5.Mechanical ventilation.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica

A ventilação mecânica (VM) é uma ferramenta útil, e talvez a mais importante no tratamento dos pacientes em insuficiência respiratória, sendo responsável pela manutenção da homeostase das trocas gasosas em situação de injúria pulmonar grave. Entretanto, apesar de ser essencial, em algumas situações a VM pode acarretar danos ao pulmão sadio, evento conhecido como lesão pulmonar induzida pela ventilação ou “ventilator-induced lung injury” – VILI (Dos Santos e Slutsky, 2000; Dreyfuss e Saumon, 1998; Matthay et al., 2002; Pinhu et al., 2003). A relevância da VILI no tratamento dos pacientes criticamente doentes foi estabelecida por estudos do The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000; 2004), onde a taxa de mortalidade atribuída à VILI foi de, no mínimo, 9 – 10% (Lionetti et al., 2005). Os danos da VILI não são específicos, sendo semelhantes aos encontrados na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA): aumento da permeabilidade endotelial e epitelial e dano tecidual difuso (Garcia et al., 2004; Caruso et al., 2003).

A VILI inicia-se pela aplicação repetida, sobre o tecido pulmonar, de uma excessiva tensão e deformação que afeta estruturas como o

fibroesqueleto, a microvascularização pulmonar, pequenas vias aéreas distais e os tecidos justa-alveolares, que são capazes de reproduzir o quadro clínico da lesão pulmonar aguda (LPA) e da SDRA conforme foi definido na Conferência do consenso de ARDS, em 1994. Hipóteses em que uma série de processos pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos estão envolvidos no curso da VILI pela ativação de mecanismos moleculares estão bem estabelecidos, porém, os mecanismos celulares e moleculares basais da lesão pulmonar causados pelo estresse mecânico não estão totalmente elucidados (Lionetti et al., 2005).

A relação entre a ventilação com altos picos de pressão na via aérea e a lesão pulmonar foi inicialmente demonstrada por Webb e Tierney (1974) em um estudo realizado com ratos ventilados por 1 hora, com e sem aplicação de pressão expiratória final positiva (PEEP). Neste estudo os animais que foram ventilados com pressões de pico de 14cmH₂O não apresentaram nenhuma alteração histológica no tecido pulmonar, já aqueles animais ventilados com altas pressões (entre 30 e 45cmH₂O) apresentaram lesões consistentes e um importante edema alveolar e perivascular, além de hipoxemia e queda na complacência dinâmica (com 45cmH₂O). Demonstrou-se então, que o efeito deletério sobre o pulmão é causado mais pela hiperdistensão do tecido pulmonar, ou seja, refletindo um efeito de volume, do que propriamente pela aplicação da elevada pressão. Esses mesmos achados têm sido demonstrados posteriormente em ensaios com animais de maior tamanho e diferentes tempos de exposição à ventilação mecânica.

Em importante estudo experimental de ventilação mecânica com ratos, limitando-se a entrada de volume através de restrição torácica e abdominal ou pela aplicação de baixo volume, Dreyfuss et al. (1985; 1988) não observaram lesão histológica compatível com LPA. Retirando-se as restrições e, portanto, permitindo um maior volume circulante, observaram edema extravascular pulmonar e aumento da permeabilidade microvascular nos animais ventilados com altos volumes, confirmando os achados de Webb e Tierney de que o alto volume era o principal determinante do estresse lesivo à membrana alvéolo-capilar e ao alvéolo.

Baseando-se nesses estudos iniciou-se a busca por estratégias protetoras que minimizassem os danos causados pela VILI através da diminuição do volume ofertado. O impacto dessas estratégias foi relevante pela diminuição da morbidade e da mortalidade (22%) nos pacientes com SDRA (Amato et al., 1998; ARDSNet, 2000).

Estudos subseqüentes mostraram que a abertura e o fechamento cíclico dos alvéolos, o estiramento e as forças de cisalhamento resultam em lesão pulmonar e disfunção do surfactante (Mead et al., 1970; Dreyfuss et al., 1993; Dos Santos e Slutsky, 2000). Esses mecanismos de lesão causam liberação de mediadores inflamatórios pelo tecido pulmonar lesado que podem atrair neutrófilos e outras células inflamatórias, resultando em uma lesão pulmonar secundária conhecida como biotrauma, estando envolvidos na patogênese da VILI e da resposta inflamatória sistêmica (Pinhu et al., 2003; Slutsky, 2005).

Existem evidências experimentais de que alterações histológicas e processos inflamatórios compatíveis com lesão pulmonar grave também podem ser induzidos pelo emprego de baixo volume total na ventilação. Este evento conhecido por atelectrauma acontece pela abertura e fechamento cíclicos das unidades alveolares produzindo fenômenos de caráter inflamatório. Estudos caracterizados pela aplicação de baixos níveis de PEEP demonstram aumento nos níveis de marcadores inflamatórios medidos no lavado broncoalveolar (Goodman et al., 1996). Estes achados consistem em aumento dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-8, IL-6), fator de agregação plaquetário (PAF), tromboxano B2 (TXB2) e de leucócitos polimorfonucleares que se encontram ativados (Slutsky, 2005). Atualmente, é bastante aceito que o aumento na produção de citocinas, especialmente IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α apresentam importante papel em iniciar e perpetuar a lesão pulmonar (Chiumello et al., 1999; Wilson et al., 2003, 2005; Haitsma et al., 2000, 2003; Bueno et al., 2002; Gurkan et al., 2003).

Não há um consenso na literatura sobre qual é o mais importante mecanismo para a lesão pulmonar induzida pela ventilação. O completo entendimento dos mecanismos que promovem a lesão pulmonar pode permitir estratégias precoces direcionadas à prevenção da VILI e, conseqüente, redução na incidência de VILI induzindo falência de múltiplos órgãos.

1.2 Mecanotransdução

Dados de mecanobiologia demonstram que forças externas são percebidas pelas células, que respondem através de rearranjo do citoesqueleto, mudanças na concentração iônica intracelular e na expressão gênica (Waters et al., 2002). Essas forças externas são denominadas forças de cisalhamento (“shear stress”), as quais são produzidas pelo movimento do ar sobre a superfície celular, gerando assim uma força paralela à membrana plasmática com conseqüente distorção dessa membrana (Schumacker, 2002). Outra forma de distorção sofrida pelo pulmão refere-se à tensão mecânica, que ocorre quando determinada força é aplicada a uma célula causando um estiramento ou uma distorção mecânica no sentido de seu maior eixo (Schumacker, 2002). As proteínas do citoesqueleto comportam-se como transdutores dos sinais do estiramento do pulmão distal, podendo contribuir para as alterações funcionais da VILI, evento denominado de mecanotransdução (Dos Santos e Slutsky, 2000; Dudek e Garcia, 2001; Schumaker, 2002; Waters et al., 2002). A mecanotransdução ocorre no contato célula-célula, matriz extracelular (MEC) – célula, modificando propriedades viscoelásticas da célula, podendo comprometer o balanço das forças no epitélio alveolar (Bershadsky et al., 2003). A ativação de mecanismos de mecanotransdução tecidual colabora com a deflagração da fibrogênese e intensificação do processo inflamatório pela indução de respostas celulares, tais como, produção de citocinas, atração de leucócitos para o pulmão e ativação de canais de íons (Waters et al., 2002; Fischer et

al., 2002; Kumar et al., 2003; Halbertsma et al., 2005). Quando ocorre persistência do processo inflamatório o remodelamento tecidual se dá de maneira inapropriada, cursando com o desenvolvimento de fibroelastose (Scott-Burden, 1994; Negri et al., 2000). As razões para esse fato são desconhecidas, podendo estar envolvidos os seguintes fatores: exposições repetidas ao agente agressor, resposta inflamatória anormal do hospedeiro ou defeito genético no processo de reparação (Negri et al., 2000).

Enquanto muito tem sido estudado em relação à habilidade das células pulmonares em perceber e integrar informações da distorção mecânica, pouco se sabe sobre como essas informações repercutem na MEC e afetam o resultado da ventilação mecânica no paciente grave.

1.3 Matriz Extracelular

A MEC é um complexo supramolecular que constitui um veículo para passagem de células, moléculas hidrossolúveis e diversos íons, além de ser uma barreira à penetração de microorganismos. Essa matriz é formada principalmente por fibras de colágeno e elastina, glicoproteínas adesivas (laminina e fibronectina), glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs) (Bosman e Stamenkovic, 2003; Pelosi e Rocco, 2008). As propriedades mecânicas do parênquima pulmonar dependem em grande parte da integridade da matriz extracelular, além da interação entre seus componentes e as células pulmonares (Sobin et al., 1988).

1.4 Proteoglicanos

PGs são macromoléculas essenciais na matriz extracelular, cuja estrutura consiste de uma proteína central covalentemente ligada a uma ou mais cadeias de polissacarídeos, denominados GAGs (Iozzo, 1998). No pulmão, as famílias de PGs podem ser distinguidas baseadas na composição dos GAGs, peso molecular e função: PG contendo condroitin-sulfato (versican), PG contendo dermatan-sulfato (decorina), PG contendo keratan-sulfato (lumican) e heparan-sulfato (perlecan e glipican) e ácido hialurônico, um GAG que não é sulfatado e nem é ligado a um core protéico (Hardingham e Fosang, 1992; Pelosi e Rocco, 2008). Diferentes subclasses de proteoglicanos têm sido descritas, e incluem os grandes proteoglicanos como versican e agrecan; proteoglicanos da membrana basal, como perlecan; pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP), como a decorina, biglican, lumican e fibromodulina; e proteoglicanos ligados à superfície celular, como o sindecan (Iozzo, 1998; Ludwig, 2007). Estão localizados em diferentes regiões da MEC: o versican no interstício pulmonar; perlecan na membrana basal vascular; decorina no interstício e na membrana basal epitelial ligada com fibras de colágeno; sindecan e glipican na superfície celular (Pelosi e Rocco, 2008). Membros de todas essas famílias de proteoglicanos têm sido identificados no pulmão e apresentam diferentes funções biológicas (Ludwig, 2007).

Versican, devido à alta carga iônica proveniente das múltiplas cadeias de condroitin-sulfato, possui papel essencial em determinar o conteúdo de

água ou turgor da MEC. Por esse mecanismo, o versican influencia o comportamento viscoelástico do tecido, assim como, a migração e a proliferação celular (Ludwig, 2007). Os SLRPs ligam-se ao colágeno e afetam a fibrilogênese, protegendo as fibras da clivagem pelas collagenases (Geng et al., 2006). Os proteoglicanos também ligam diferentes fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento de transformação (TGF) β e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), e através de sua biodisponibilidade influenciam a proliferação celular e deposição da matriz (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991; Ludwig, 2007).

1.5 Ventilação Mecânica x MEC

Existem relatos na literatura documentando que forças mecânicas podem modificar a expressão gênica de diversas moléculas diante de um processo inflamatório (Copland et al., 2003, 2006, 2007) ou de remodelamento (Garcia et al., 2004; Breen, 2000; De Carvalho et al., 2007; Farias et al., 2005).

Berg et al. (1997) relataram que altos volumes pulmonares por 4 horas resultaram em aumento do mRNA para vários componentes da MEC (pró colágeno α_1 (III) e α_2 (IV); fibronectina) e FGF no parênquima pulmonar. Mascarenhas et al. (2004) demonstraram aumento da deposição de hialuronan em pulmões de ratos ventilados com alto volume corrente (VC), com repercussão direta na síntese de IL8. Breen (2000) mostrou que o mRNA para colágeno tipo I estava superexpresso em resposta ao

estiramento mecânico excessivo do parênquima pulmonar *in vitro*. O estiramento das moléculas da MEC pode representar uma resposta autoreguladora stress induzida. Entretanto, poucas informações estão disponíveis a respeito dos efeitos do estresse mecânico sobre os proteoglicanos da MEC.

