RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FIBROGÊNICA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR ÁCIDO OLÉICO

MARIA EUDÓXIA PILOTTO DE CARVALHO

Tese de Doutorado apresentada à Fundação Antônio Prudente para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Daniel Deheinzelin



São Paulo 2005



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo

de Carvalho, Maria Eudóxia Pilotto **Resposta inflamatória e fibrogênica em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por ácido oléico** / Maria Eudóxia Pilotto de Carvalho-- São Paulo, 2005. 57p. Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia. Orientador: Daniel Deheinzelin Descritores: 1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO/fisiopatologia. 2. VENTILAÇÃO MECÂNICA. 3. FIBROSE PULMONAR/patologia. 4. INFLAMAÇÃO PULMONAR/fisiopatologia. 5.

MATRIZ EXTRACELULAR. 6. COLÁGENO.

DEDICATÓRIA

Para o Michel e a Sofia

AGRADECIMENTOS

Dr. Daniel Deheinzelin LIM 20 FMUSP: Prof. Dr. Milton Arruda Martins LABRI Instituto Ludwig: Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis LIM 05 FMUSP: Dra Marisa Dolhnikoff Depto de Patologia Hospital do Câncer: Dr. Humberto Torloni Lab de Engenharia Biomédica POLI USP: Dr. Henrique T. Moriya LIM 09 FMUSP: Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro de Carvalho, Profa. Dra. Carmen Sílvia Valente Barbas, Dr. Marcelo Britto Passos Amato, Dr. Pedro Caruso

RESUMO

de Carvalho MEP. **Resposta inflamatória e fibrogênica em um modelo de Iesão pulmonar aguda experimental induzida por ácido oléico**. São Paulo; 2005 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Na Lesão Pulmonar Aguda (LPA) há aumento precoce de pró-colágeno tipo III (PC III), um marcador de fibrogênese, o que pode afetar adversamente o desfecho desta síndrome. A forma com que esse fenômeno interage com a ventilação mecânica (VM), região pulmonar e inflamação ainda não é totalmente conhecida. Objetivo: Examinamos se diferentes estratégias ventilatórias alteram a expressão regional de RNA mensageiro (RNAm) para PC III e interleucina-1 β (IL-1 β) na LPA induzida por ácido oléico em ratos. Métodos: Ratos Wistar SPF foram distribuídos da seguinte forma: dois grupos controle (sem lesão + recrutamento -NIR e controle -C); lesão pelo ácido oléico sem VM (OA); lesão pelo ácido oléico + VM por 1 hora. As estratégias ventilatórias adotadas foram: LVHP-S (baixo volume corrente -PEEP alta, posição supina): PEEP=12 cmH₂O e V_T =6 ml/kg; HVLP-S (alto volume corrente - PEEP baixa em posição supina): PEEP=5 cmH₂O V_T=20 ml/kg e alto volume corrente e baixa PEEP em posição prona (HVLP-P). Para a detecção da expressão dos genes de interesse foi realizada análise de Northern blot. Através de histomorfometria avaliamos o infiltrado de polimorfonuclerares (PMI). Ambas foram realizadas nas regiões pulmonares dependentes e não-dependentes. As diferenças regionais entre os grupos foram verificadas através de análise de variância (ANOVA 2-way) e testes post-hoc. Resultados: Encontramos um nível de expressão de IL-1ß mínimo (grupo C), intermediário (LVHP-S) e alto (OA, HVLP-S, HVLP-P) (p<0.0001, para o efeito de grupo) sem diferenças regionais (p= 0.56). O índice PMI teve comportamento semelhante (p<0.00001, para o efeito de grupo). Houve interação significativa entre os efeitos de grupo e região em relação à expressão de PC III (p= 0.004), com expressão mais alta nas regiões nãodependentes de HVLP-S e LVHP-S, intermediária para OA e HVLP-P e baixa para C. Conclusão: A lesão pulmonar desencadeou uma reação inflamatória que não foi influenciada pela região pulmonar e pôde ser modificada de acordo com a estratégia ventilatória. A expressão de PC III foi mais alta nas regiões não-dependentes, não ocorreu paralelamente à inflamação e aumentou nas estratégias ventilatórias que promoveram hiperdistensão. Esta resposta foi parcialmente atenuada pela VM em posição prona.

SUMMARY

de Carvalho MEP. [Inflammatory and fibrotic response in experimental oleic acid acute lung injury]. São Paulo; 2005 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

In Acute Lung Injury (ALI) elevation of procollagen type III (PC III) occurs early and adversely impacts on outcome. Objective: We examined if different mechanical ventilation (MV) strategies in oleic acid ALI alter regional expression of PC III and interleukin-1ß (IL-1ß). Methods: Rats were allocated to two control groups (no injury recruited -NIR and control - C); oleic acid injury (OA); oleic acid injury and MV (1 h). MV designs: LVHP-S (low volume - high PEEP, supine: PEEP=12 cmH₂O V_T =6 ml/kg); HVLP-S (high volume low PEEP, supine: PEEP=5 cmH₂O V_T =20 ml/kg) and HVLP-P (high volume - low PEEP, prone). Results: Northern blot analysis and polymorphonuclear infiltrate (PMI) counting were performed in nondependent and dependent regions. Regional differences between groups were assessed by 2-way ANOVA and post-hoc tests. We found minimal (C), intermediate (LVHP-S) and high (OA, HVLP-S, HVLP-P) expression of IL-1ß (p<0.0001, group effect) without regional differences (p= 0.56). PMI behaved similarly (p<0.00001, group effect). A significant interaction for group and region effects was seen for PC III (p= 0.004) with higher expression in the nondependent region for HVLP-S and LVHP-S, intermediate for OA and

HVLP-P and lower for C. **Conclusion**: Lung injury triggered inflammation that is not influenced by region and is modified by ventilatory strategy. PC III expression is higher in nondependent region, does not parallel inflammation and is increased in ventilatory strategies that caused overdistension. This response was partially attenuated by prone positioning.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Desenho das estratégias ventilatórias e dos grupos controle.	13
Figura 2	Lesão pulmonar induzida pelo ácido oléico	28
Figura 3	Expressão de RNAm para PC III	29
Figura 4a	ι Expressão de RNAm para IL-1 $β$	32
Figura 4k	PMI (infiltrado de polimorfonucleares)	32

Tabela 1	1 Comparação das variáveis de controle e das variáveis de VM						
	entre os grupos.	27					
Tabela 2	Expressão de RNAm de PC III	31					
Tabela 3	Expressão de RNAm de IL-1β e PMI	34					

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Anova two-way	análise de variância								
CPAP	continuous positive airway pressure (pressão positiva								
	contínua nas vias aéreas)								
CTGF	connective tissue growth factor								
FiO ₂	ração inspirada de oxigênio								
FR	freqüência respiratória								
IGF	insulin growth factor								
IL-1 β	interleucina 1 beta								
LBA	lavado bronco-alveolar								
LPA	lesão pulmonar aguda								
LPIV	lesão pulmonar associada à ventilação mecânica								
MMP-7	matrix metalloproteinase 7 (matrilisina)								
PAm	pressão arterial média								
PC I	pró-colágeno tipo l								
PC III	pró-colágeno tipo III								
PCO ₂	pressão arterial de gás carbônico								
PDGF	platelet-derived growth factor								
PEEP	positive end-expiratory pressure (pressão positiva								
	expiratória final)								
PMI	índice de polimorfonucleares								
PMN	polimorfonucleares								

- PO₂ pressão arterial de oxigênio
- Pp_{VA} pressão de pico das vias aéreas
- **RNAm** ácido ribonucléico mensageiro
- **SDRA** síndrome do desconforto respiratório agudo
- **TGF**β**1** *transforming growth factor* beta 1
- UV luz ultravioleta
- VM ventilação mecânica
- V_T volume corrente

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO					
1.1	Fase fibroproliferativa da SDRA/LPA					
1.2	Objetivos do estudo	5				
1.3	Modelo experimental	7				
2	MÉTODOS	8				
2.1	Materiais e procedimentos	8				
2.1.1	Anestesia	9				
2.1.2	Traqueostomia	1(0			
2.1.3	Cateterização da veia jugular interna direita	10	0			
2.1.4	Cateterização da carótida interna direita	10	0			
2.1.5	Preparação e administração do ácido oléico	1(0			
2.2	Ventilação mecânica do animal sistema de aquisição	o e análise				
	dos sinais	1	1			
2.2.1	Sistema de ventilação mecânica	11	1			
2.2.2	Calibração	1	1			
2.2.3	Aquisição e análise dos dados	12	2			
2.3	Medidas de pressão arterial média e ressuscitação	volêmica 13	3			
2.4	Estratégias ventilatórias dos grupos	1:	3			
2.4.1	Grupos controle	14	4			
2.4.2	Grupos ventilados	15	5			
2.5	Retirada e fixação dos pulmões	• 16	6			
2.6	Cortes histológicos e histomorfometria	18	8			
2.6.1	Preparo das lâminas	18	8			
2.6.2	Estudo da Histomorfometria	18	8			
2.7	Extração do RNA	20	0			
2.8	Sondas para IL-1 β e PC III	20	0			
2.8.1	Digestão do plasmídeo para obtenção da sonda	· 2′	1			