Espera-se que mudanças nos PG em resposta a perturbações mecânicas levem a alterações nas propriedades mecânicas do pulmão (Ludwig, 2007). Proteoglicanos contribuem para as propriedades viscosas do parênquima pulmonar, já que, as cadeias de GAG's hidrofílicas atraem íons e fluído para a matriz afetando o turgor tecidual e a viscoelasticidade (Cavalcante et al., 2005; Iozzo, 1998). Cavalcante et al. (2005) postularam que os PGs atuam para estabilizar a rede colágeno-elastina do tecido conectivo através dos seus efeitos na osmolaridade tecidual, contribuindo para a elasticidade do pulmão e estabilidade do alvéolo em baixos e médios volumes. Miserocchi et al. (2001) e Negrini et al. (1998) têm publicado uma série de trabalhos mostrando que os proteoglicanos influenciam criticamente o desenvolvimento de edema através de seus efeitos na complacência intersticial pulmonar. As propriedades elásticas pulmonares de camundongos com deficiência de decorina foram diferentes das observadas em camundongos selvagens tanto *in vivo* como *in vitro* (Fust et al., 2005) mostrando o impacto da composição da MEC sobre as propriedades mecânicas do órgão. Sendo assim, alterações nos GAGs em resposta à VM podem representar o evento primário que deflagraria os mecanismos de lesão envolvidos na VILI (Moriondo et al., 2007). Paralelamente, GAGs

possuem interações altamente específicas com várias quimiocinas, como CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8 (Johnson et al., 2005). Além disso, GAGs podem agir como ligantes para os receptores toll-like pró-inflamatórios (Schaefer et al., 2005). Por isso, a fragmentação dos GAGs e a degradação dos PGs podem ter um impacto no desenvolvimento da resposta inflamatória encontrada na VILI (Ludwig, 2007).

O conhecimento do papel destas moléculas contribuirá para a elucidação de mecanismos que regulam a sinalização e controle da deposição de elementos da matriz extracelular no remodelamento pulmonar na VILI, bem como, a modulação da inflamação.

1.6 Heterogeneidade do Parênquima Pulmonar

As forças que atuam sobre o parênquima pulmonar (estresse e distensão) não são uniformes. O septo alveolar está submetido a diversas forças e tensões; as células endoteliais são submetidas à pressão transcapilar e as forças laminares do fluxo sanguíneo; e, por sua vez, as células epiteliais das vias aéreas e do alvéolo sofrem estiramento e compressão cíclica do movimento respiratório e da tensão superficial da interface ar-líquido (Mead et al., 1970).

Sabe-se que as regiões dependentes dos pulmões, ou seja, aquelas localizadas nos lobos inferiores, junto à coluna vertebral, apresentam menor variação de volume durante a ventilação mecânica, quando o paciente se encontra em decúbito dorsal horizontal (Marini et al., 2003). Portanto, tais

regiões sofreriam menor impacto da hiperdistensão e das forças de cisalhamento. Alguns estudos têm demonstrado menor estímulo para a fibrogênese nessas regiões, Caruso et al. (2003) submeteram ratos saudáveis à ventilação mecânica com altos e baixos volumes correntes e observaram aumento na síntese de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de procolágeno III, sendo mais pronunciado na região não dependente dos pulmões. De Carvalho et al. (2007) relataram que expressão do procolágeno tipo III estava aumentada nas regiões não dependentes em estratégias ventilatórias que causam hiperdistensão, e esta resposta foi atenuada pela posição prona. Isso sugere que a ação de forças transpleurais de efeito regional seja decorrente da heterogeneidade pulmonar no contexto da VILI. (Dreyfuss e Saumon, 1998).

Sendo assim, achamos interessante o estudo da expressão gênica dos demais componentes da MEC na VILI, individualizando-se a região pulmonar.

OBJETIVOS

2 Objetivos

1. Analisar a modulação da expressão gênica de alguns componentes da matriz extracelular do pulmão exposto a diferentes mecanismos de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.
2. Verificar a existência de possíveis diferenças morfofuncionais entre a região não dependente e a região dependente dos pulmões nas diferentes condições ventilatórias impostas

MÉTODOS

3 Métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo. Os animais receberam todos os cuidados de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado 1985).

3.1 Grupo Experimental

Foram utilizados coelhos da linhagem *Nova Zelândia* (albinos, machos, adultos), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Antes do início de cada experimento os animais eram pesados para o cálculo da anestesia e ajuste dos parâmetros ventilatórios.

Um total de vinte e um animais foram randomizados em três grupos, sendo: seis animais para o grupo controle (CTR), sete animais para o grupo alto volume (AV) e oito animais para o grupo alta pressão (AP). A randomização foi realizada por sorteio, utilizando um saco de tecido escuro onde eram guardados os papéis designando o protocolo a ser utilizado

(controle, alto volume ou alta pressão), com o número total de animais que seriam utilizados durante todo o experimento.

Todos os coelhos receberam medicação pré-anestésica intramuscular composta por Acepromazina (0,1 mg/Kg) e Cloridrato de Cetamina (2,5 mg/Kg), seguida pela manutenção anestésica administrada em bomba de infusão e infundida por acesso venoso auricular, sendo composta por Midazolam (0,1 mg/Kg/h), Cloridrato de Cetamina (1,8 mg/Kg/h), Acepromazina (0,1 mg/Kg/h) e Brometo de Pancurônio (0,2 mg/Kg/h), diluídos em 20 ml de solução fisiológica. Após anestesia os animais foram submetidos à traqueostomia, com colocação de cânula de polietileno de diâmetro interno médio de 3,5mm e conectados ao ventilador mecânico Newport – Modelo e500 Wave Ventilator (Newport Medical Instruments – Costa Mesa, A A) e ao monitor cardíaco não invasivo I Dixtal monitor system (Dixtal Biomedica Ind. e Com. Ltda., Brazil). Um capnógrafo - Capnostat®Mainstream CO2 Sensor (Novamatrix Medical Systems Inc., USA) foi conectado entre o circuito do ventilador e o tubo traqueal dos animais. Um sistema de aquecimento de ar foi utilizado à temperatura de 33 e umidade relativa de 100% (termo higrômetro digital MTH-1380 Minipa Ind. E Com. Ltda – Brasil) durante o período de ventilação mecânica. Os coelhos foram submetidos à sondagem vesical utilizando-se uma sonda Foley (8Fr) para controle da diurese durante o experimento.

3.2 Protocolo da Ventilação Mecânica

Os animais foram ventilados por três horas e meia, sendo os trinta minutos iniciais, despendidos para a acomodação no ventilador mecânico e estabilização dos sinais vitais (frequência cardíaca (FC) de 240 a 300 batimento por minuto, pressão arterial média (PAM) por volta de 70mmHg, oximetria de pulso acima de 95% e capnometria entre 45% e 35%) (Kozma et al., 1974). Durante esses trinta minutos iniciais de ventilação todos os animais foram ventilados no modo volume controlado com volume corrente (VC) de 8ml/kg de peso corporal, fluxo de 2L/min, pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5cmH₂O, frequência respiratória (FR) de 30rpm e fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 0,4 (Kozma et al., 1974, Broccard et al., 1999, Sinclair et al., 2002, Kotani et al., 2004, Lopez-Aguilar et al., 2005, Meinhardt et al., 2005). Após os trinta minutos iniciais de estabilização, os dados iniciais da mecânica pulmonar, os sinais vitais e os gases sanguíneos arteriais eram coletados e, então, o protocolo de ventilação, mediante sorteio, era instaurado por mais três horas.

Os animais do grupo controle continuavam no modo volume controlado com VC de 8ml/Kg de peso corpóreo, fluxo de 2L/min, PEEP de 5cmH₂O, FR de 30rpm e FiO₂: 40%; o grupo alto volume passou a ser ventilado com VC de 16ml/Kg de peso corpóreo, fluxo de 2L/min, PEEP de 5cmH₂O, FR de 30rpm, e FiO₂: 40% ou a necessária para manter saturação arterial da oxihemoglobina (SaO₂) acima de 90%. O grupo alta pressão teve

seu modo ventilatório alterado para pressão controlada e foram ventilados com pressão inspiratória controlada de 30cmH₂O, PEEP de 12cmH₂O na intenção de manter o mesmo volume corrente do grupo baixo volume, FR de 30rpm e FiO₂: 40% ou a necessária para manter SaO₂ acima de 90% (Suh et al., 2002, Sinclair et al., 2002, Kotani et al., 2004, Simonson et al., 2004, Maeda et al., 2004, Suzuki et al., 2004, Lopez-Aguilar et al., 2005, Meinhardt et al., 2005).

A Tabela 1 demonstra os parâmetros utilizados durante o protocolo de ventilação mecânica dos três grupos.

Tabela1 – Protocolo de Ventilação mecânica

	VC	P_lmáx	PEEP	Fluxo	FR
Controle	8ml/Kg	livre	5	2	30
Alto volume	16ml/Kg	livre	5	3	30
Alta Pressão	8ml/Kg	30	12	livre	30

Após as três horas dos protocolos os dados da mecânica pulmonar, os sinais vitais e os gases sanguíneos arteriais eram novamente coletados. Após o término do experimento os animais eram exsanguinados pela secção da aorta, seus pulmões mantidos inflados com pressão positiva contínua na via aérea de 20cmH₂O até que a parede torácica fosse aberta e seus pulmões e coração retirados em bloco. O pulmão direito era clampeado inflado e mergulhado em solução de fixação para posterior análise histológica. Do pulmão esquerdo, coletava-se tecido do lobo superior (região

não dependente) e lobo inferior (região dependente) para a realização da análise da expressão gênica, sendo prontamente congelados no nitrogênio líquido, macerados, submersos no Trizol e armazenados em freezer a -80 °C.

As medidas da mecânica pulmonar foram coletadas através de um sensor (CO₂/Flow Sensor neonatal – Novamatrix Medical Systems Inc. – USA) conectado ao NICO₂ - Dixtal. Foram realizadas duas medidas dos dados ventilatórios, uma antes do início do protocolo de ventilação e outra no final do experimento. Os sinais analógicos coletados eram gravados em um microcomputador (Pentium III – 600) e a análise dos dados feita em linguagem LabView 6.0 (National Instruments), especificamente desenvolvido para monitorização respiratória. Os sinais vitais foram monitorados pelo DX 2020 Portal Monitor (Dixtal Biomedica Ind. E Com. Ltda., Brazil). O sangue foi analisado assim que coletado (no início e no final do protocolo de ventilação) com o equipamento ABL 800Flex Blood Gas Analyzer (Radiometer Copenhagen).

3.3 Expressão Gênica

As amostras de pulmão recolhidas após os experimentos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido foram processadas a fim de se verificar a expressão gênica dos proteoglicanos, da alfa-actina e da Interleucina-8 (IL8) e, conseqüentemente, a participação de cada um deles na resposta mecânica e inflamatória dos modelos ventilatórios estudados.

Para tal análise foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

PCR é um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente sequências específicas de DNA utilizando pequenos oligonucleotídeos de 18 a 25 bases que se ligam a determinadas regiões de interesse do genoma. O procedimento consiste de uma série de ciclos repetidos de amplificação. Os produtos sintetizados servem como moléculas-molde para o próximo, duplicando o número de moléculas a cada ciclo, criando uma reação em cadeia. Após 20 ciclos, a amplificação é de aproximadamente 106 a 108 vezes. Essa amplificação pode ser obtida também utilizando o RNA como material iniciador. Esse procedimento, denominado RT-PCR, é realizado por meio da reação de transcrição reversa, seguida de PCR convencional no cDNA. Essa técnica utilizada permite uma análise qualitativa das amostras de tecido estudadas. Sua unidade de medida é Primer/GAPDH.

3.3.1 Extração de RNA

O RNA total de 100 mg dos homogenatos foi extraído com 1,0ml de Trizol (Invitrogen) em tubo de 1,5ml, seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μ l de clorofórmio, os tubos foram agitados em *vortex* e incubados por mais 3 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R) a 4 C durante 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL, onde foram

adicionados 500 l de isopropanol gelado. Após uma incubação por 10 minutos a amostra voltou a ser centrifugada a 4 C por mais 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet*, foi adicionado 1,0mL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 4 C durante 5 minutos a 7500g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi reconstituído em 50 L de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma) e armazenado em freezer – 80 C.

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A partir de 1 g de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1 l de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1 l de Oligo dT (0,5 g/ l - Promega); 1 l de dNTP (10mM – Invitrogen), 6 l de buffer 5 X ; 0,5 l de RNAsin (Promega), 2,4 l de Cloreto de magnésio (25 mM).

A reação foi incubada em termociclador MJ Research PTC-200 por 50 minutos a 42°C e 70 °C por 15 minutos. Após a síntese de cDNA foi feita uma reação de PCR para amplificação de rRNA como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra. A reação de PCR foi realizada com 25 l de volume total com 17,75 l de água deionizada; 2,5 l de tampão (10X); 1 l de cloreto de magnésio a 50mM; 0,5 l mM de dNTPs (10mM); 1 l de cada primer a 10mmol/ l; 0,25 l de Taq polimerase (Invitrogen) e 1 l de cDNA em termociclador PTC200 MJ Research.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, menos o cDNA) para eliminar uma possível contaminação da reação.

Para a avaliação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Horizon® – Life Technologies).

Foi realizada a padronização da temperatura de cada um desses primers separadamente, ou seja, mensuração da temperatura ideal para a utilização de cada primer, bem como a análise do número de ciclos a serem realizados por cada primer para obtenção da melhor amplificação do gene avaliado. Todas as amostras foram normalizadas com a amplificação do gene GAPDH (*Primer/GAPDH*) para que pudessem ser comparadas.