2.9	Northern Blot	22				
2.9.1	Fracionamento e transferência do RNAm					
2.9.2	Hibridação das membranas com as sondas 2					
2.9.3	Quantificação do RNAm	23				
2.9.4	Material usado na quantificação do RNAm	23				
2.10	Análise estatística	25				
3	RESULTADOS	26				
3.1	Variáveis de controle	26				
3.2	Expressão de RNAm para PC III	29				
3.3	Expressão de RNAm para IL-1 β e PMI	32				
4	DISCUSSÃO	36				
4.1	VM e ativação de genes da matriz extracelular 3					
4.2	Influência de região e estratégia ventilatória 37					
4.3	Papel protetor da posição prona 38					
4.4	Padrões de fibrogênese e de inflamação conforme a estra	tégia				
	ventilatória	39				
4.5	Resposta inflamatória	39				
5	CONCLUSÃO	42				
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43				
	ANEXO					
	Anexo A					
GLOS	SSÁRIO					

1 INTRODUÇÃO

Com o advento da ventilação mecânica (VM) e a melhora dos cuidados com os pacientes portadores da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) nas unidades de terapia intensiva, novos desafios surgiram. Emergência de infecções, suporte à insuficiência de múltiplos órgãos e a progressão para a fibrose pulmonar estão entre eles. Destes, a fase fibroproliferativa da SDRA merece atenção por estar associada a aumento de risco de morte hospitalar (CLARK et al. 1995; CHESNUTT et al. 1997; MEDURI et al. 1998; MARSHALL et al. 2000) e por que o grau de fibrose do parênquima e a perda funcional têm impacto na sobrevida a longo prazo (HEFFNER et al. 1995; MARTIN et al. 1995; TOMASHEFSKI 2000). A fibrose pulmonar é conseqüência da lesão pulmonar aguda (LPA) (MONTGOMERY et al. 1985; MEDURI et al. 1995). Compreender os mecanismos moleculares do remodelamento da matriz extracelular que em última instância levam à fibrose pode prover meios para tratar ou até mesmo prevenir seu aparecimento.

1

1.1 FASE FIBROPROLIFERATIVA DA SDRA/LPA

No pulmão a matriz extracelular é composta por fibras colágenas dos tipos I, III e IV, por fibras elásticas, por outras proteínas fibrilares (laminina, entactina, heparina e fibronectina) além de proteoglicanos. O colágeno tipo I

é encontrado na parede dos grandes vasos e brônquios; o colágeno tipo III predomina nos septos alveolares e o colágeno tipo IV está restrito à membrana basal (KELLEY 1989). A existência da fase fibroproliferativa é conhecida desde o final da década de 70 (ZAPOL et al. 1979). A deposição excessiva de fibras colágenas faz parte deste fenômeno, no entanto cabe observar que todos os componentes da matriz extracelular respondem à agressão inicial. De fato, existe aumento do conteúdo de fibras elásticas nos pulmões de pacientes que faleceram com SDRA (NEGRI et al. 2002). Além disso, proteoglicanos como versican e heparan-sulfatp também aumentaram em um modelo experimental de fibrose pulmonar com bleomicina (EBIHARA et al 2000).

Apesar da fibrose ser observada histologicamente em geral a partir do sétimo dia da síndrome (TOMASHEFSKI 1990) ela é a resultante de um processo que tem um início muito mais precoce, simultâneo ao da agressão pulmonar (DEHEINZELIN et al. 1997; CARUSO et al. 2003).

Em termos fisiopatológicos os eventos pró-fibróticos incluem inflamação, apoptose do epitélio pulmonar, remodelamento da matriz extracelular e ativação de vias de sinalização entre epitélio e mesênquima.

O balanço líquido da ação do infiltrado inflamatório celular composto de macrófagos, linfócitos, polimorfonucleares não segue uma direção unívoca. Os mediadores produzidos por estas células têm ação em vários pontos da cascata inflamatória. Por exemplo leucotrieno C4 e MCP1 são moléculas que têm potencial tanto para amplificar a inflamação, alterando a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar quanto para estimular a

fibrogênese levando à proliferação de fibroblastos e à síntese de colágeno (PHAN et al. 1988; YAMAMOTO et al. 2000). No sentido inverso, o fator de crescimento para fibroblastos TGF β_1 também regula a permeabilidade epitelial em resposta a um insulto agudo (PITTET et al. 2001).

A apoptose das células epiteliais ocorre na SDRA de forma bastante acentuada (MARTIN et al. 2003). A apoptose pode ocorrer pela ativação da via Fas/ligante de Fas (ALBERTINE et al. 2002) e é um determinante tanto da injúria inicial quanto da resposta reparadora (UHAL 2002; MARTIN et al. 2003).

O desnudamento do epitélio que ocorre em conseqüência de necrose por lesão direta ou de apoptose deixa expostas áreas de matriz extracelular. Nestas áreas a presença de fator tecidual, uma proteína pró-coagulante constitutivamente expressa no epitélio e nos macrófagos alveolares (CHAPMAN et al. 1988), inicia a cascata da coagulação. Além disso, o aparecimento de exsudatos intra-alveolares pela quebra da barreira alvéolocapilar amplificam a ativação dos elementos pró-coagulantes (IDELL 2003). A resultante deste processo é a formação de uma matriz provisória rica em fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (IGF, PDGF, CTGF) que atraem e suportam a migração e a proliferação de fibroblastos (PUGIN et al. 1999). Nesta fase a fibrinólise teria um papel importante na reabsorção desta matriz (CARMELIET et al. 1994). A reabsorção também é prejudicada pelo excesso de inibidores de protease tais como PAI-1 (SISSON et al. 2002), cuja expressão é induzida por TGFβ₁ (CHAPMAN 2004). Desta forma a

matriz se torna insolúvel e é incorporada ao septo alveolar espessado e reepitelizado (KUHN C 3rd et al. 1989).

4

Na fase fibroproliferativa estão ativas vias de sinalização entre epitélio e mesênquima que ocorrem durante a embriogênese (WARBURTON et al. 2001). Há evidências de que a via de sinalização Wnt/βcatenina está ativa no pneumócito tipo II hiperplástico de pacientes com dano alveolar difuso (CHILOSI et al. 2003). A translocação para o núcleo do fator de transcrição βcatenina induz a expressão do gene para matrilisina (MMP-7), uma metaloproteinase que regula a migração das células epiteliais, sua apoptose e a transição epitélio-mesênquima (SEIKI 2002). Recentemente demonstrouse que a matrilisina é uma das proteínas capazes de controlar a fibrogênese em pacientes com pneumonia intersticial usual (ZUO et al. 2002).

Na última década muito se aprendeu sobre os mecanismos celulares e moleculares relativos à regulação da inflamação como conseqüência do estiramento do pulmão (PUGIN 2003). No entanto pouco se sabe sobre o efeito do estiramento dos pulmões como conseqüência da VM sobre a fase fibroproliferativa (PUGIN 2003; American Thoracic Society-ATS 2004). A VM submete o parênquima pulmonar a altos níveis de insuflação e é capaz de levar a um remodelamento da matriz extracelular, como já foi observado em pacientes (DEHEINZELIN et al. 1997) e em modelos experimentais (PARKER et al. 1997; BERG et al. 1997; GARCIA et al. 2004; FARIAS et al. 2005). Neste contexto, nosso grupo mostrou que pulmões normais submetidos à VM lesiva com altos ou baixos volumes correntes (V_T) e pressão positiva expiratória final (PEEP) igual a zero apresentavam uma síntese precoce e aumentada de RNA mensageiro (RNAm) para prócolágeno do tipo III α1 (PC III) (CARUSO et al. 2003). Além disso, houve maior expressão de RNAm para PC III nas regiões não-dependentes quando comparadas às regiões dependentes (CARUSO et al. 2003). Esta expressão diferencial de PC III sugere que a resposta do parênquima pulmonar à VM pode depender da distribuição heterogênea de forças de estiramento que emergiram por causa da VM lesiva, que afeta as regiões pulmonares nãodependentes e as dependentes de forma diferente (DREYFUSS e SAUMON 1998).

1.2 OBJETIVOS DO ESTUDO:

Tendo em vista o impacto da fibrogênese na mortalidade, seu início precoce e a interação já demonstrada com a VM, tanto em termos de aumentar conforme crescem as pressões na via aérea bem como da influência regional (mais fibrogênese nas regiões não dependentes), procuramos investigar neste trabalho de que maneira a resposta fibroproliferativa precoce interage com diferentes estratégias ventilatórias em pulmões previamente lesados. Como forças de estiramento regionais parecem afetar esta resposta (CARUSO et al. 2003), empregamos três estratégias ventilatórias diferentes no grau de distensão regional, porém semelhantes no pico de pressão atingido na via aérea: alto V_T em supina (HVLP-S), PEEP alta e baixo V_T em supina (LVHP-S) e alto V_T em prona

(HVLP-P). Nosso objetivo foi observar como estas influenciariam a transcrição de RNAm para PC III nas regiões não-dependentes e dependentes dos pulmões de ratos tratados com ácido oléico e ventilados por 1 hora. Por ser curto o tempo de VM, a metodologia de quantificação de RNAm apresentou-se como de escolha, por não haver tempo hábil para síntese protéica em quantidade apreciável. A síntese estacionária de RNAm para pró-colágeno I (PC I) pode ser afetada por alteração na estabilidade do mensageiro (KRUPSKY et al. 1997; RICUPERO et al. 2001) e por modificação na sua taxa de transcrição (KRUPSKY et al. 1997). No entanto, vários experimentos em modelos *in vivo* mostram que ao aumento de RNAm para PC I corresponde um aumento consistente na síntese protéica de PC I (KOH et al. 1996; VAN HOOZEN et al. 2000; TRUEBLOOD et al. 2001) e , da mesma forma, de PC III (GURUJEYALAKSHMI e GIRI 1995).

Para determinar o grau de injúria pulmonar, já que este é um modelo de lesão precoce (HERNANDEZ et al. 1990), e relacioná-lo à fibroproliferação, examinamos a expressão de RNAm para interleucina-1 beta (IL-1β), que é um mediador potente de atividade inflamatória (PUGIN 1996), além de ser secretado nas fases iniciais do processo inflamatório (RIBEIRO et al. 2001; CARUSO et al. 2003) e de ser responsivo a mudanças na estratégia ventilatória (STÜBER et al. 2002; CARUSO et al. 2003). Também foi verificada a intensidade do infiltrado inflamatório de polimorfonucleares através do estudo morfométrico dos cortes histológicos dos pulmões.

1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE LPA POR ÁCIDO OLÉICO

A lesão pulmonar aguda induzida por ácido oleico (ácido cis-9octadenóico) já foi amplamente estudada em animais (JULIEN et al. 1986). Após a injeção endovenosa de ácido oleico há desenvolvimento de falência respiratória com taquipnéia, hipoxemia e edema pulmonar em várias espécies de animais (ASHBAUGH e UZAWA 1968; SMITH et al. 1973; GEMER et al. 1975; DERKS e JACOBOVITZ-DERKS 1977). Os efeitos fisiológicos da infusão de ácido oleico são conhecidos em termos hemodinâmicos e respiratórios. Há aumento da pressão de artéria pulmonar mantendo-se a pressão de oclusão de artéria pulmonar estável, diminuição do débito cardíaco e da freqüência cardíaca e diminuição transitória da pressão arterial sistêmica. Existe aumento da resistência vascular pulmonar enquanto que a resistência vascular sistêmica mantém-se estável (HOFFMAN et al. 1985). Do ponto de vista de troca gasosa, há aumento do gradiente alvéolo-arterial de O₂ e aumento da fração de shunt pulmonar levando a hipoxemia severa além de aumento da PCO₂, o que resulta em acidemia (HOFFMAN et al. 1985). Do ponto de vista de mecânica, existe diminuição da complacência do sistema respiratório, diminuição da capacidade residual funcional, deslocamento para baixo e para direita da curva pressão x volume dos pulmões isoladamente e do sistema respiratório, presença de um ponto de inflexão no ramo inspiratório da curva e aumento da histerese (ZHANG et al. 1992). A quebra da barreira alvéolo-capilar que leva a aumento de permeabilidade e edema pulmonar de baixa pressão se

caracteriza neste modelo por aumento da relação peso úmido/peso seco dos pulmões e aumento da água extravascular pulmonar (RUIZ-BAILEN et al. 1999). As alterações histológicas correspondem a uma alveolite aguda hemorrágica, com edema alveolar e atelectasias muito semelhante ao dano alveolar difuso (DICKEY et al. 1981), que é o substrato histológico da LPA/SDRA. Este envolvimento histológico e funcional é causado, neste modelo, por uma lesão endotelial precoce (detectada apenas 10 minutos após infusão, por microscopia eletrônica) por ácido oleico (BEILMAN 1995). Recentemente, camundongos que receberam 0,15 µl/g de ácido oléico apresentaram, 60 minutos após a infusão, as características da síndrome tais como aumento do edema pulmonar medido pelo peso, quebra de barreira epitelial avaliada pelo aumento de proteínas, células e polimorfonucleares (PMN) no lavado broncoalveolar, histologia com infiltrado de PMN e edema septal e aumento da densidade no parênguima pulmonar vista na tomografia computadorizada do tórax (ZHOU et al 2005). Pelos motivos acima consideramos que o modelo de lesão pulmonar por infusão de ácido oleico reproduz histologicamente e funcionalmente a SDRA.

2 MÉTODOS

2.1 MATERIAL E PROCEDIMENTOS



O estudo obedeceu aos princípios humanizados de cuidados com os animais de laboratório e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital do Câncer.

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

Os estudos de histomorfometria foram realizados com a participação da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-05).

Os experimentos envolvidos na quantificação de RNA mensageiro foram realizados no Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer (São Paulo-SP) e Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer (São Paulo-SP).

Foram estudados ratos Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*), livres de patógenos específicos, adultos, machos, com peso entre 200 e 350 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB).

2.1.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados via peritoneal, de maneira rápida e indolor, para minimizar o estresse. A sedação foi composta por cloridrato de quetamina (Ketalar®), na dose de 80 a 120 mg/ Kg peso e xilazina (Rompum®), na dose de 5 a 10 mg/kg de peso. Imediatamente após o início

da ventilação mecânica (nos grupos ventilados) foi administrado cloreto de succinilcolina (Quelicin®) endovenoso, na dose de 2 mg/kg de peso.

2.1.2 Traqueostomia

Com o animal em posição supina e então foi inserida na traquéia uma cânula de diâmetro interno de 0,17 mm, perfeitamente ajustada para evitar vazamentos, verificando-se a simetria da ventilação.

2.1.3 Cateterização da veia jugular interna direita

Após a traqueostomia, foi colocado um cateter de nylon de 0,05 mm de diâmetro interno na veia jugular direita e fixado com fios de algodão 4-0. Este cateter foi utilizado para a infusão de ácido oléico e succinilcolina.

2.1.4 Cateterização da carótida interna direita

Após cateterização da veia jugular, foi colocado um cateter de nylon de 0,05 mm de diâmetro interno na artéria carótida comum direita, fixado com fios de algodão 3-0. A este cateter conectou-se imediatamente uma coluna de mercúrio para medida da pressão arterial média (PAM). Este acesso arterial também foi usado para coleta de gasometria e infusão de salina (soro fisiológico a 0,9%).

2.1.5 Preparação e administração do ácido oleico

Trinta microlitros (30 μL) de ácido oléico puro (99%) (Sigma) foram preparados em suspensão com 270 μL albumina bovina em solução salina a

0,1%. A suspensão foi então injetada lentamente na veia jugular interna direita do animal em posição prona. Este permaneceu por 15 minutos nesta posição.

2.2 VENTILAÇÃO MECÂNICA DO ANIMAL: SISTEMA DE AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS SINAIS

2.2.1 Sistema de Ventilação Mecânica

O animal foi ventilado em ventilador mecânico micro-processado (Inter-3, Intermed Equipamento Médico Hospitalar Ltda. São Paulo). A parte proximal da cânula traqueal foi conectada ao transdutor de pressão e a linha de pressão do ventilador, para a monitorização simultânea pelo sistema do ventilador e pelo transdutor. Também foi conectada à cânula traqueal um pneumotacógrafo para pequenos animais (modelo 8420 Hans Rudolph, EUA) ligado a dois transdutores Validyne: um transdutor de pressão diferencial (modelo DP45-16-2114) para medida dos fluxos respiratórios e um transdutor de pressão (modelo DP45-28-2114)para a medida da pressão proximal das vias aéreas. Os transdutores foram conectados a um sistema de aquisição e acondicionamento de sinais (Gould RS 3400).

2.2.2 Calibração

A calibração da medida da pressão proximal da via aérea (PVA) foi feita com coluna de água, tomando se o valor de zero e 40 cmH₂0. A calibração dos fluxos respiratórios foi feita com 2 valores. Um de fluxo zero e

outro de 40 ml/seg, este último conseguido através de uma resistência, que na faixa de pressão do ventilador, produz um fluxo de 40 ml/seg. Esta resistência foi calibrada em um analisador de alta precisão (Timeter RT-200, Allied Heathcare Products, EUA), certificado pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica (nº 20590).

A calibração da pressão da via aérea proximal era feita no início de cada dia de experimento. A dos fluxos inspiratórios antes de cada experimento.