Os *primers* (Invitrogen) de coelhos empregados para o estudo da expressão gênica estão demonstrados na Tabela 2:

Tabela 2 – Relação dos *Primers* utilizados para realização da PCR

Gene	Sequência (' para ')	pb
GAPDH	Senso: CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG	234
	Reverso: GTG AGT TTC CCG TTC AGC TC	
Decorin	Senso: TGA AGA ACC TTC ACG CAT TG	240
	Reverso: TGG TGC CCA GTT CTA TGA CA	
Versican	Senso: GAC GCA GAG TGT AAG CAC CA	179
	Reverso: TAC AGG GTT CTC ACC CCA AG	
Lumican	Senso: TGC AGC TTA CCC ACA ACA AG	176
	Reverso: AGG CAG TTT GCT CAT CTG GT	
Biglycan	Senso: ACC AGA TCC GGA TGA TTG AG	161
	Reverso: ACC CAC CTT GGT GAT GTT GT	
Alpha-actin	Senso: GAG CGT GGC TAC TCT TTC GT	231
	Reverso: CGA CTC CAT ACC GAT GAA GG	
IL-8	Senso: GAG TGG ACC TCA CTG TGC AA	247
	Reverso: CAG CCC TAC GAC AGA TCC AT	

(pb=pares de base)

3.4 Morfometria

Após a toracotomia o pulmão direito foi retirado inflado, fixado em formol 10%, embebido em parafina e processado rotineiramente para análise histológica, cortado em fatias de 5µm de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Para a análise morfométrica, foi utilizado um microscópio óptico (Lambda LMR-2). e um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à sua ocular. Foram analisados dez campos aleatórios de parênquima pulmonar por lâmina, com aumento de 400x. Foi contado o número de interceptos dos pontos do retículo sobre os septos pulmonares e o número de células polimorfonucleares em cada campo. O índice evidenciando infiltrado inflamatório foi expresso em número de células polimorfonucleares (neutrófilos) por número de interceptos alveolares. O observador que realizou a análise histologia deste estudo não estava ciente a que grupo do protocolo de ventilação pertencia o tecido analisado.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras do tecido pulmonar dos três grupos foram obtidas e fixadas em glutaraldeído 2% dissolvidas em tampão fosfato 0,15 M, pH 7,2, durante 1h, seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, dissolvida em cloreto de sódio 0,9% por 1h. O material fixado foi corado em bloco em acetato de uranila aquosa 0,5% durante a noite. As amostras foram então desidratadas

em gradiente de acetona e incluídas em resina Araldite. Cortes ultrafinos (70 nm) foram realizados com a faca de diamante de um ultramicrotomo LKB, colocados em grades de cobre de 200 mesh e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes ultra-finos foram examinados e fotomicrografados em microscópio eletrônico de transmissão FEI – modelo TECNAI 10 acoplado ao software Analysis Image Processing.

3.6 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram testadas quanto a sua normalidade de distribuição através do teste Kolmogorov-Smirnov. Uma vez constatada a distribuição normal, nossos dados foram calculados com testes de comparações múltiplas entre as médias utilizando-se a análise de variância one-way Anova seguida pelo teste de Tukey. A diferença entre a região não dependente e dependente dentro de cada grupo foi realizada pelo Teste *t*. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (SD).

Foi considerado um nível de significância de 5% para todos os testes.

O programa utilizado para os cálculos foi o “Statistical Package for the Sciences” (SPSS) versão 15.0 (Chicago, EEUU).

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Sinais Vitais durante o Experimento

A Tabela a seguir descreve os sinais vitais e o balanço hídrico durante as 3h30m de realização dos protocolos.

Tabela 3 – Análise descritiva dos sinais vitais e balanço hídrico

	CTR	AV	AP	p
Peso (g)	3.373 ± 197	3.368 ± 146	3,426 ± 354	<i>ns</i>
PAM ^a (mmHg)	71.5 ± 21.5	64.6 ± 11.1	60.6 ± 11.2	<i>ns</i>
PAM ^b	54.0 ± 26.4	59.4 ± 9.1	47.9 ± 8.0	<i>ns</i>
FC ^a (bpm)	242.3 ± 7.8	234.9 ± 21.1	231.5 ± 18.9	<i>ns</i>
FC ^b	258.3 ± 37.1*	198.7 ± 38.8*	219.6 ± 29.4	.019*
Diurese ^b (ml)	133.3 ± 87.6	250.0 ± 141.4	196.4 ± 315.3	<i>ns</i>
Fluidos ^b (ml)	302.0 ± 26.8	421.7 ± 134.5	506.7 ± 229.4	<i>ns</i>

^a valores iniciais; ^b valores finais; PAM=pressão arterial média, FC= frequência cardíaca. (valores em média ± desvio padrão).

4.2 Mecânica Respiratória

A Tabela 4 evidencia as variáveis ventilatórias e os valores descritivos da mecânica pulmonar dos três grupos submetidos aos protocolos de VM.

Os valores estão em média \pm desvio padrão.

Tabela 4 – Variáveis ventilatórias e valores descritivos da mecânica pulmonar

	CTR	AV	AP	p
VC ^a (ml)	28.2 \pm 5	35.1 \pm 6	30.2 \pm 7	<i>ns</i>
VC ^b	27.8 \pm 5	54.8 \pm 8	27.7 \pm 6	.000
P _{pico} ^a (cmH ₂ O)	16.3 \pm 2	19.1 \pm 1	16.4 \pm 2	<i>ns</i>
P _{pico} ^b	17.4 \pm 1	27 \pm 3	30 \pm 1	.000
P _{média} ^a (cmH ₂ O)	8.6 \pm .6	9.7 \pm 2	8.8 \pm 1	<i>ns</i>
P _{média} ^b	8.7 \pm .5	11.6 \pm 1	19.6 \pm 3	.000
P _{platô} ^a (cmH ₂ O)	16.1 \pm 2	18.5 \pm 1	16.1 \pm 2	<i>ns</i>
P _{platô} ^b	16.9 \pm 1	26.3 \pm 3	29.4 \pm 1	.000
Fluxo ^a (L/min)	2.7 \pm .6	3.4 \pm .4	5.1 \pm 3	<i>ns</i>
Fluxo ^b	2.6 \pm .4	4.8 \pm .8	8.6 \pm 1	.000
PEEP ^a (cmH ₂ O)	5.3 \pm .05	5.4 \pm .1	5.3 \pm .04	<i>ns</i>
PEEP ^b	5.3 \pm .03	5.3 \pm .06	11.9 \pm 2.66	.000
EtCO ₂ ^a (mmHg)	26.0 \pm 4.1	26.8 \pm 2.9	27.6 \pm 9.8	<i>ns</i>
EtCO ₂ ^b	24.0 \pm 5.5	14.5 \pm 3.1	27.6 \pm 16.2	<i>ns</i>
FiO ₂ ^a	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	<i>ns</i>
FiO ₂ ^b	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	<i>ns</i>
Rt ^a (cmH ₂ O/L/sec)	45.2 \pm 9.4	45.2 \pm 7.1	52.8 \pm 15.6	<i>ns</i>
Rt ^b	59.8 \pm 12.9	52.4 \pm 7.8	64.5 \pm 25.4	<i>ns</i>
C _{din} ^a (ml/cmH ₂ O)	2.9 \pm .3	3.0 \pm .6	3.3 \pm .9	<i>ns</i>
C _{din} ^b	2.9 \pm .6*	3.1 \pm .6**	1.6 \pm .3*/**	.001*/.000**

^a valores iniciais; ^b valores finais; P_{pico}: pressão de pico, P_{média}: pressão média de via aérea, Rt: Resistência e C_{din}: complacência dinâmica. † entre os grupos. (valores em média).

4.3 Exames laboratoriais

A Tabela 5 demonstra os valores dos exames laboratoriais coletados no início e no final dos experimentos. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 5 – Exames laboratoriais

	CTR	AV	AP	p
pH ^a	7.41 \pm 0.1	7.46 \pm 0.1	7.4 \pm 0.1	<i>ns</i>
pH ^b	7.37 \pm 0.1	7.43 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	<i>ns</i>
PaO ₂ ^a (mmHg)	246 \pm 10	256 \pm 14	270 \pm 41	<i>ns</i>
PaO ₂ ^b	249 \pm 15	264 \pm 3	298 \pm 71	<i>ns</i>
PaCO ₂ ^a (mmHg)	31.5 \pm 8.41	31.0 \pm 11.28	33.3 \pm 13.04	<i>ns</i>
PaCO ₂ ^b	28.6 \pm 12.35*	16.3 \pm 2.51*/**	29.9 \pm 9.27**	.054*/.026**
HCO ₃ ^a (mmol/L)	19.6 \pm 3.71	21.3 \pm 3.11	20.8 \pm 3.36	<i>ns</i>
HCO ₃ ^b	15.6 \pm 3.24	11.0 \pm 2.68	14.5 \pm 4.76	<i>ns</i>
Lactato ^a (mmol/L)	2.4 \pm 1.31	3.7 \pm 1.25	3.0 \pm 1.51	<i>ns</i>
Lactato ^b	4.7 \pm 2.00*	8.4 \pm 3.06*	6.5 \pm 2.19	.04*
SaO ₂ ^a (%)	97.7 \pm 3.0	98.4 \pm 1.6	97.4 \pm 1.9	<i>ns</i>
SaO ₂ ^b	97.8 \pm 1.0	97.0 \pm 2.3	96.6 \pm 6.5	<i>ns</i>

^a Valores iniciais, ^b valores finais; (valores em média \pm desvio padrão).

4.4 Morfometria

Representação do parênquima pulmonar dos grupos controle, alto volume e alta pressão, respectivamente apresentada na Figura 1.

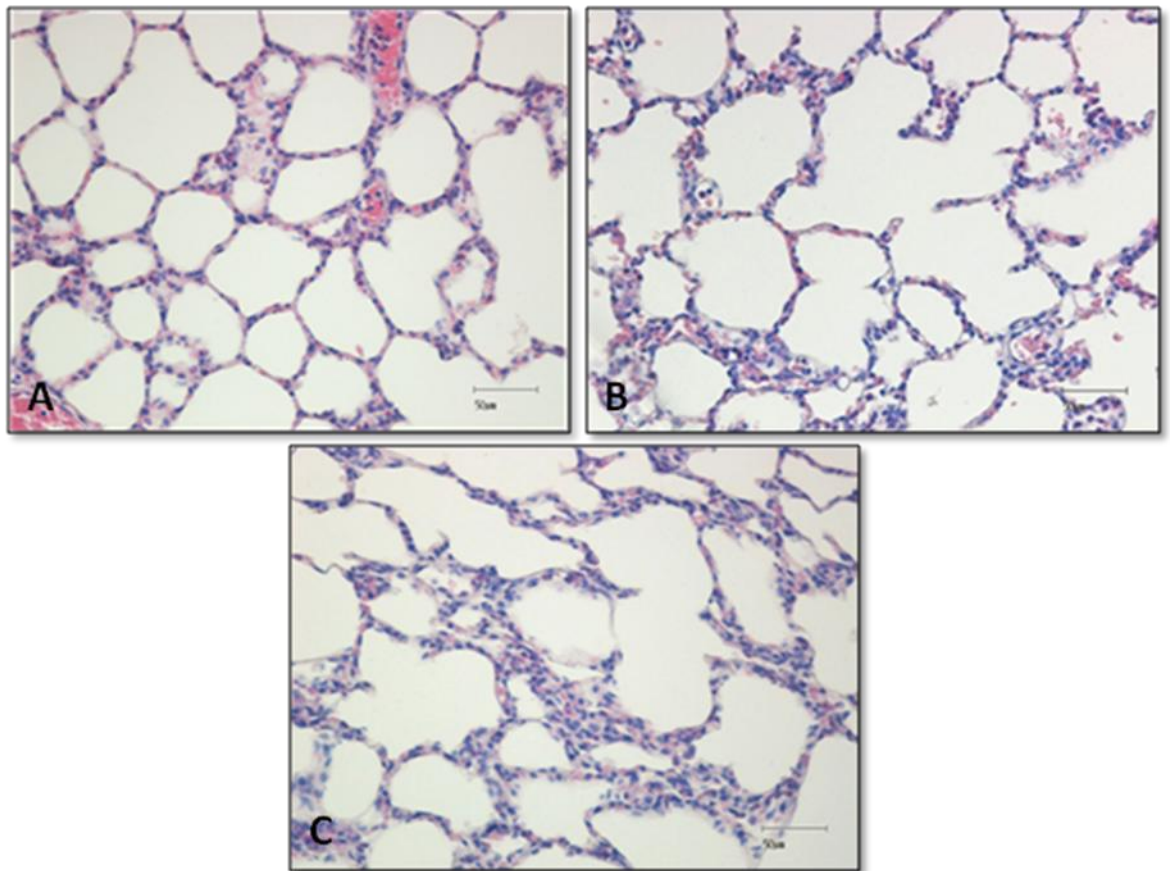


Figura 1 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar

Grupos controle (A), alto volume (B) e alta pressão (C). Coloração Hematoxilina-Eosina (aumento - 400x). Os três grupos mostram aumento na densidade de células polimorfonucleares no septo pulmonar, sendo mais evidente nos grupos AV e AP. Esse aumento de células polimorfonucleares não apresentou significância estatística.

4.4.1 Infiltrado Inflamatório

A Tabela 6 representa a média de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar (μm^2) \pm desvio padrão (SD) entre os grupos ventilados.

Tabela 6 – Média de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar

Grupo		Média (\pm SD)	<i>p</i>
CTR	Não dependente	0,1498 (\pm 0,09)	<i>ns</i>
	Dependente	0,1070 (\pm 0,05)	
AV	Não dependente	0,0855 (\pm 0,04)	<i>ns</i>
	Dependente	0,1026 (\pm 0,06)	
AP	Não dependente	0,1231 (\pm 0,11)	<i>ns</i>
	Dependente	0,8956 (\pm 0,16)	

Grupos: Controle (CTR), Alto Volume (AV) e Alta Pressão (AP). *p=ns* (não significante).

O estudo da densidade não demonstrou aumento significativo de células polimorfonucleares por área de parênquima pulmonar, ou seja, do infiltrado inflamatório entre os três grupos ventilados, tampouco, dentro de um mesmo grupo conforme demonstra o gráfico a seguir.

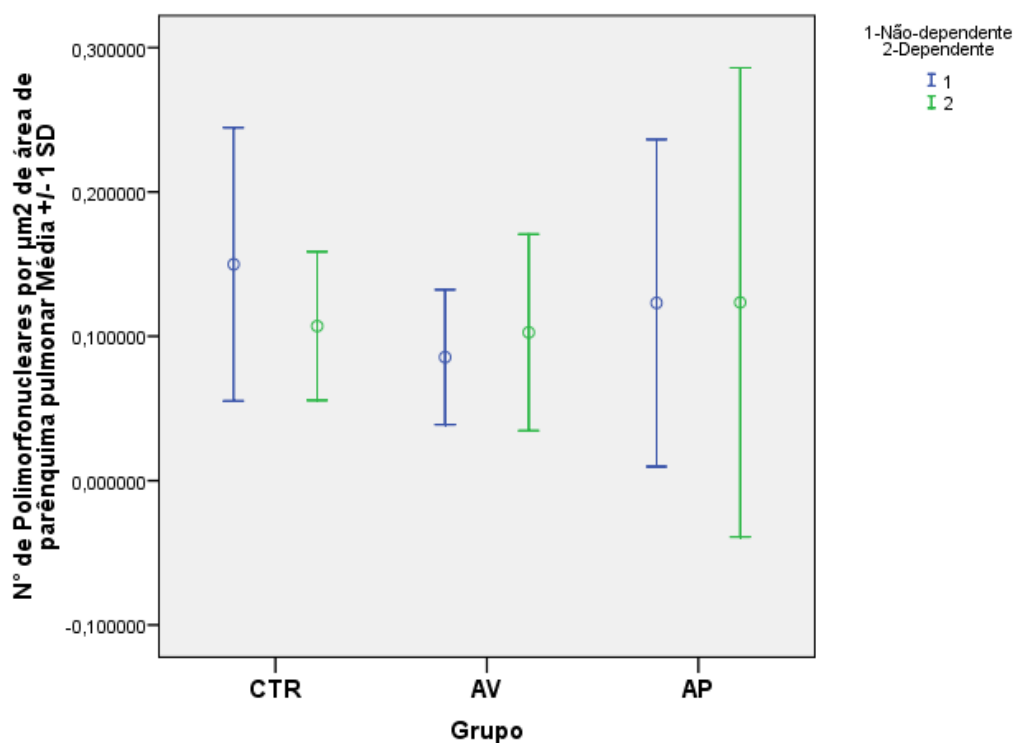


Figura 2 – Infiltrado inflamatório da região não dependente e dependente

Grupos: CTR- controle, AV- alto volume e AP - alta pressão. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados, assim como, na comparação das regiões pulmonares dentro de um só grupo.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As micrografias eletrônica de transmissão dos três grupos estudados foram obtidas para avaliação qualitativa. Comparamos a área de edema e a deposição de colágeno entre os três grupos e observamos um aumento gradual destes dois itens nos grupos alto volume e alta pressão, respectivamente.

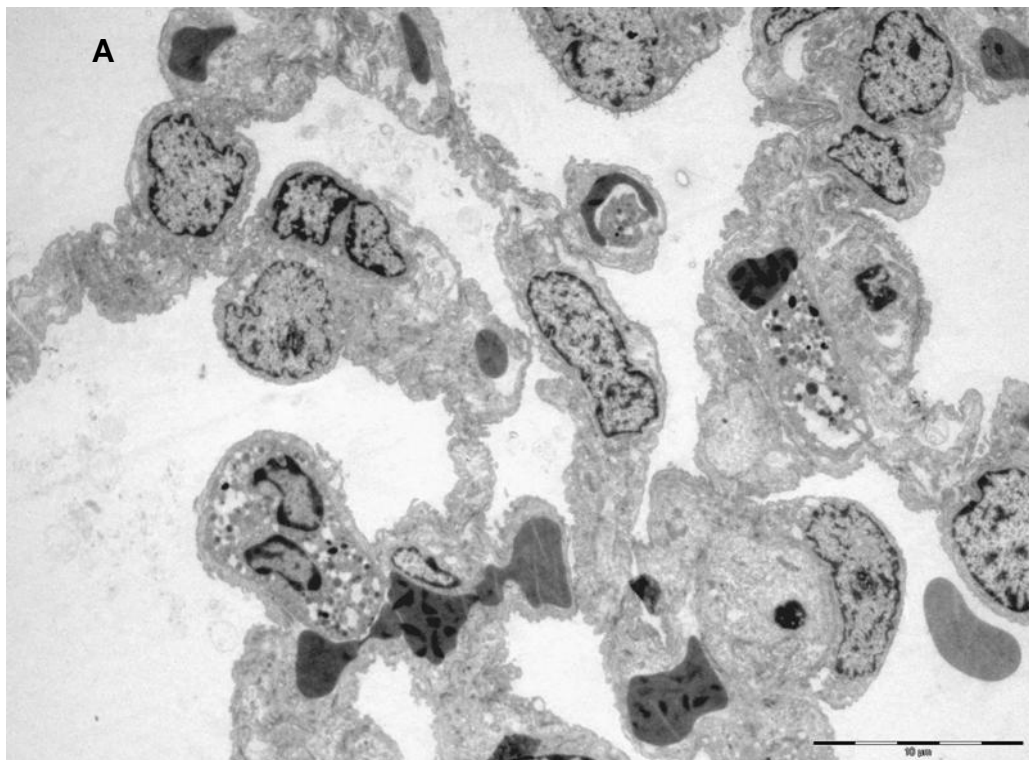


Figura 3 – Microscopia Eletrônica do grupo Controle

Evidenciando infiltrado inflamatório leve, sem edema evidente ou ruptura da arquitetura alveolar. (amplificação 1850x).

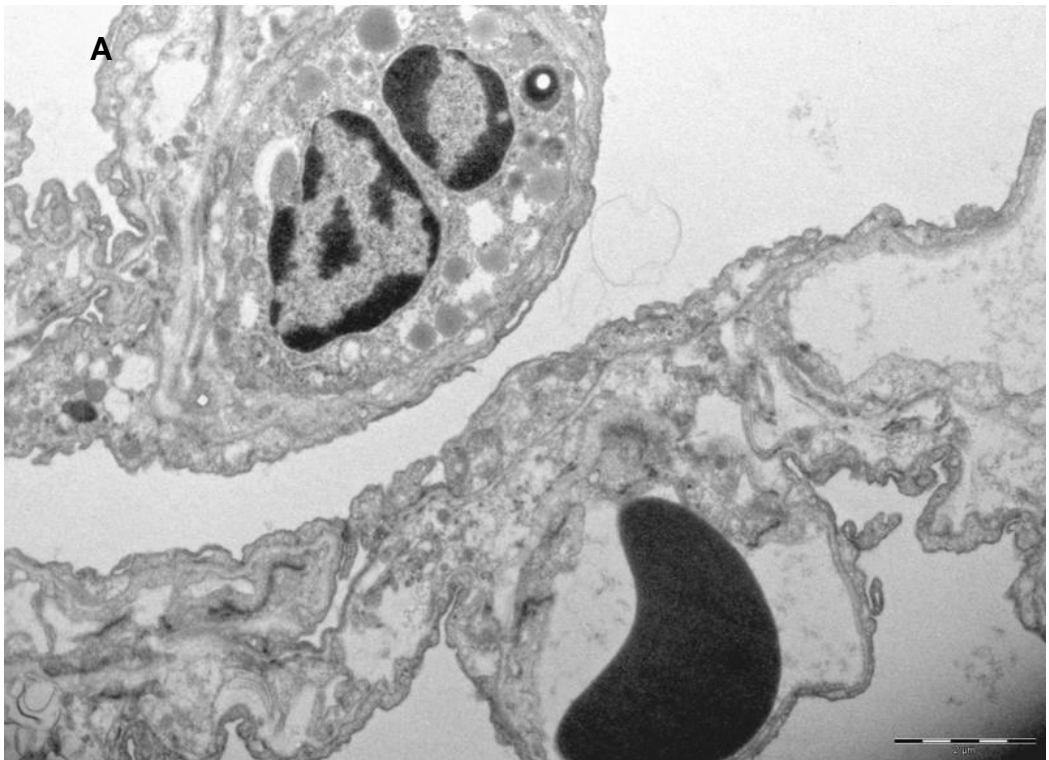


Figura 4 – Microscopia Eletrônica do grupo Controle (amplificação: 6200x)

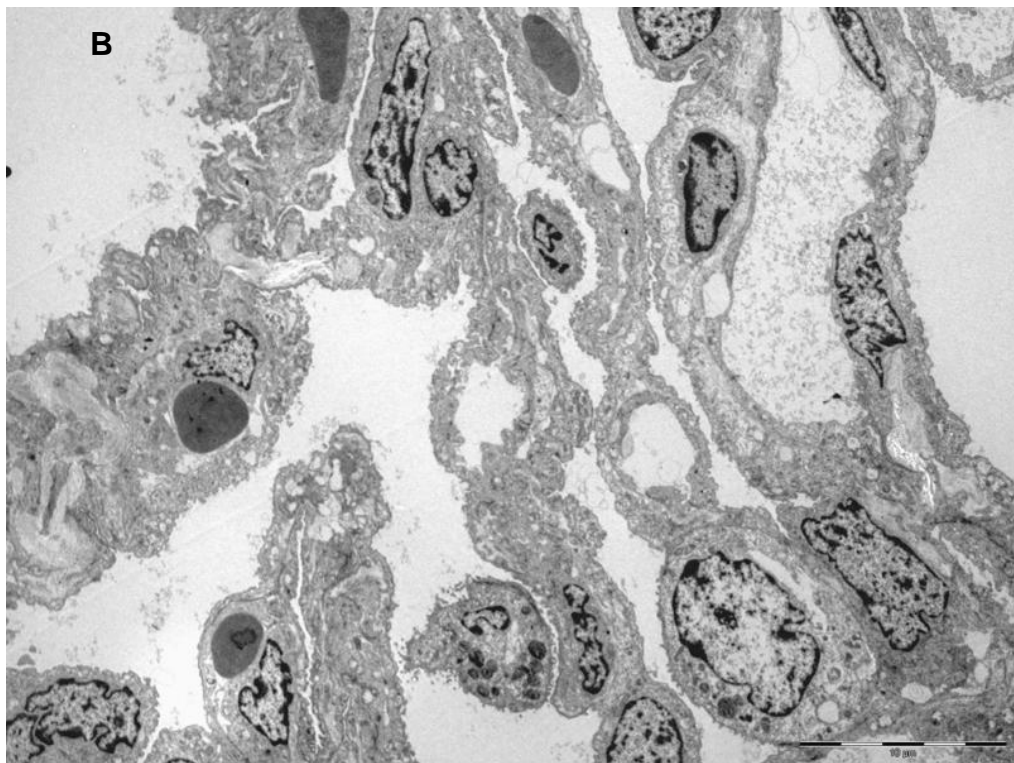


Figura 5 – Microscopia Eletrônica do grupo Alto Volume
Evidenciando infiltrado inflamatório e edema septal leve (amplificação:1850x).