2.2.3 Aquisição e análise dos dados

Os transdutores foram conectados a uma placa de conversão analógica digital de 12 bits (DT 2801 A, Data Translation, MA, EUA), montada em um computador pessoal. A análise dos dados foi feita pelo programa Anadat 4.0, que os exibe e grava com a freqüência de 200 Hz. A medida do volume pulmonar foi feita pela integração do sinal de do fluxo no tempo.

Nos animais sob VM gravamos a pressão de via aérea proximal (Pp_{VA}) e os fluxos respiratórios, com freqüência de amostragem de 200 Hz. O intervalo de gravação foi de 20 segundos, o que permitiu a gravação de aproximadamente 30 ciclos respiratórios completos.

Foi utilizada uma fração inspirada de oxigênio constante de 40%. A frequência respiratória foi de 90 ciclos/minuto nos grupos ventilados.

2.3 MEDIDAS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E RESSUSCITAÇÃO VOLÊMICA

1

A PAm foi monitorizada constantemente durante o experimento, sendo registrada no início da VM e antes do animal ser sacrificado. A PAm foi mantida acima de 60 mmHg através de ressuscitação com alíquotas de até 1ml de salina, que equivalem a aproximadamente 10% do volume sangüíneo (ROSAS et al. 1977). As gasometrias arteriais foram colhidas após 5 minutos do início e imediatamente antes do final da VM (exceto no grupo controle C, aonde não foi colhida gasometria e no grupo OA, com gasometria aos 20 minutos da infusão de ácido oléico).

2.4 ESTRATÉGIAS VENTILATÓRIAS DOS GRUPOS

Os animais foram alocados aleatoriamente em cada um dos seis grupos experimentais (Figura 1):



Figura 1 - Desenho das estratégias ventilatórias e dos grupos controle.

2.4.1 Grupos controle

Grupo Controle (C)

Neste grupo, cinco ratos foram sacrificados após anestesia profunda com pentobarbital sem qualquer manobra ventilatória. O objetivo era medir a expressão basal de RNAm para PC III levando em consideração o fato de que mesmo distensões isoladas do parênquima pulmonar como as que ocorrem durante uma manobra de recrutamento podem aumentar a expressão de PC III (FARIAS et al. 2005).

Grupo Recrutado (NIR):

Este grupo destinou-se à avaliação da morfometria basal. Após a anestesia e a traqueostomia, 4 ratos foram recrutados com pressão positiva contínua (CPAP) de 30 cmH₂O por 30 segundos na tentativa de eliminar as atelectasias formadas devido à anestesia em posição supina (HEDENSTIERNA e ROTHEN 2000). Os pulmões foram retirados em CPAP de 5 cmH₂O.

Grupo de lesão pulmonar sem ventilação mecânica (OA):

Neste grupo o objetivo era avaliar a expressão de PC III num pulmão lesado porém sem a influência da VM. Desta forma 10 ratos anestesiados e traquostomizados receberam ácido oléico e permaneceram respirando espontaneamente por 1 hora em posição supina.

2.4.2 Grupos ventilados

Três grupos de animais foram ventilados com diferentes estratégias, mantendo a mesma pressão de pico de via aérea (Pp_{VA}).

<u>Grupo de lesão pulmonar com ventilação mecânica estratégia de baixo</u> volume corrente com PEEP alta (LVHP-S):

Após os procedimentos padrão, os ratos receberam ácido oléico para indução da lesão pulmonar, sendo então ventilados com volume corrente de 8 ml/kg e PEEP = 12 cmH₂O durante 1 hora em posição supina.

<u>Grupo de lesão pulmonar com ventilação mecânica estratégia de alto</u> <u>volume corrente baixo PEEP em posição supina (HVLP-S):</u>

Após os procedimentos padrão, os ratos receberam ácido oléico para indução da lesão pulmonar, sendo então ventilados com volume corrente de 20 ml/kg e PEEP = 5 cmH₂O durante 1 hora em posição supina.

<u>Grupo de lesão pulmonar com ventilação mecânica estratégia de alto</u> volume corrente baixo PEEP em posição prona (HVLP-P):

Após os procedimentos padrão, os ratos receberam ácido oléico para indução da lesão pulmonar, sendo então ventilados com volume corrente de 20 ml/kg e PEEP = 5 cmH₂O durante 1 hora, em posição prona.

2.5 RETIRADA E FIXAÇÃO DOS PULMÕES

Após uma hora de VM os animais foram anticoagulados via venosa com 500 unidades de heparina (Liquemine). Os pulmões foram retirados da seguinte maneira após confirmarmos que o animal encontrava-se adequadamente anestesiado:

- Abrimos a parede abdominal do animal e seccionamos a aorta e veia cava inferior completamente para sangria.
- 2. Com PEEP= 5 cmH₂O e VT= 8 ml/kg em todos os grupos ventilados ou CPAP= 5 cmH₂O no grupo NIR, abrimos o diafragma e retiramos toda a parede torácica anterior. O animal era colocado então em CPAP de 5 cmH₂O e a traquéia era fechada com fio de algodão 2-0. O coração e pulmão foram retirados "en bloc".
- O brônquio fonte esquerdo foi isolado e ocluído com fio de algodão 3-O sendo seccionado distalmente ao fio, de maneira que o pulmão direito era retirado mantendo-se pressurizado. Este pulmão foi imediatamente mergulhado em formol tamponado (pH=7,4) por 24 a 48 horas.
- 4. O pulmão esquerdo, que no rato é um lobo único, foi separado do direito tomando-se cuidado para não introduzir RNAses. Este pulmão foi dividido em 3 partes iguais, uma não dependente (ventral), outra hilar e a última dependente (dorsal). As porções não dependente e dependente foram colocadas cada qual em um microtubo de 1,7 ml

(Eppendorf®) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Estas amostras foram mantidas em *freezer* a –80 °C até seu devido processamento.

2.6 CORTES HISTOLÓGICOS E HISTOMORFOMETRIA

2.6.1 Preparo das lâminas

Após 24 a 48 horas no formol tamponado o pulmão direito foi retirado. No rato este pulmão apresenta 4 lobos, que foram dissecados e retirados separadamente. O lobo médio foi usado como referência da região não dependente do pulmão, já que está localizado próximo ao esterno. A porção paravertebral do lobo inferior foi usada como referência da região dependente.

Foram preparadas lâminas com 2 μm de espessura e coradas pela Hematoxilina e Eosina.

Para cada animal foram preparadas duas lâminas, uma representando a região não dependente (lobo médio) e outra representando a região dependente (lobo inferior).

2.6.2 Estudo da Histomorfometria

Estudamos o infiltrado de polimorfonucleares (PMI) através da morfometria convencional (WEIBEL 1963) que conta pontos com um microscópio ótico acoplado a retículo de 100 pontos e 50 retas. Desta forma PMI foi calculado como a razão entre o número de pontos que caíram sobre polimorfonucleares e o número de pontos que caíram sobre os septos alveolares. Analisamos 15 campos aleatórios de parênquima pulmonar por lâmina, no aumento de 400x. Uma média dos 15 campos foi obtida para cada lâmina.

Equação do infiltrado de polimorfonucleares (PMI):

número de polimorfonucleares

número de pontos nos septos

2.7 EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA total da porção não dependente e da porção dependente do pulmão esquerdo foi extraído usando-se o produto e protocolo TRIzol® (Life Technologies, EUA). O TRIzol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA pelo TRIzol é uma adaptação de método anterior (CHOMCZYNSKI e SACCHI 1987).

Os fragmentos de tecido foram colocados em tubos com TRIzol, utilizando um mI para cada 100 mg de tecido triturado e homogeneizado por triturador elétrico (Polytron, Suíça). A purificação foi feita segundo o protocolo do fabricante. Sua pureza e quantidade foram verificadas em espectofotômetro, através da análise de absorbância a 260 e 280 nm. Só foram aceitas amostras com relação 260/280 entre 1,6 e 1,8. Pelo valor da absorbância de 260 nm e diluição, foi quantificado o RNA em μ g/ μ l, a partir da seguinte fórmula: RNA (μ g/ μ l) = (Diluição x Absorbância x 40)/ 1000 μ g/ μ l.

2.8 SONDAS PARA IL-1 β E PC III

Utilizamos as sondas de IL-1β e PC III para *Rattus norvegicus* já disponíveis em nosso laboratório na forma de plasmídeos, fruto de trabalho de pesquisa anterior (CARUSO et al. 2003).

2.8.1 Digestão do plasmídeo para obtenção da sonda

Após a purificação dos plasmídeos pela "miniprep", 5 μl foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e KpnI (New England Biolabs, EUA). A solução foi mantida por 90 min a 37 °C. O produto da digestão foi fracionado em gel de agarose 1,2% com TAE 1X e corado com brometo de etídio (0,5µg/ml). Com luz ultra-violeta a banda foi recortada e purificada pelo sistema "Concert Gel Extraction Systems" (GibcoBRL). O produto purificado foi fracionado em gel de agarose para comprovar a presença do DNA purificado.