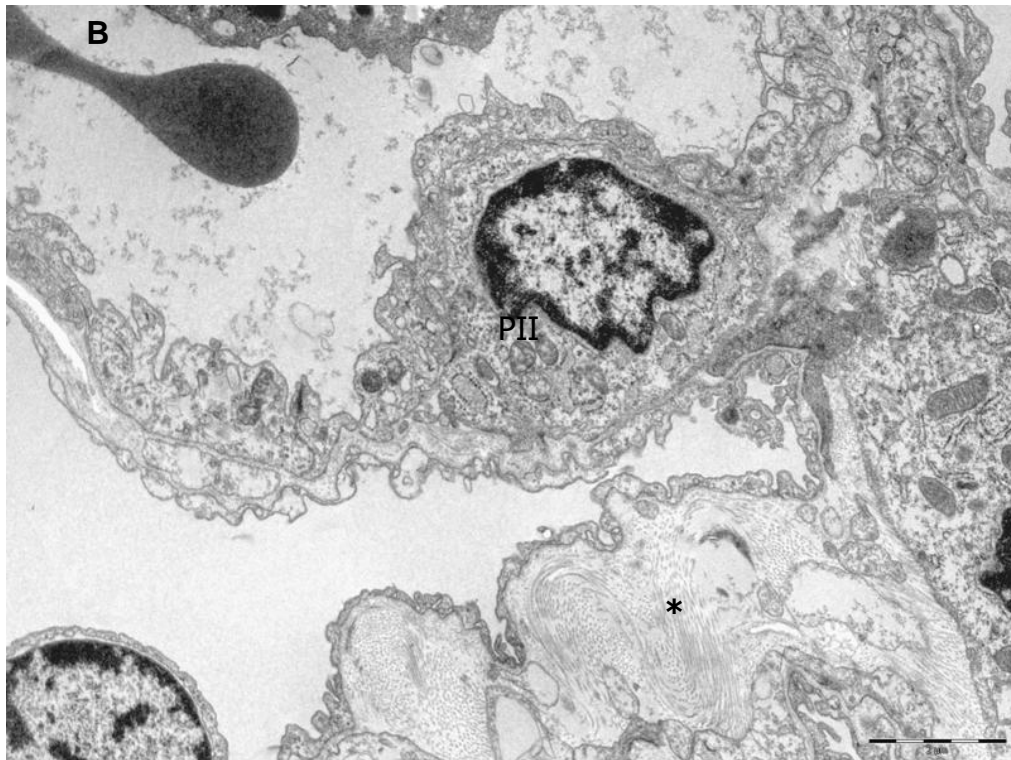


Figura 6 – Microscopia Eletrônica do grupo Alto Volume Evidenciando áreas de deposição de colágeno (*) (amplificação:6200x).

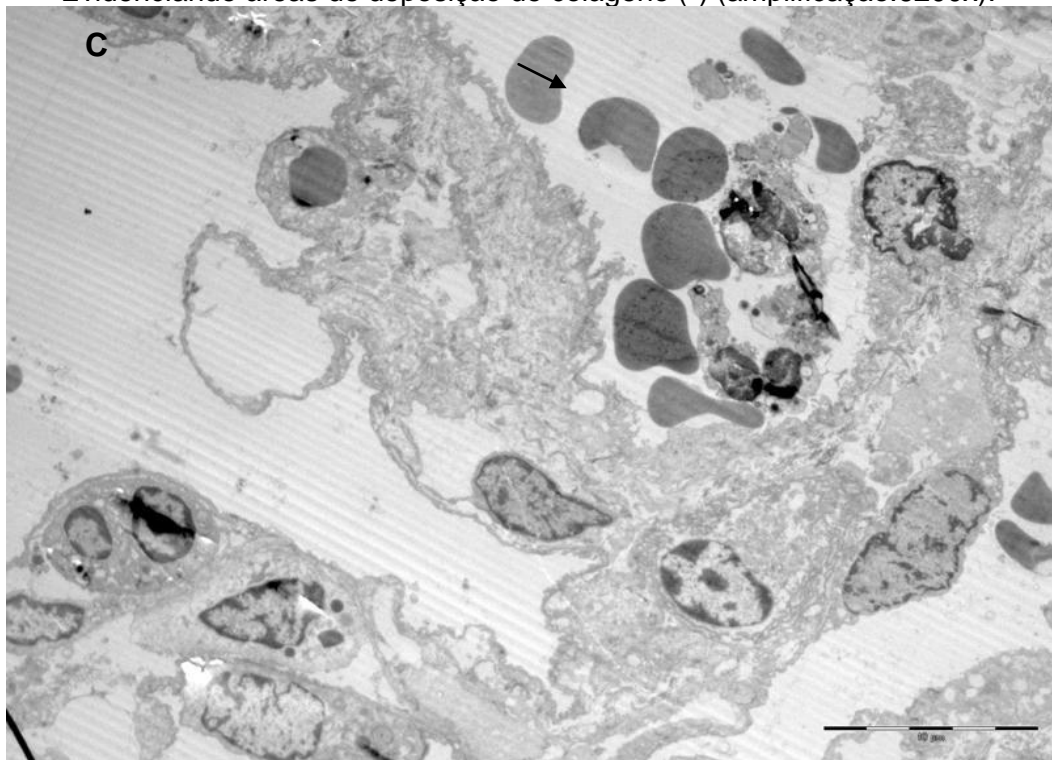


Figura 7 – Microscopia Eletrônica do grupo Alta Pressão Evidenciando aumento das áreas de hemorragia alveolar (seta) (amplificação:1850x).

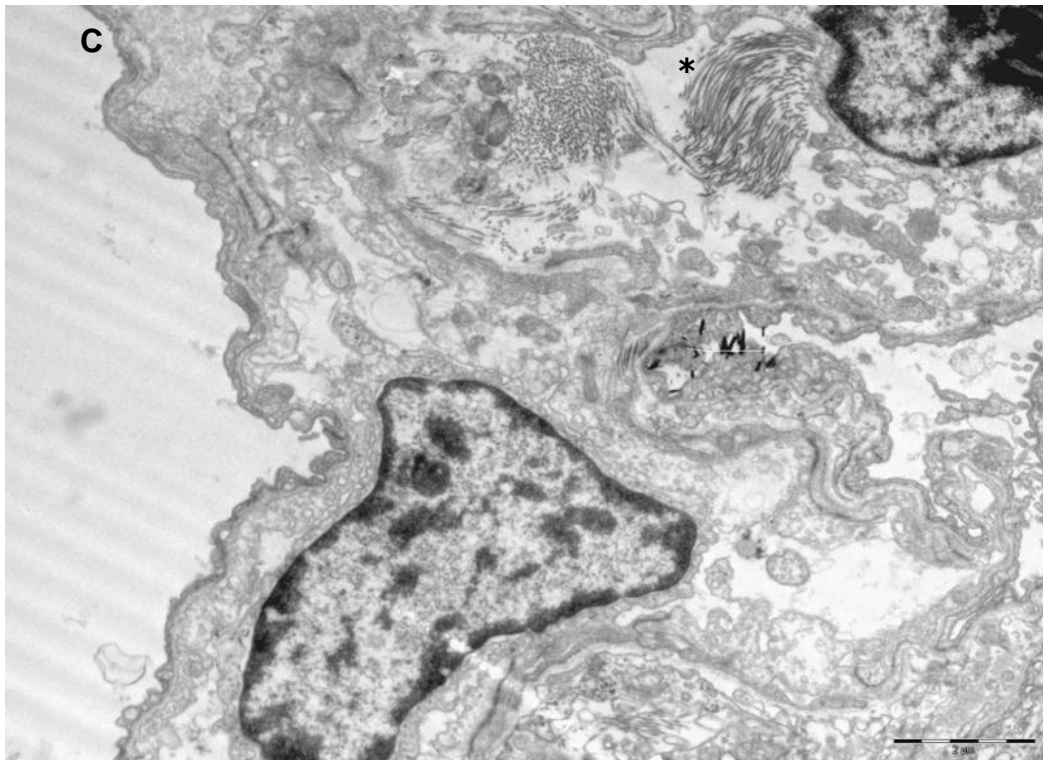


Figura 8 – Microscopia Eletrônica do grupo Alta Pressão

Nesta imagem a deposição de colágeno (*) se torna mais evidente (amplificação:6200x).

4.6 Expressão Gênica

Foram analisadas as expressões dos mRNAs dos proteoglicanos (Decorina, Versican, Biglican e Lumican), da alfa-actina e da Interleucina-8.

4.6.1 Obtenção da 1ª fita de DNA complementar (cDNA)

A Figura abaixo mostra os resultados da eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da PCR para o GAPDH, confirmando a integridade dos cDNAs obtidos pela reação de transcrição reversa.

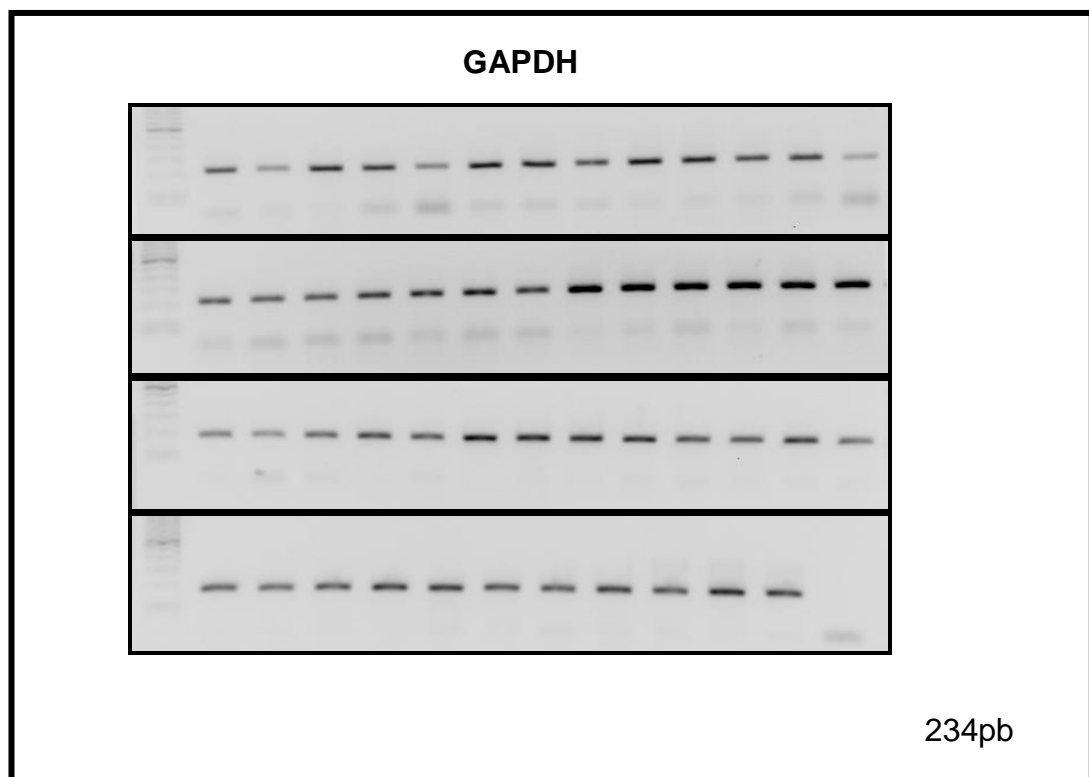


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR para o *primer* GAPDH

Marcador de peso molecular (100pb).

4.6.2 Eletroforese em gel agarose dos *primers* utilizados

As Figuras 10 a 15 mostram as imagens da eletroforese em gel agarose 1% dos primers utilizados para o estudo.