2.9 NORTHERN BLOT

Para confirmar a presença dos RNAm de interesse (PC III e IL-1β) e principalmente para quantificar a sua expressão foi utilizado "Northern-Blot", segundo protocolo já descrito (CHURCH e GILBERT 1984).

2.9.1 Fracionamento e transferência do RNAm

Quinze µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose a 1,2% tamponado com ácido bórico e 6% de formaldeído. Para aplicação no gel, o RNA foi diluído em tampão e incubado a 65 °C por 5 min. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal a 80 volts. O RNA foi transferido do gel para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham, EUA) por capilaridade durante 12 a 18 horas, à temperatura ambiente. O RNA foi fixado à membrana usando-se o aparelho UV Crosslinker® (FisherBiotech). Com o auxílio de luz UV (320nm) foram marcadas as posições dos RNAs ribossomais 28S e 18S.

2.9.2 Hibridação das membranas com as sondas

As membranas foram pré-hibridadas em tubos de hibridação por 20 min a 65°C e a hibridação feita segundo CHURCH e GILBERT (1984). As sondas de DNA complementar (PC III, IL-1β e GAPDH) foram marcadas com o método de "random priming" (Life Technologies), usando ³²P-dCTP (Amersham, EUA). Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de centrifugação por coluna de Sephadex G50. As sondas foram

desnaturadas a 95 °C por 5 min e transferidas para o gelo antes da hibridação.

As membranas foram hibridadas em forno de hibridação por 16 horas a 65 °C. Após a hibridação com IL-1β as membranas foram lavadas com solução de lavagem I, duas vezes por 30 min. Após a hibridação com PC III as membranas foram lavadas com solução de lavagem II, duas vezes por 30 min.

As membranas foram expostas primeiro à tela "Storage Phosfor Screen" (Molecular Dynamics, EUA) e reveladas pelo "Scanner Storm 840" (Molecular Dynamics, EUA).

Para normalizar a quantidade de RNA depositada, foi feita hibridação com sonda de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que é uma enzima do ciclo glicolítico, constitutivamente expressa no pulmão.

2.9.3 Quantificação do RNAm

O sinal gerado na hibridação foi quantificado pelo programa de computador Image Quant 5.0® (Molecular Dynamics), EUA), através da densidade ótica do sinal. Os valores foram expressos em relação ao sinal do GAPDH (IL-1β/GAPDH e PC III/GAPDH) em unidades arbitrárias de densidade.

2.9.4 Material usado na quantificação do RNAm

<u>SSC 20X</u>: Dissolver 292,2 g de Nacl; 88,2 g de citrato de sódio, H_2O qsp. Ajustar para pH 7,0 com NaOH e autoclavar.

<u>H₂0 DEPC</u>: água autoclavada tratada com 0,1 % de dietilpirocarboneto por 12 horas a 4 °C, esterelizada em autoclave por 15 min a 121 °C. Solução mantida a –20 °C.

Solução estoque de fosfato: 0,5M Na₂HPO₄ em pH de 7,2 ajustado com ácido fosfórico a 85%.

<u>Solução de hibridação</u>: 50% de solução de estoque de fosfato, 7% de SDS, 1% BSA e EDTA 1mM.

Soluções de lavagem de membrana: a solução de lavagem I é constituída por solução de estoque de fosfato 50%, SDS 1% e EDTA1mM. A solução de lavagem II é constituída por solução de estoque de fosfato 25%, SDS 1% e EDTA1mM.

<u>Gel de agarose 1,2%</u>: 1,2g de agarose dissolvido em TAE 1X e aquecido até solubilização a resina.

<u>Solução tampão 6X para amostra de DNA</u>: glicerol 30%; azul de bromofenol 0,25% e xilenocianol 0,25%.

TAE 50X: 242g Tris base; 57,1 ml de ácido acético glacial; 100 ml de EDTA 0,5M pH8,0.

<u>Tampão de RNA:</u> 20% de glicerol; 50% de formamida; 20 mM de ácido bórico; 0,2 mM de EDTA; 16% de formaldeído e azul de bromofenol com corante.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados para verificar sua distribuição. Por se tratar de amostra sem distribuição normal, foram utilizados os testes de Kruskal Wallis ou Mann-Whitney para as variáveis de controle. Para a comparação de medidas repetidas entre os grupos (PMI e expressão de RNAm para PC III e IL-1 β) usamos a análise de variância (ANOVA *two-way*) seguida de análise *post hoc* com o Tuckey *Honest Significant Difference*. Foram consideradas estatisticamente diferentes as comparações com p < 0,05.

	Ľ	VHP-S	H	VLP-S	H	VLP-P		OA		NIR		с	
	r	n = 10	r	n = 10	n	n = 10	n	= 10	r	1 = 4	n	= 5	р
÷	median	25-75	median	25-75	median	25-75	median	25-75	median	25-75D	median	25-75	
Peso (kg)	0.22	0.205-0.23	0.26	0.23-0.27	0.255	0.23-0.28	0.245	0.225-0.26	0.263	0.22-0.293	0.255	0.24-0.26	0.35
Keta	2.0	1.59-2.44	2.0	1.61-2.04	2.0	1.68-2.04	2.42	2.34-2.77	1.6	1.6-1.6			0.58 [#]
(ml/kg)								×					
Xyla	1.0	1.0-1.04	1.0	1.0-1.0	1.02	1.0-1.04	1.06	1.04-1.5	0.52	0.52-0.52			0.35 [#]
(ml/kg)													
Sal (ml/kg)	2.63	2.2-3.3	2.3	1.55-3.3	1.8	1.1-4.0	1.43	0.9-2.4					0.20 [#]
V⊤ (ml/kg)	8.8	8.5-10.1	18.2	17.2-20.6	18.59	13.5-24.6							0.82*
PEEP	12.13	12.03-12.16	5.27	5.09-5.46	5.26	5.07-5.39							0.85 [*]
(cmH₂O)													
Pp _{VA} (cmH₂O)	24.97	23.57-25.59	23.7	22.94-23.86	23.22	22.99-23.56							0.09**
Notas:	Notas: LVHP-S: baixo V _T -alta PEEP supina; HVLP-S: alto V _T -baixa PEEP, supina; HVLP-P: alto V _T -baixa PEEP, prona; OA: lesão pelo ácido oléico.												

Tabela 1 - Comparação das variáveis de controle e das variáveis de VM entre os grupos. Os resultados estão expressos como mediana (median) e intervalo interquartil (25-75).

sem VM; NIR: recrutado, sem lesão pelo ácido oléico; C: grupo controle. Keta: quetamina; xyla: xilazina; sal: saline; V_T: volume corrente P_{AW}. pressão de pico de vias aéreas. [#] teste de Kruskal-Wallis entre os grupos LVPEEP, HVS, HVP eOA ^{*} teste de Mann-Whitney entre os grupos HVS e HVP ^{**} teste de Kruskal-Wallis entre os grupos LVPEEP, HVS e HVP.

A administração de ácido oléico produziu de fato um quadro de lesão pulmonar aguda com hipoxemia no grupo OA (não ventilado) (Anexo A), edema dos septos alveolares e perivascular, além de grande infiltração por polimorfonuclerares (Figura 2), conforme era esperado (SCHUSTER 1994).



Figura 2 - Lesão pulmonar induzida pelo ácido oléico: edema perivascular (Ep) e alveolar (Ea) e infiltrado acentuado de polimorfonucleares. V: vênula (HE x 400).

3.2 EXPRESSÃO DE RNAm PARA PC III



A expressão de PC III por grupo e região está apresentada na Figura

Legenda - Os valores representam média e desvio padrão. * Diferença significativa em relação a HVLP-P, OA e C (p< 0.05). # Diferença significativa entre regiões para o grupo HVLP-S (p< 0.05).

Figura 3 - Expressão de RNAm para PC III normalizada pela expressão de GAPDH, obtida por Northern blot nas regiões não-dependentes e dependentes do pulmão esquerdo.

Houve interação significativa para os efeitos de grupo e região (para a interação, p= 0.004, ANOVA two-way), com expressão de PC III mais alta

nas regiões não dependentes (para o efeito de região, p= 0.0003, ANOVA two-way) e nos grupos LVHP-S end HVLP-S (para o efeito de grupo, p< 0.0001, ANOVA two-way). A análise *post-hoc* mostrou que a expressão de PC III foi alta na região não dependente dos grupos LVHP-S e HVLP-S, intermediária na região não dependente dos grupos OA e HVLP-P e baixa no grupo C com alguma sobreposição entre HVLP-P e C. Na região dependente também encontramos 3 níveis de expressão. Ela foi alta nos grupos LVHP-S e HVLP-S, intermediária nos grupos OA e HVLP-P com sobreposição entre HVLP-S e OA e baixa no grupo C. Notamos heterogeneidade regional no grupo HVLP-S, que teve expressão de PC III mais alta na sua região não dependente. Todos os resultados (mediana e intervalo interquartil) além das diferenças significativas entre grupos ou regiões após a análise *post-hoc* estão na tabela 2.