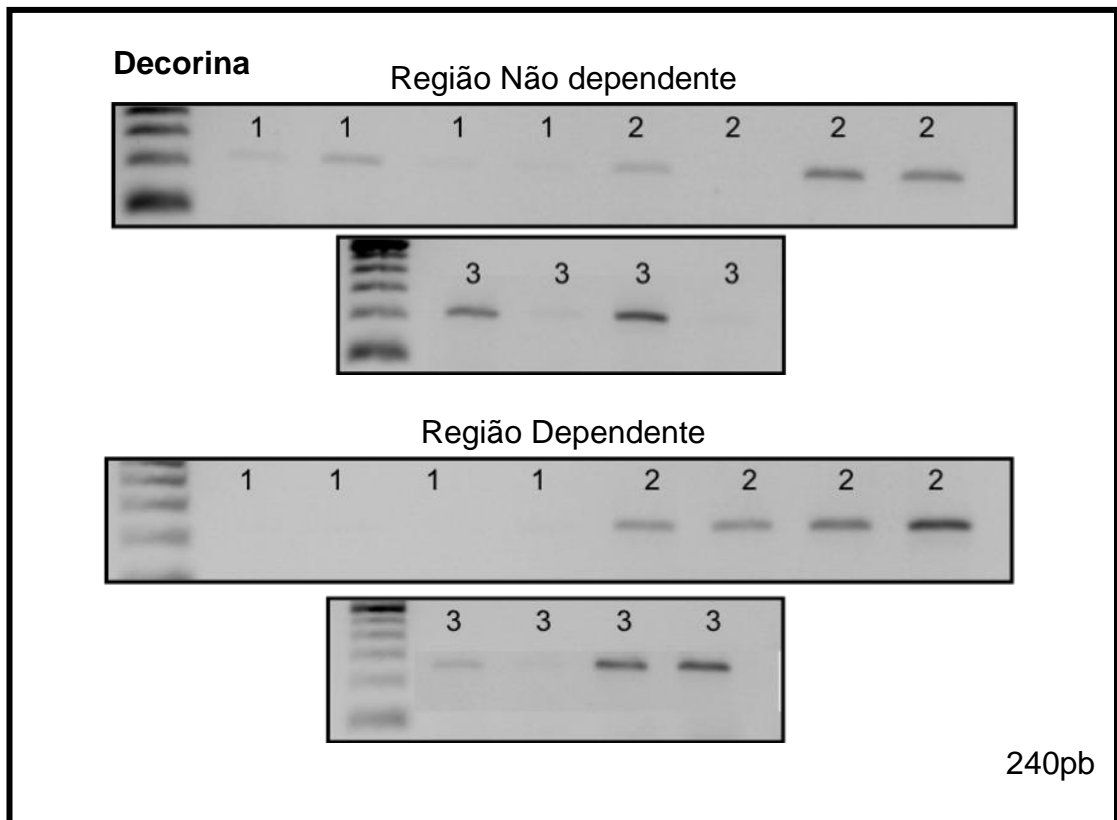


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* Decorina. Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV.

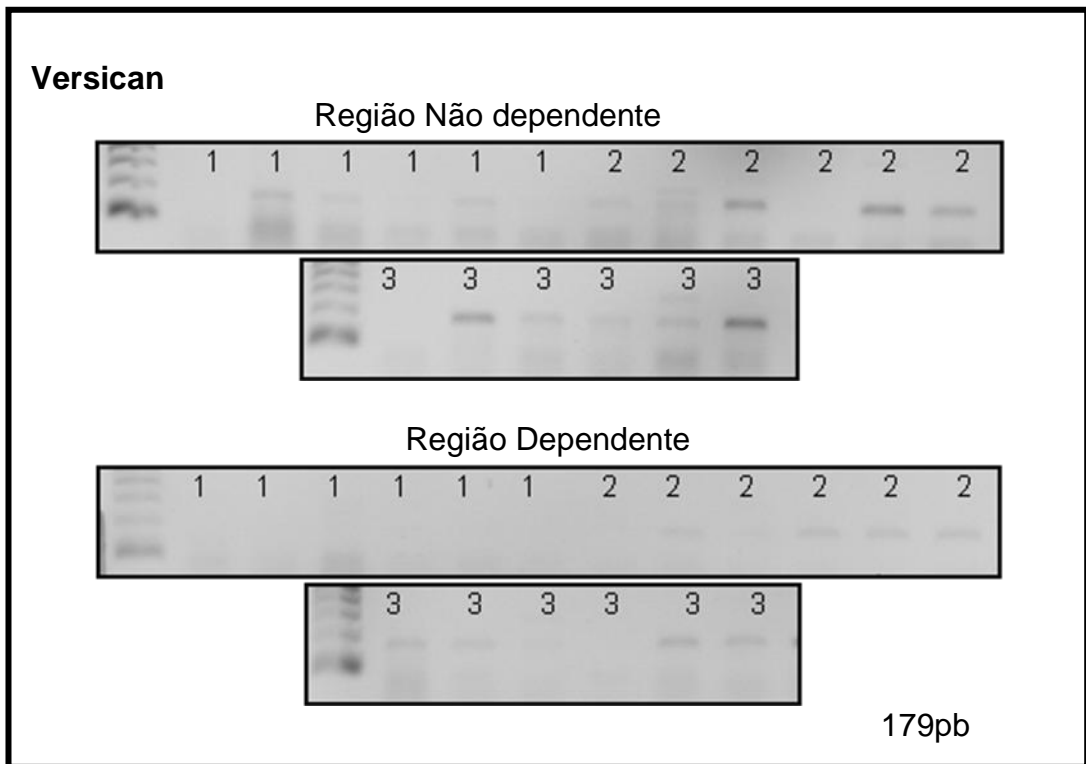


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* Versican. Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV.

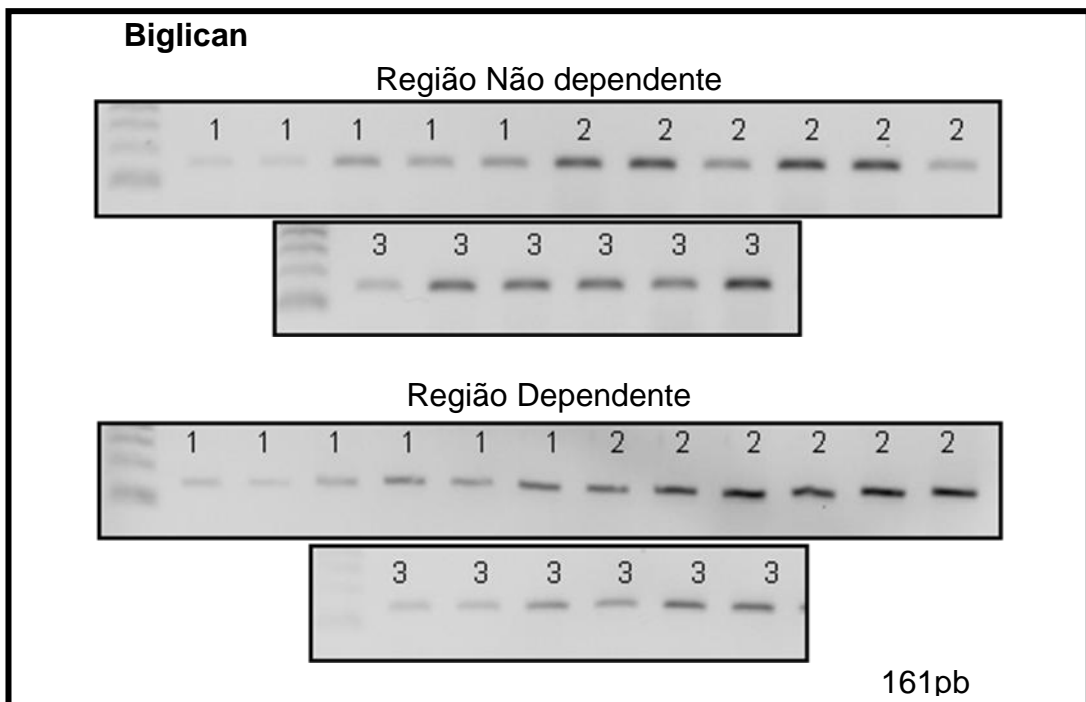


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* Biglican. Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV.

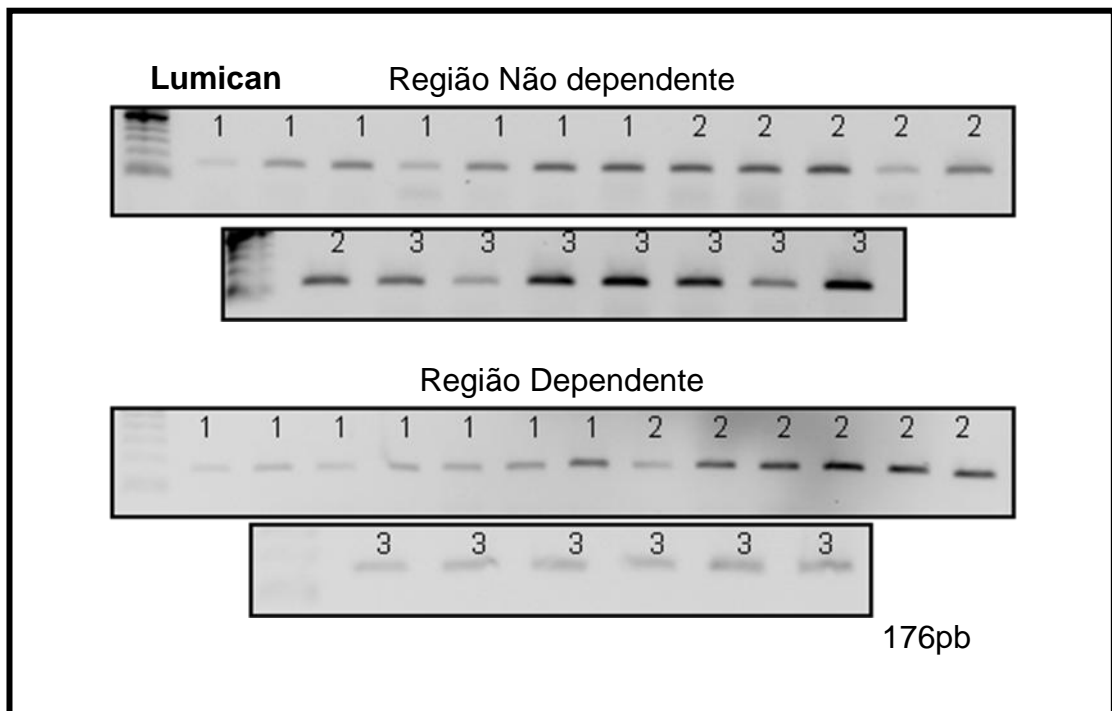


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* Lumican
 Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV.

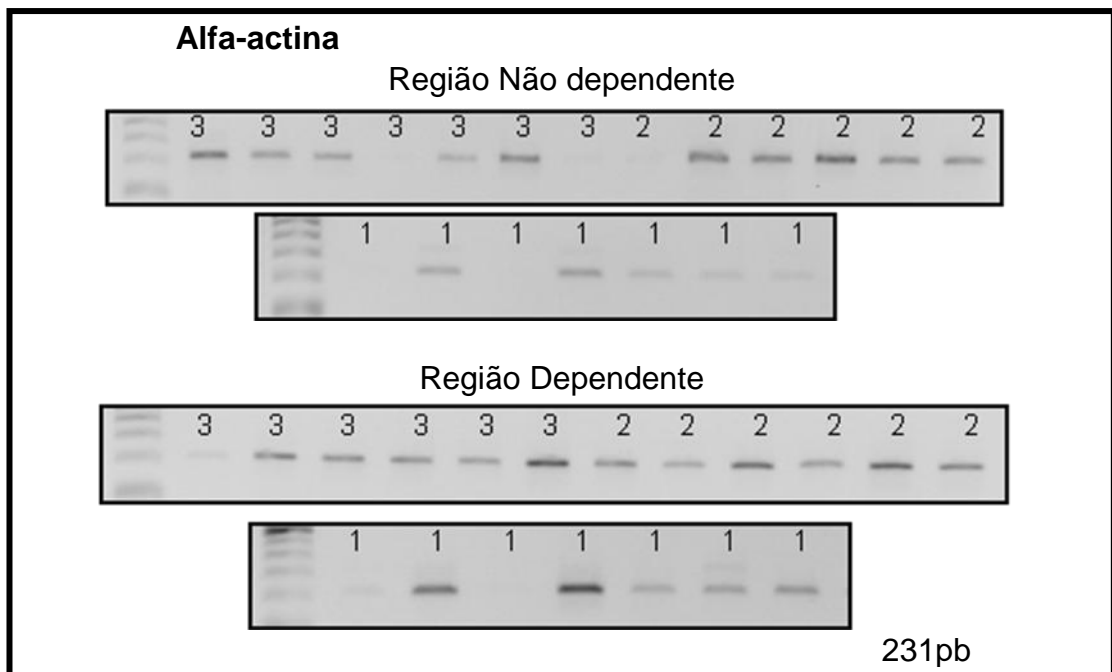


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* Alfa-actina
 Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV

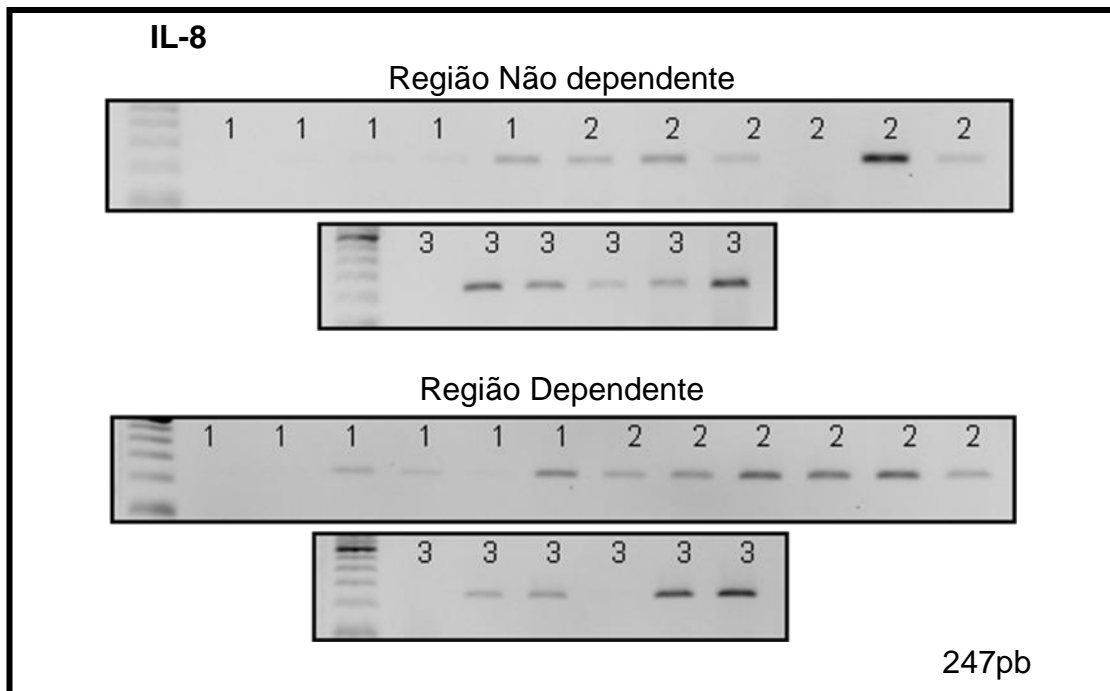


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR com o *primer* IL-8. Marcador de peso molecular (100pb). (1) grupo CTR, (2) grupo AP e (3) grupo AV.

4.6.2 Análise da PCR

Nos gráficos a seguir podemos analisar a expressão gênica dos componentes nas regiões pulmonares não dependentes (barra azul) e dependentes (barra verde) dentro de um mesmo grupo e entre os grupos estudados (Figura 16).

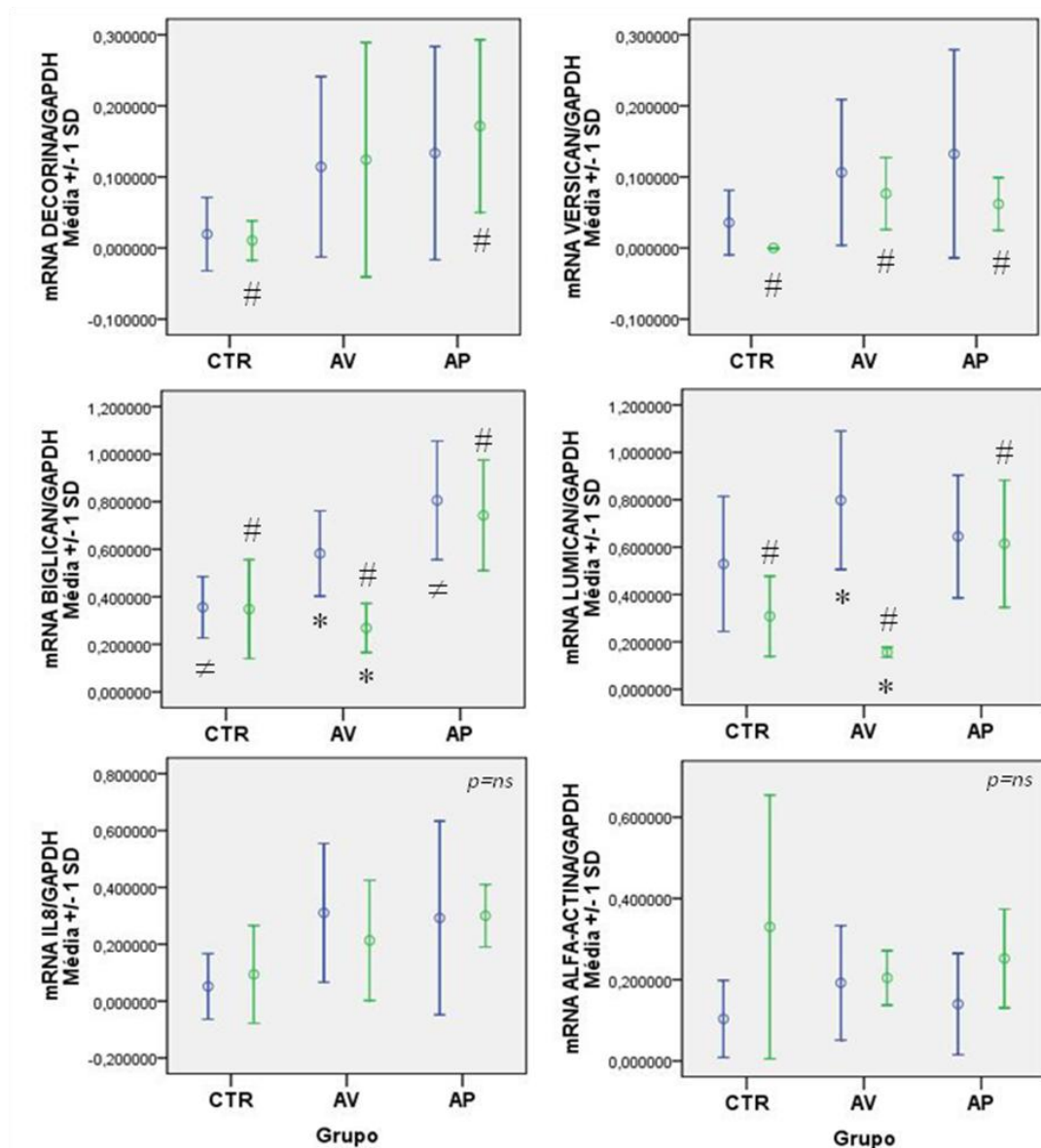


Figura 16 – Gráficos da Expressão gênica dos componentes da matriz extracelular

Grupos controle (CTR), alto volume (AV) e alta pressão (AP). Barra azul = região não dependente e barra verde = região dependente. () – demonstra as diferenças entre a região dependente e não-dependente dentro de um mesmo grupo; observamos diferença estatisticamente significativa na expressão do mRNA do biglycan e do lumican na região não dependente do grupo AV. (/) – demonstra as diferenças entre os grupos; ao analisarmos a região dependente () entre os grupos, observamos aumento significativo na expressão do mRNA da decorina no grupo AP ao compará-lo ao grupo CTR ($p=0.05$); aumento na expressão do versican nos grupos AV ($p=0.003$) e AP ($p=0.015$) em relação ao grupo CTR; maior expressão do mRNA do biglycan no grupo AP quando comparado aos grupos CTR ($p=0.007$) e AV ($p=0.002$); e aumento significativo na expressão do mRNA do lumican no grupo AP quando comparado aos grupos CTR ($p=0.021$) e AV ($p=0.001$). Na região não dependente (), houve aumento significativo na expressão do biglycan no grupo AP quando comparado ao grupo CTR ($p=0.005$).

DISCUSSÃO

6 Discussão

O presente estudo tentou detalhar o comportamento genético agudo de alguns componentes importantes envolvidos no processo de remodelamento do pulmão após curto prazo de ventilação mecânica. Dois mecanismos atualmente conhecidos como causadores de VILI, alto volume e alta pressão, foram aplicados ao tecido pulmonar por um curto período. Foi possível mostrar uma resposta inflamatória similar em todos os grupos ventilados. Sendo, o processo de remodelamento pulmonar dependente da inflamação e da mecanotransdução, assumimos que as diferenças na expressão de mRNA dos PGs notadas aqui, foram principalmente secundárias à ação de forças mecânicas em diferentes regiões do parênquima pulmonar. Estudamos as diferenças entre os grupos e, dentro do mesmo grupo, as diferenças entre as regiões do pulmão.

Corroborando nossos achados de não ter havido alteração na expressão do citoesqueleto (alfa-actina) com os regimes ventilatórios impostos, Tanigushi (2009), em estudo com ratos ventilados por quatro horas com baixo (8ml/Kg) e alto volumes (24ml/Kg) e PEEP de 5cmH₂O, observou não haver aumento na expressão da actina no pulmão de seus animais, mas sim, alterações sugestivas de reorganização das fibras do citoesqueleto frente às tensões impostas pelo regime ventilatório imposto.

VM causa VILI em pulmões saudáveis, na ausência de lesões prévias, com baixo (7.5ml/Kg) ou com alto volume corrente (15ml/Kg) (Wolthuis et al., 2009). Caruso et al., 2003 demonstraram infiltrado inflamatório pulmonar e aumento da expressão de IL-1 β e α -1 pró-colágeno em ratos ventilados com Vt de 6ml/kg por uma hora quando comparados aos animais não ventilados. Moriondo et al. (2007) conduziram um estudo com ratos saudáveis, utilizando diferentes VTs e notaram que mesmo o "t fisiológico" (ml/g) afeta gravemente a arquitetura extracelular pulmonar, expondo o parênquima ao desenvolvimento da VILI, havendo um agravamento da intensidade da lesão em função do aumento do volume ofertado. Este mesmo grupo encontrou fragmentação severa dos GAGs e ativação de MMP-2 e MMP-9, sugerindo que o estresse tecidual causado pela VM aumente o efeito proteolítico na liberação de MMPs e, conseqüentemente, na degradação dos GAGs.

No presente estudo, procuramos diferenciar o grupo AV do AP em termos de mecanismos de lesão. O grupo AV é uma tentativa de induzir um aumento da amplitude de força aplicada ao parênquima. No grupo AV intuitivamente, regiões pulmonares não dependentes seriam as mais expostas. Por outro lado, no grupo AP, o pulmão inteiro sofreu um aumento mantido da pressão média de vias aéreas, causando um aumento na tensão, sentida por todo o órgão. Curiosamente, estas duas abordagens diferentes foram claramente diferenciadas pela expressão de mRNA dos PG no tecido pulmonar. Apenas o grupo AV mostrou diferenças entre as regiões dependentes e não dependentes do pulmão. Por outro lado, o grupo AP

apresentou aumento na expressão de todos os proteoglicanos relacionados à fibrogênese (decorina, versican, biglican e lumican), sem haver diferenças entre as regiões pulmonares.

Uma série de estudos tem mostrado que os proteoglicanos influenciam decisivamente no desenvolvimento do edema através de seus efeitos na complacência intersticial pulmonar (Miserocchi et al., 2001; Negrini et al., 1998). Cavalcante et al. 2005 postularam que PGs contribuem para a elasticidade pulmonar e estabilidade alveolar a altos e médios volumes. Al-Jamal et al. (2001) observaram uma diminuição da complacência e aumento da expressão de versican, biglican e heparan-sulfato no tecido pulmonar de ratos ventilados por duas horas a altos volumes (30ml/kg).

Um achado interessante do nosso estudo foi a maior expressão do biglican e do lumican na região pulmonar não dependente do grupo AV, sugerindo que esta região sofra maior impacto das forças de cisalhamento e da hiperdistensão (Marini et al., 2003), podendo apresentar maior estímulo para a fibrogênese (Caruso et al., 2003). Curiosamente, o grupo AP apresentou os maiores valores de biglican, lumican e decorina, em ambas as regiões pulmonares, dependentes e não dependentes. Estudos recentes têm demonstrado que o biglican apresenta ação pró-inflamatória importante nos macrófagos como um ligante endógeno dos receptores Toll-like 2 e 4 (TLR2 / TLR4) (Schaefer et al., 2005). Quando o biglican é liberado na MEC, devido à lesão tecidual, se torna disponível em sua forma solúvel. Nos macrófagos, através da interação com TLR2/4 e receptores purinérgicos P2X4/P2X7, o biglican solúvel estimula a expressão de NLRP3/ASC (nucleotide-binding

oligomerization domain-like receptor family members) e mRNA pró IL-1 β , sem a necessidade de fatores adicionais de co-estimulação (Babelova et al., 2009).