Tabela 2 - Expressão de RNAm de PC III relativa à expressão de GAPDH nas regiões dependente e não-dependente do pulmão. Os resultados estão expressos como mediana (median) e intervalo interquartil (25-75).

	LVHP-S	HVLP-S	HVLP-P	OA	NIR	С
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 4	n = 5
	median/	median/	median/	median/	median/	median/
	25-75	25-75	25-75	25-75	25-75	25-75
PC III/GAPDH	1.55	1.33	0.64	0.84		0.45
não-dependente	1.29-1.7	1.1-1.63	0.59-0.85	0.76-1.11		0.44-0.47
		#, ##, _§	##	#, ###		####
PC III/GAPDH	1.3	1.04	0.74	0.83		0.36
dependente	1.08-1.39	0.87-1.14	0.66-0.84	0.67-0.91		0.35-0.48
	*	**, s	** ***	*		***

Legenda - LVHP-S: baixo V_T-alta PEEP supina; HVLP-S: alto V_T-baixa PEEP, supina; HVLP-P: alto V_T-baixa PEEP, prona; OA: lesão pelo ácido oléico, sem VM; NIR: recrutado, sem lesão pelo ácido oléico; C: grupo controle.

Análise post-hoc:

- Encontramos diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões não-dependentes: # OA x HVLP-S, p= 0.0002; ## HVLP-P x HVLP-S, p= 0.0002; ### C x OA: p= 0.036).
- diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões dependentes: * LVHP-S x OA: p= 0.0002; ** HVLP-S x HVLP-P, p= 0.02; *** C x HVLP-P: p=0.01.
- Diferença significativa entre regiões no grupo HVLP-S: § HVLP-S região não-dependente x dependente: p= 0.0005.

3.3 EXPRESSÃO DE RNAM PARA IL-1 β E PMI

A expressão de of IL-1β e PMI por grupo e região estão apresentadas na Figura 4 a e b.



Legenda - Os valores representam média e desvio-padrão. * Diferença significativa em relação ao grupo LVHP-S (p< 0.05).

Figura 4 a - Expressão de RNAm para IL-1β relativa à expressão de GAPDH obtida por Northern blot nas regiões não-dependentes e dependentes do pulmão esquerdo.

Figura 4 b - PMI (infiltrado de polimorfonucleares) nas regiões nãodependentes e dependentes do pulmão direito.

Ambas variáveis exibiram comportamento semelhante. Observamos que a expressão de IL-1 β foi mínima no grupo C, intermediária no grupo LVHP-S e alta nos grupos HVLP-S, HVLP-P e OA (para o efeito de grupo, p< 0.0001, ANOVA two-way). Não houve diferença regional (para o efeito de

região, p= 0.56, ANOVA two-way). A análise *post-hoc* confirmou uma expressão mais baixa de IL-1 β no grupo LVHP-S, quando comparado ao grupo OA. Em relação aos grupos de alto V_T, observamos uma tendência para uma menor expressão de IL-1 β no grupo LVHP-S, principalmente na região não dependente, havendo sobreposição com a região dependente do grupo HVLP-S. A expressão de IL-1 β foi mínima no grupo C, confirmando as expectativas. Todos os resultados (mediana e intervalo interquartil) além das diferenças significativas entre grupos após a análise *post-hoc* estão na Tabela 3.

Em relação ao PMI, notamos pouco infiltrado de polimorfonucleares no grupo NIR, infiltrado intermediário no grupo LVHP-S e infiltrado acentuado nos grupos HVLP-S, HVLP-P e OA (para o efeito de grupo, p< 0.0001, ANOVA two-way). A análise *post-hoc* mostrou um infiltrado de polimorfonucleares menor no grupo LVHP-S, quando comparado às outras estratégias ventilatórias ou ao grupo OA. Não houve diferença regional (para o efeito de região, p= 0.72, ANOVA two-way). Todos os resultados (mediana e intervalo interquartil) além das diferenças significativas entre grupos após a análise *post-hoc* estão na Tabela 3.

	LVHP-S	HVLP-S	HVLP-P	OA	NIR	С
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 4	n = 5
	median/	median/	median/	median/	median/	median/
	25-75	25-75	25-75	25-75	25-75	25-75
IL-1β/GAPDH	1.27	1.97	1.84	1.85		0.03
não-dependente	1.08-1.79	1.81-2.12	1.46-2.22	1.53-2.26		0.03-0.06
	#, ##, ###	##		#		###
IL-1β/GAPDH	1.34	1.71	1.88	2.22		0.04
dependente	0.97-1.63	1.61-1.99	1.42-2.42	1.33-2.4		0.03-0.04
	* ** ***		**	*		***
PMI não-dependente	1.16	1.5	1.58	1.59	0.17	
	0.97-1.4	1.23-1.71	1.25-1.89	1.26-1.87	0.15-0.24	
	§, §§	§			\$§	
PMI	1.01	1.57	1.84	1.48	0.19	
dependente	0.96-1.23	1.08-1.81	1.33-2.07	1.05-1.64	0.15-0.2	
	£ ££			£	££	

Tabela 3 - Expressão de RNAm de IL-1 β relativa à expressão de GAPDH e PMI nas regiões dependente e não-dependente dos pulmões. Os resultados estão expressos como mediana (median) e intervalo interquartil (25-75).

Legenda - LVHP-S: baixo V_T-alta PEEP supina; HVLP-S: alto V_T-baixa PEEP, supina; HVLP-P: alto V_T-baixa PEEP, prona; OA: lesão pelo ácido oléico, sem VM; NIR: recrutado, sem lesão pelo ácido oléico; C: grupo controle.

Análise *post-hoc* para a expressão de IL-1β:

 Encontramos diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões não-dependentes: #: LVHP-S x OA: p= 0.02; ## LVHP-S x HVLP-S: p= 0.002; ### LVHP-S x C: p= 0.0002. Encontramos diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões dependentes: * LVHP-S x OA: p= 0.02; ** LVHP-S x HVLP-P: p= 0.006; *** LVHP-S x C: p= 0.0002.

Análise post-hoc para para PMI:

- Encontramos diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões não-dependentes: § LVHP-S x HVLP-S, p= 0.0002; §§ LVHP-S x NIR: p= 0.0002.
- Encontramos diferenças significativas entre os seguintes grupos nas regiões dependentes: £ LVHP-S x OA, p= 0.002; ££ LVHP-S x NIR: p= 0.0002.

4 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram:

- em primeiro lugar, o aumento da expressão de PC III ocorreu cedo neste modelo de LPA e foi significativamente maior nas regiões não dependentes e em estratégias ventilatórias que podem estar associadas a hiperdistensão do parênquima pulmonar;
- em segundo lugar, essa resposta foi parcialmente atenuada pela ventilação em posição prona;
- em terceiro lugar, a lesão pulmonar pelo ácido oléico desencadeou um aumento nos marcadores inflamatórios que foi modificado de acordo com a estratégia ventilatória (notadamente no grupo de baixo V_T e alta PEEP) porém não predominou em nenhuma região pulmonar.

4.1 VM E ATIVAÇÃO DE GENES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Nossos achados estão em concordância com estudo prévio de DEHEINZELIN et al. (1997), que mostrou que a expressão de RNAm para PC I aumenta precocemente (cerca de 2 horas) em pacientes submetidos a VM e circulação extracorpórea para cirurgia cardíaca. A VM propositalmente lesiva com alto V_T também é capaz de induzir a expressão de RNAm para TGF- β_1 (IMANAKA et al. 2001), que é um fator de crescimento que promove a síntese de colágeno. Em um modelo experimental com pulmão *ex-vivo*, o aumento do stress exercido sobre a parede alveolar seja por aumento das pressões de insuflação, seja por aumento da pressão venosa por apenas 4 horas já foi acompanhado por um aumento da síntese de RNAm para PC I, PC III, PC IV e laminina (PARKER et al. 1997). Além disso, sabe-se que a distensão alveolar que ocorre no pulmão remanescente após uma pneumectomia causa uma resposta do tecido conectivo caracterizada por aumento da transcrição de colágeno (RANNELS 1989; ATS 2004). O conjunto destes achados sugere que a hiperdistensão devida a VM leva a uma resposta precoce da matriz extracelular.

4.2 INFLUÊNCIA DE REGIÃO E ESTRATÉGIA VENTILATÓRIA

Além disso, no nosso estudo a expressão de PC III foi influenciada pela região e pela estratégia ventilatória. A maior expressão de PC III aconteceu nas regiões não dependentes de HVLP-S e LVHP-S. No caso particular da LPA induzida por ácido oléico, as estratégias ventilatórias descritas acima, que são caracterizadas por uso de alto V_T ou alta PEEP, levam a altos volumes inspiratórios finais precisamente nas regiões não dependentes (MARTYNOWICZ et al. 2001), tornando-as mais susceptíveis ao stress mecânico, que por sua vez estimula a síntese de PC III.

4.3 PAPEL PROTETOR DA POSIÇÃO PRONA

Foram observados 3 níveis de expressão de PC III entre os grupos: um nível elevado nos grupos HVLP-S e LVHP-S, um nível intermediário nos grupos HVLP-P e OA e um nível baixo, basal, no grupo C. Chama a atenção o comportamento do grupo HVLP-P, ventilado em posição prona. Neste grupo houve uma diminuição do estímulo à sintese de RNAm para PC III quando comparado aos grupos de alto V_T ou alta PEEP (HVLP-S e LVHP-S, respectivamente), para uma mesma PpvA. De fato, o posicionamento em prona leva a um aumento na rigidez da caixa torácica (PELOSI et al. 1998) e a insuflação pulmonar fica mais homogênea do que na posição supina (GATTINONI et al. 2003; RICHTER et al. 2005), o que contribui para que a tensão mecânica aplicada sobre o parênquima pulmonar se distribua de forma mais homogênea. Poderia haver dúvidas sobre a validade de estender conceitos sobre gradiente de pressão pleural obtidos de estudos realizados em humanos e animais de médio porte (PELOSI et al. 1998; GATTINONI et al. 2003; RICHTER et al. 2005) para animais de pequeno porte como o rato. No NEGRINI MISEROCCHI (1989)demonstraram entanto, е inequivocamente que ratos têm pressões transpulmonares progressivamente mais negativas no topo (esterno) dos pulmões do que na base (vértebras). Soma-se a isso estudo que mostrou, por tomografia computadorizada, que a distribuição da insuflação pulmonar é mais homogênea em ratos na posição prona do que em posição supina (VALENZA et al. 2005). O conjunto destes dados sugere que a posição prona atenua a tensão sobre o parênquima

pulmonar gerada pela VM. Neste caso não haveria a hiperdistensão que ocorre nas regiões não dependentes na posição supina, evitando uma ativação excessiva da síntese de RNAm para PC III.

4.4 PADRÕES DE FIBROGÊNESE E INFLAMAÇÃO CONFORME A ESTRATÉGIA VENTILATÓRIA

Observamos um aumento moderado da expressão de RNAm para PC III no grupo OA (lesão pulmonar sem ventilação). Isso já era esperado, pois a toda injúria pulmonar segue-se uma resposta reparadora (KATZENSTEIN et al. 1976). Neste modelo de LPA notamos que a fibrogênese e a inflamação podem ambas ter início muito precoce, porém seu curso varia conforme a estratégia ventilatória. Notamos padrões distintos de fibrogênese e resposta inflamatória: no grupo de baixo volume e alta PEEP (LVHP-S) houve diminuição da resposta inflamatória e no grupo em posição prona (HVLP-P) houve diminuição da resposta fibrogênica.

4.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Do ponto de vista da resposta inflamatória tanto a expressão de RNAm para IL-1β quanto PMI, medida do infiltrado inflamatório tiveram comportamentos semelhantes nos grupos. Altos níveis de expressão/infiltração foram encontrados nos grupos OA, HVLP-P e HVLP-S. O grupo LVHP-S teve um grau intermediário de expressão/infiltração se

comparado aos grupos citados anteriormente. Devido ao desenho do estudo. observamos hipercapnia no grupo LVHP-S (mediana de PCO₂= 63,5 mmHg, com intervalo interguartil [56.1-67.8]) e hipocapnia nos grupos de alto V_T (no grupo HVLP-S a mediana de PCO₂ foi de 23.5 mmHg, com intervalo interquartil [17.0-26.4]; no grupo HVLP-P a mediana de PCO₂ foi de 23,5 mmHg, com intervalo de confiança [22.0-28.6]). A presença de hipo e de hipercapnia poderia afetar significativamente a resposta inflamatória neste estudo? Se por um lado o papel protetor da hipercapnia terapêutica vem sendo questionado (LANG et al. 2005), seus benefícios como consegüência de uma estratégia de VM foram claramente demonstrados em ensaios clínicos (HICKLING et al. 1990; AMATO et al. 1998). Por outro lado a hipocapnia contribui para o aumento da injúria pulmonar (LAFFEY et al. 2003). Mesmo que este último achado possa contribuir para nosso resultado final, ou seja, uma exacerbação da resposta inflamatória nos grupos ventilados com alto V_T, não devemos esquecer que o efeito protetor das estratégias de PEEP alta e baixo V_T já foram bem estabelecidos. Níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados tanto em estudos clínicos (RANIERI et al. 1999) como experimentais (HERRERA et al. 2003). Em contraposição a isso, foram descritos altos níveis de citocinas próinflamatórias (TREMBLAY et al. 1997) e grande expressão de RNAm para citocinas pró-inflamatórias (TREMBLAY et al. 2002) em animais ventilados com alto V_T. De forma bem interessante, neste estudo o efeito protetor foi detectado precocemente durante o curso da injúria pulmonar.

Não houve diferença regional na expressão de IL-1β e no índice PMI. Esses resultados estão em desacordo com dados publicados previamente, que demonstraram menor formação de edema e um escore histológico de lesão pulmonar também menor em um modelo canino de LPA induzida por ácido oléico e ventilado em posição prona (BROCCARD et al. 1997). No entanto, ocorreram diferenças metodológicas significativas entre os dois estudos e que podem explicar esta aparente discrepância. De fato, o uso de escores pode levar a um grande viés de subjetividade, o que não acontece com a morfometria, que é um método semi-quantitativo, portanto mais objetivo. Além disso, no estudo de BROCCARD et al. (1997) foram excluídas da avaliação as zonas de atelectasia, que foram levadas em consideração em nosso estudo, já que os campos para a contagem foram aleatoriamente selecionados.

and.

5 CONCLUSÃO

and

Em suma, a resposta de colágeno à injúria pulmonar seguida de VM num modelo de lesão pulmonar induzida por ácido oléico não segue paralelamente aos marcadores de inflamação. Nossos dados sugerem que, num pulmão lesado, a estratégia ventilatória pode não apenas alterar a resposta fibrogênica global, mas também induzir uma resposta regional diferenciada nos pulmões. Futuramente, durante o desenvolvimento de estratégias ventilatórias protetoras mais eficientes, todos os esforços devem ser feitos para evitar a hiperdistensão regional, dessa forma reduzindo o estímulo precoce para a fibrogênese.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Am J Pathol** 2002; 161:1783-96.

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med** 1998; 338:347-54.

[ATS] American Thoracic Society. *ad hoc* Statement Committee.Mechanisms and limits of induced postnatal lung growth. Am J Respir CritCare Med 2004; 170:319-43.

Ashbaugh DG, Uzawa T. Respiratory and hemodynamic changes after injection of free fatty acids. **J Surg Res** 1968; 8:417-23.

Beilman G. Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in the rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. **Lipids** 1995; 30:817-23.

4

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

Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Ravenscraft SA, Marini JJ. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med** 1997; 25:16-27.

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. **Nature** 1994; 368:419-24.

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

Chapman HA, Stahl M, Allen CL, Yee R, Fair DS. Regulation of the procoagulant activity within the bronchoalveolar compartment of normal human lung. **Am Rev Respir Dis** 1988; 137:1417-25.

Chapman HA. Disorders of lung matrix modeling. **J Clin Invest** 2004; 113:148-57.

Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury: pathogenetic and prognostic significance. **Am J Respir Crit Care Med** 1997; 156:840-45

Chilosi M, Poletti V, Zamo A, et al. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Pathol** 2003; 162:1495-502.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method roy RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. **Anal Biochem** 1987; 162:156-7.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81:1991-5.

Clark JG, Milberg JA, Steinberg KP, Hudson LD. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome: association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. **Ann Intern Med** 1995; 122:7-3

Deheinzelin D, Jatene FB, Saldiva PH, Brentani RR. Upregulation of collagen messenger RNA expression occurs immediately after lung damage. **Chest** 1997; 12:1184-8.

Derks DM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. **Am J Pathol** 1977; 87:143-58.

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

Dickey BF, Thrall RS, McCormick JR, Ward PA. Failure of indomethacin treatment or complement ablation to ablate lung injury. **Am J Pathol** 1981; 103:376-83.

Ebihara T, Venkatesan N, Tanaka R, Ludwig MS. Changes in extracellular matrix and viscoelasticity in bleomicin-induced fibrosis. Temporal aspects. **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 162:1569-76.

Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, et al. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. **J Appl Physiol** 2005; 98:53-61.

Garcia CSNB, Rocco PRM, Facchinetti LD, et al. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? **Respir Physiol Neurobiol** 2004; 144:59-70.

Gattinoni L, Carlesso E, Cadringher P, Valenza F, Vagginelli F, Chiumello D. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. **Eur Respir J Suppl** 2003; 47:15s-25s.