A decorina, um pequeno proteoglicano rico em leucina, possui a função essencial de regular a formação das fibras de colágeno e o arranjo espacial dessas fibras na matriz, apresentando importante papel na mecânica do tecido pulmonar. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo na expressão deste PG nos animais que sofreram maior estiramento do tecido pulmonar (AV e AP). Isto se deve provavelmente à interação colágeno-decorina, uma proteína estrutural que é recrutada em grandes estresses mecânicos (FUST et al., 2004). Em estudo *in vivo* e *in vitro*, FUST et al. (2005) demonstraram que as propriedades elásticas pulmonares de camundongos com deficiência de decorina foram diferentes das observadas em camundongos selvagens evidenciando o impacto da composição da MEC sobre as propriedades mecânicas do pulmão. Curiosamente, as áreas de deposição de colágeno foram mais facilmente observadas no grupo AP, conforme

O versican está diretamente relacionado com a formação do edema extracelular. Possui alta carga iônica proveniente das múltiplas cadeias de GAGs, sendo essencial em determinar o conteúdo de água ou turgor da MEC. No presente trabalho, os grupos AV e AP apresentaram um aumento significativo na expressão gênica do versican nas regiões pulmonares posterior, onde o edema é mais evidente.

Pressão e volume parecem agir diferentemente, com grandes alterações de força imposta pela ventilação com altos volumes, refletindo-se mais nas regiões pulmonares não-dependentes. Ao estabelecer uma alta pressão média contínua nas vias aéreas e conseqüente alta pressão transpulmonar durante todo o ciclo respiratório, como no grupo AP, esta setorização do dano no parênquima pulmonar desaparece e todas as regiões são afetadas igualmente pelo novo regime pressórico, desencadeando uma grande resposta para a matriz levando a duas conseqüências comuns: inflamação e fibrogênese. Tal observação corrobora os resultados de um estudo *in vitro* que determinou que a força mantida e não a amplitude foi o principal fator determinante do aumento da expressão PCIII (Garcia et al., 2004).

Uma limitação desse estudo foi o fato de não termos mantido o mesmo fluxo nos três grupos submetidos aos protocolos de VM, não podendo assim avaliar a repercussão causada por ele nas lesões sofridas pelo parênquima pulmonar dos animais, uma vez que, estudos (Maeda et al., 2004) mostram que altos picos de fluxo podem lesar o tecido pulmonar. Em estudo com vinte e quatro coelhos, Maeda et al. (2004) demonstraram que ventilação com altos volumes apresentaram deterioração da troca gasosa e da mecânica pulmonar e a lesão pulmonar foi associada à oferta de altos picos de fluxos inspiratórios ($28.8 \pm 1,4$ l/min). Neste mesmo estudo, porém, o grupo que recebeu pico de fluxo de $7,5 \pm 0,5$ l/min não mostrou alterações significativas compatíveis com lesão pulmonar, sendo assim, como nosso

pico de fluxo não foi superior à $8,6 \pm 1,0$ l/min acreditamos não ter influenciado os nossos resultados.

Outra limitação do estudo foi ter havido necessidade de infundir diferentes quantidades de fluidos nos animais durante o protocolo de VM, para que se mantivessem vivos e fosse possível o término do protocolo.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

1 - As forças geradas pela VM agem sobre o parênquima pulmonar determinando alterações na expressão gênica dos proteoglicanos, independentemente da resposta inflamatória tecidual. Pressão e volume agem de forma diversa, sendo que a alta pressão transpulmonar mantida durante todo o ciclo respiratório mostrou-se como a maior indutora da expressão dos proteoglicanos relacionados aos processos de fibrogênese.

2 - Grandes alterações de amplitude de força, impostas pela ventilação com altos volumes causaram uma inomogeneidade da resposta da expressão gênica de proteoglicanos, sendo mais intensa nas regiões não dependentes do pulmão. Ao contrário, a alta tensão tecidual mantida durante todo o ciclo respiratório, no grupo alta pressão, causou uma resposta mais homogênea do parênquima pulmonar quanto à expressão gênica dos proteoglicanos estudados.

REFERÊNCIAS

7 Referências

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1998;338(6):347-54 .

Al-Jamal R, Ludwig MS. Changes in proteoglycans and lung tissue mechanics during excessive mechanical ventilation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(5):L1078-87.

Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Gröne HJ, Schaefer L. Biglycan, a Danger Signal That Activates the NLRP3 Inflammasome via Toll-like and P2X Receptors. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24035-48.

Berg JT, Fu Z, Breen EC, Tran HC, Mathieu-Costello O, West JB. High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol*. 1997;83(1):120-8.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(3 Pt 1):818-24.

Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:677-95.

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200(4):423-8.

Breen EC. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. *J Appl Physiol*. 2000;88(1):203-9.

Broccard AF, Hotchkiss JR, Suzuki S, Olson D, Marini JJ. Effects of mean airway pressure and tidal excursion on lung injury induced by mechanical ventilation in an isolated perfused rabbit lung model. *Crit Care Méd.* 1999;27(8):1533-41.

Bueno PC, Bueno CE, Santos ML, Oliveira-Júnior I Jr, Salomao R, Pinheiro BV, Beppu OS. Ventilation with high tidal volume induces inflammatory lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(2):191-8.

Carney D, DiRocco J, Nieman G. Dynamic alveolar mechanics and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2005;33[3 Suppl.]:S122-8.

Caruso P, Meireles SI, Reis LF, Mauad T, Martins MA, Deheinzelin D. Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. *Intensive Care Med.* 2003;29(10):1808-11.

Cavalcante FS, Ito S, Brewer K, Sakai H, Alencar AM, Almeida MP, Andrade JS Jr, Majumdar A, Ingenito EP, Suki B. Mechanical interactions between collagen and proteoglycans: implications for the stability of lung tissue. *J Appl Physiol.* 2005;98(2):672-9.

Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:109-16.

Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, Post M. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1051-59.

Copland IB, Reynaud D, Pace-Asciak C, Post M. Mechanotransduction of stretch-induced prostanoid release by fetal lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(3):L487-95.

Copland IB, Post M. Stretchactivated signaling pathways responsible for early response gene expression in fetal lung epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2007;210(1):133-43.

De Carvalho ME, Dolhnikoff M, Meireles SI, Reis LF, Martins MA, Deheinzelin D. Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. *Critical Care*. 2007;11:R23.

Dolinay T, Wu W, Kaminski N, Hedigbo E, Kaynar AM, Szilasi M, Watkins SC, Ryter SW, Hoetzel A, Choi AM. Mitogen-activated protein kinases regulated susceptibility to ventilator-induced lung injury. *PLoS One*. 2008;3(2):e1601.

Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: Mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1645-55.

Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(4):880-4.

Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(5):1159-64.

Dreyfuss D, Saumon G. Role of tidal volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148(5):1194-1203.

Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. Lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1): 294-323.

Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1487-1500.

Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, Santana MC, Lassance R, Prota LF, Amato MB, Morales MM, Zin WA, Rocco PR. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):53-61.

Fisher JL, Margulies SS. Na(+)-K(+)-ATPase activity in alveolar epithelial cells increases with cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283(4):L737-46.

Fust A, Bates JH, Ludwig MS. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143(1):77-86.

Fust A, LeBellego F, Iozzo RV, Roughley PJ, Ludwig MS. Alterations in lung mechanics in decorin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(1):L159-66.

Garcia CS, Rocco PR, Facchinetti LD, Lassance RM, Caruso P, Deheinzelin D, Morales MM, Romero PV, Faffe DS, Zin WA. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;144(1):59-70.

Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* 2006;25(8):484-91.

Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(3 Pt 1):602-11.

Gur an , ' onnell , ro er , uc deschel , Becker PM. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(3):L710-8.

Haitsma JJ, Uhlig S, Goggel R, Verbrugge SJ, Lachmann U, Lachmann B. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med.* 2000;26(10):1515-22.

Haitsma JJ, Uhlig S, Verbrugge SJ, Goggel R, Poelma DL, Lachmann B. Injurious ventilation strategies cause systemic release of IL-6 and MIP-2 in rats in vivo. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003;23(6):349-53.

Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, Van Der Hoefer JG. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med.* 2005;63(10):382-392

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*. 1992;6(3):861-70.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:609-52.

Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:625-36.

Kotani M, Kotani T, Li Z, Silbajoris R, Piantadosi CA, Huang YC. Reduced inspiratory flow attenuates IL-8 release and MAPK activation of lung overstretch. *Eur Respir J*. 2004;24(2):238-46.

Kozma C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R. Anatomy, physiology and biochemistry of the rabbit. In: Weisbroth SH, Flatt RE, Krauss AL, editors. *The biology of the laboratory rabbit*. San Diego: Academic Press; 1974. v.3, p.49-72

Kumar A, Lnu S, Malya R, Barron D, Moore J, Corry DB, Boriek AM. Mechanical stretch activates nuclear factor-kappaB, activator protein-1, and mitogen-activated protein kinases in lung parenchyma: implications in asthma. *FASEB J*. 2003;17(13):1800-11.

Lionetti V, Recchia F, Rainier M. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr Opin Crit Care*. 2005;11(1):82-6.

López-Aguilar J, Villagrà A, Bernabé F, Murias G, Piacentini E, Real J, Fernández-Segoviano, Romero PV, Hotchkiss JR, Blanch L. Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2005;33(5):1077-83.

Ludwig MS. Proteoglycans and pathophysiology. *J Appl Physiol*. 2007;103(3):735-6.

Maeda Y, Fujino Y, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Nishimura M. Effects of peak inspiratory flow on development of ventilator-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology*. 2004;101(3):722-8.

Marini JJ, Hotchkiss JR, Broccard AF. Microvascular and airspace linkage in ventilator-induced lung injury. *Critical Care*. 2003;7(6):435-44.

Mascarenhas MM, Day RM, Ochoa CD, Choi W, Yu L, Ouyang B, Garg HG, Charles AH, Quinn DA. Low molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances Interleukin-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(1):51-60.

Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D, Ware L B, Lim L H K, Syrkina O, Eyal F, Hubmayr R. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(4):L678-82.

Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol*. 1970;28(5):596-608.

Meinhardt JP, Schmittner M, Herrmann P, Mailer M, Quintel M. Comparison of different inhalational perfluorocarbons in a rabbit model of acute lung injury. *ASAIO J*. 2005;51(1):85-91.

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

Moriondo A, Pelosi P, Passi A, Viola M, Marcozzi C, Severgnini P, Ottani V, Quaranta M, Negrini D. Proteoglycans fragmentation and respiratory mechanics in mechanically ventilated healthy rats. *J Appl Physiol* 2007;103(3):747-56.

Negri EM, Montes GS, Saldiva PH, Capelozzi VL. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? *Histopathology*. 2000;37(5):393-401.

Negrini D, Passi A, De Luca G, Miserochi G. Proteoglycan involvement during development of lesional pulmonary edema. *Am J Physiol*. 1998; 274(2 Pt 1):L203-11.

Pelosi P, Rocco PR. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. *Intensive Care Med*. 2008;34(4):631-9.

Pinhu L, Whitehead T, Evans T, Griffiths M. Ventilator-induced lung injury. *Lancet*. 2003;361(9354):332-40.

Ruoslahti E and Yamaguchi Y: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867-869

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Tolllike receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2223-33.

Schumacker PT. Straining to understand mechanotransduction in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(5):L881-82.

Scott-Burden T. Extracellular matrix:the cellular environment. *NIPS*. 1994;9:110-15.

Simonson D, Adams AB, Wright LA, Dries DJ, Hotchkiss JR, Marini JJ. Effects of ventilatory pattern on experimental lung injury caused by high airway pressure. *Crit Care Med*. 2004;32(3):781-6.

Sinclair SE, Kregenow DA, Lamm WJ, Starr IR, Chi EY, Hlastaia MP. Hypercapnic acidosis is protective in na in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Am J Resp Crit Care Med*. 2002;166(3):403-8.

Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care*. 2005;50(5):646-59.

Sobin SS, Fung YC, Tremer HM. Collagen and elastin fibers in human pulmonary alveolar walls. *J. Appl. Physiol*. 1988;64(4):1659-75.

Suh GY, Koh Y, Chung MP, An CH, Kim H, Jang WY, Han J, Kwon OJ. Repeated derecruitments accentuate lung injury during mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2002;30(8):1848-52.

Suzuki S, Hotchkiss JR, Takahashi T, Olson D, Adams AB, Marini JJ. Effect of core body temperature on ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2004;32(1):144-9.

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

The Acute Respiratory Distress Syndrome Network: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1301-8.

The Acute Respiratory Distress Syndrome Network: Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2004;351(4):327-36.

Waters CM, Sporn PH, Liu M, Fredberg JJ. Cellular biomechanics in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(3):L503-9.

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

Weibel ER, Crystal RG. Structural organization of the pulmonary interstitium. In: Crystal RG, West JB, editors. *The lung scientific foundations*. New York: Raven Press; 1991. p.369-87.

Olson D, Choudhury S, Goddard M, Takata M, Nicholson AG, et al. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*. 2003;95(4):1385-93.

Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signalling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):L599-607.

Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Critical Care* 2009;13(1):R1.