Gemer M, Dunegan LJ, Lehr JL, et al. Pulmonary insufficiency induced by oleic acid in the sheep. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1975; 69:793-9.

Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. **Exp Lung Res** 1995; 21:791-808.

Hedenstierna G, Rothen HU. Atelectasis formation during anesthesia: causes and measures to prevent it. **J Clin Monit Comput** 2000; 16:329-35.

Heffner JE, Brown LK, Barbieri CA, Harpel KS, DeLeo J. Prospective validation of an acute respiratory distress syndrome predictive score. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; 152:1518-26.

Hernandez LA, Coker PJ, May S, Thompson AL, Parker JC. Mechanical ventilation increases microvascular permeability in oleic injured lungs. **J Appl Physiol** 1990; 69:2057-61.

Herrera MT, Toledo C, Valladares F, Muros M, Diaz-Flores L, Flores C, Villar J. Positive end-expiratory pressure modulates local and systemic inflammatory responses in a sepsis-induced lung injury model. **Intensive Care Med** 2003; 29:1345-53.

Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med** 1990; 16:372–7.

Hoffman WF, Ehrhart IC, Granger WM, Miller DA. Sequential cardiopulmonary changes after oleic-acid injury in dogs. **Crit Care Med** 1985; 13:22-7.

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

Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, Nishimura M, Ohta N, Kiyono H. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. **Anesth Analg** 2001; 92:428-36.

Julien M, Hoeffel JM, Flick MR. Oleic acid lung injury in sheep. **J Appl Physiol** 1986; 60:433-40. Katzenstein A, Bloor C, Liebow A. Diffuse alveolar damage. The role of oxygen, shock and related factors. **Am J Pathol** 1976; 85:210-28.

Koh DW, Roby JD, Starcher B, Senior RM, Pierce RA. Postpneumonectomy lung growth: a model of reinitiation of tropoelastin and type I collagen production in a normal pattern in adult rat lung. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1996; 15:611-23.

Krupsky M, Kuang PP, Goldstein RH. Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts. **J Biol Chem** 1997; 272:13864-8.

Kuhn C 3rd, Boldt J, King TE, Jr, Crouch E, Vartio T, McDonald JA. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissuesynthesis in pulmonary fibrosis. **Am Rev Respir Dis** 1989; 140:1693-703.

Laffey JG, Engelberts D, Duggan M, Veldhuizen R, Lewis JF, Kavanagh BP. Carbon dioxide attenuates pulmonary impairment resulting from hyperventilation. **Crit Care Med** 2003; 31:2634-40.

Lang JD, Figueroa M, Sanders KD, et al. Hypercapnia via reduced rate and tidal volume contributes to lipopolysaccharide-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 171:147-57.

Marshall RP, Bellingan G, Webb S, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 162:1783-8

Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. **Chest** 1995; 107:196-200.

Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. **Crit Care Med** 2003; 31:S184-S188.

Martynowicz MA, Walters BJ, Hubmayr RD. Mechanisms of recruitment in oleic acid-injured lungs. **J Appl Physiol** 2001; 90:1744-53.

Meduri GU, Eltorky M, Winer-Muram HT. The fibroproliferative phase of late adult respiratory distress syndrome. **Semin Respir Infect** 1995; 3:154-75.

Meduri GU, Tolley EA, Chinn A, et al. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 158:1432-41.

Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in the patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1985; 132:485-9.

Negri EM, Hoelz C, Barbas CS et al. Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen-elastic system fibers. **Pathol Res Pract**. 2002; 198:355-61.

Negrini D, Miserocchi G. Size-related differences in parietal extrapleural and pleural liquid pressure distribution. **J Appl Physiol** 1989; 67:1967-72.

Parker JC, Breen EC, West JB. High vascular and airway pressures increase interstitial protein mRNA expression in isolated rat lungs. **J Appl Physiol** 1997; 83:1697-705.

Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, et al. Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during Acute Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157:387-93.

Phan SH, McGarry BM, Loeffler KM, Kunkel SL. Binding of leukotriene C4 to rat lung fibroblasts and stimulation of collagen synthesis in vitro. **Biochemistry** 1988; 27:2846-53.

Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, et al. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. **J Clin Invest** 2001; 107:1537-44.

Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. **Am J Respir Crit Care Med** 1996; 153:1850-6

Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med** 1999; 27:304-12.

Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. **Crit Care Med** 2003; 31:S200-S206.

Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndromea randomized controlled trial. **JAMA** 1999; 282:54-61.

Rannels DE. Role of physical forces in compensatory growth of the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 1989; 257:L179-L89.

Ribeiro SP, Kunuk R, Tremblay L, Veldhuizen R, Lewis JF, Slutsky AS. Heat stress attenuates ventilator-induced lung dysfunction in an *ex-vivo* rat lung model. **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 163:1451-6.

Richter T, Bellani G, Harris RS, Vidal Melo MF, Winkler T, Venegas JG, Musch G. Effect of prone position on regional shunt, aeration and perfusion in experimental acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; published ahead of print on May 18, 2005 as doi:10.1164/rccm.200501-004OC. No prelo.

Ricupero DA, Poliks CF, Rishikof DC, et al. Phosphatidylinositol 3-kinasedependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts. Am **J Physiol Cell Physiol** 2001;281:C99-C105.

Rosas R, Albertini R, Croxatto HR. Renal kallikrein system, volemia, and renal hypertension. **Mayo Clin Proc** 1977; 52:459-61.

Ruiz-Bailen M, Fernandez-Mondejar E, Hurtado-Ruiz B, et al. Immediate application of positive-end expiratory pressure is more effective than delayed positive-end expiratory pressure to reduce extravascular lung water. **Crit Care Med** 1999; 27:380-384.

Schuster DP. ARDS: Clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 1994; 149:245-60.

Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:624-32.

Sisson TH, Hanson KE, Subbotina N, Patwardhan A, Hattori N, Simon RH. Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortalityafter lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2002; 283:L1023-L32.

Smith G, Winter PM, Wheelis RF. Increased normobaric oxygen tolerance of rabbits following oleic acid-induced lung damage. **J Appl Physiol** 1973; 35:395-400.

Stüber F, Wrigge H, Schroeder S, et al. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. **Intensive Care Med** 2002; 28:834-41.

Tomashefski JF, Jr. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med** 1990; 11:593-619.

Tomashefski JF, Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med** 2000; 21:435-66.

Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slustky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and *c-fos* m-RNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest** 1997; 99:944-52.

Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. **Crit Care Med** 2002; 30:1693-700.

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. **Circ Res** 2001; 88:1080-7.

Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. Chest 2002; 122:293S-8S.

Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, et al. Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: does lung strain distribution plays a role? **Crit Care Med** 2005; 33:361-7.

Van Hoozen BE, Grimmer KL, Marelich GP, Armstrong LC, Last JA. Early phase collagen synthesis in lungs of rats exposed to bleomycin. **Toxicology** 2000; 147:1-13.

Warburton D, Tefft D, Mailleux A, et al. Do lung remodeling, repair, and regeneration recapitulate respiratory ontogeny? **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 164:S59-S62.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest 1963; 12:131-55.

Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. J Immunol 2000; 164:6174-9.

Zapol WM, Trelstad RL, Coffey JW, Tsai I, Salvador RA. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. **Am Rev Respir Dis** 1979; 119:547-54.

Zhang LF, Han LP, Wu XY, Zhang R, Sun XQ, Li XY. Estimation of respiratory mechanics in dogs with acute lung injury. **Adv Exp Med Biol** 1992; 316:327-40.

Zhou Z, Kozlowski J, Schuster DP. Physiologic, biochemical, and imaging characterization of acute lung injury in mice. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 172:344-51.

Zuo F, Kaminski N, Eugui E, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:6292-7.

Anexo A

Tabela - Gases arteriais dos grupos ventilados e de OA. Os resultados estão expressos como mediana (median) e intervalo interquartil (25-75).

	LVHP-S	HVLP-S	HVLP-P	OA
	n = 10	n = 9	n = 10	n = 9
	median/ 25-75	median/ 25-75	median/ 25-75	median/ 25-75
pH inicial	7.207	7.51	7.470	7.354
	7.196-7.218	7.477-7.533	7.40-7.525	7.332-7.357
pH final	7.053	7.508	7.503	
	7.051-7.095	7.456-7.545	7.467-7.542	
PCO ₂ inicial	63.5	23.5	23.5	44.4
(mmHg)	56.1-67.8	17.0-26.4	22.0-28.6	44.3-46.2
PCO ₂ final	70.7	11.9	14.1	
(mmHg)	64.2-90.1	11.5-13.1	12.0-17.3	
PO ₂ inicial	161.2	168.8	130.0	59.2
(mmHg)	121.3-179.7	142.5-184.6	114.1-171.1	50.6-65.1
PO ₂ final	178.9	177.0	158.4	
(mmHg)	169.6-193.9	131-8-226.4	115.3-188.0	