Eliane Muta Yoshioka

**Alterações pulmonares e sistêmicas em modelo de
lesão pulmonar aguda de etiologia pulmonar e extra
pulmonar após ventilação mecânica de curto prazo**

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

Programa de: Patologia

Orientador: Prof. Dra. Elnara Marcia 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

Yoshioka, Eliane Muta

Alterações pulmonares e sistêmicas em modelo de lesão pulmonar aguda de etiologia pulmonar e extra pulmonar após ventilação mecânica de curto prazo / Eliane Muta Yoshioka. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Elnara Marcia Negri.

Descritores: 1.Lesão pulmonar aguda/fisiopatologia 2.Ventilação mecânica 3.Respiração com pressão positiva 4.Camundongos

USP/FM/DBD-191/10

Dedicatória

Aos meus pais por me guiarem até aqui.

Agradecimento especial

A Dra. Elnara, ou simplesmente Nara, que me deu duas oportunidades: compartilharmos plantões e ser sua orientanda.

Agradecimentos

Fazer uma tese é um desafio; a gente aprende sobre o tema e trabalhar em equipe.

Optei por agradecer o conjunto e não nominalmente pois todos foram responsáveis pela conclusão desta tese. Então agradeço:

Os pesquisadores dos LIM :20,51,59.

As funcionárias da secretaria do departamento da patologia.

Funcionários do biotério do LIM 20 que cuidaram e alimentaram meus animais.

Funcionários do departamento de transporte que juntamente com o pessoal do biotério foram os responsáveis pela retirada dos animais em Campinas.

As bibliotecárias da FMUSP e do Hospital AC Camargo.

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

Referências: adaptado de *Internacional 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. 2ª 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

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Summary.....	xiii
1	INTRODUÇÃO..... 1
1.1	Considerações gerais..... 2
1.2	Epidemiologia..... 3
1.3	Fisiopatologia..... 4
1.4	Modelos animais..... 9
1.5	LPS..... 10
1.6	Ventilação mecânica..... 10
1.7	LPA e lesão renal..... 12
2	OBJETIVO..... 15
3	MATERIAL E MÉTODO..... 17
3.1	Protocolo de sensibilização..... 18
3.2	Mecânica ventilatória..... 20
3.3	Avaliação morfométrica..... 23
3.4	Microscopia eletrônica..... 24
3.5	Estresse oxidativo..... 24
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 26
5	RESULTADOS..... 28
5.1	Mecânica do sistema respiratório..... 29
5.2	Resposta inflamatória do parênquima pulmonar..... 30
5.3	Análise quantitativa..... 32

5.4	Microscopia eletrônica.....	33
5.5	Estresse oxidativo no rim.....	36
6	DISCUSSÃO.....	37
6.1	Mecânica do sistema respiratório.....	38
6.2	Inflamação do parênquima pulmonar.....	40
6.3	Extresse oxidativo renal.....	41
7	CONCLUSÃO.....	44
8	ANEXOS	
Anexo 1	Aprovação de Comissão de Ética para análise de Pesquisa (CAPPesq).....	46
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo celular da LPA.....	7
Figura 2	Grupo de animais.....	19
Figura 3	Protocolo de ventilação mecânica sem pressurização.....	21
Figura 4	Protocolo de ventilação mecânica com pressurização.....	22
Figura 5	Fotografia do equipamento.....	22
Figura 6	Fotografia em detalhe da coluna de água para pressurização.....	23
Figura 7	Imagem do retículo.....	24
Figura 8	Fotomicrografia de pulmão do grupo controle extra pulmonar não ventilado.....	30
Figura 9	Fotomicrografia de pulmão do grupo LPA pulm após ventilação e pressurização.....	30
Figura 10	Fotomicrografia de pulmões dos animais LPA exp e LPA pulm após ventilação e pressurização.....	31
Figura 11	Fotomicrografia eletrônica do grupo LPA exp.....	34
Figura 12	Fotomicrografia eletrônica do grupo LPA pulm.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação da elastância do sistema respiratório.....	29
Tabela 2	Células inflamatórias no parênquima pulmonar.....	32
Tabela 3	Estresse oxidativo no rim em todos os grupos submetidos a ventilação mecânica.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

C_{Exp}	controle extra pulmonar
C_P	controle pulmonar
LPA_{Exp}	Lesão Pulmonar Aguda Extra pulmonar
LPA_P	Lesão Pulmonar Aguda Pulmonar
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
PEEP	Pressão expiratória positiva final
PO₂/FiO₂	Relação pressão parcial de oxigênio em relação à fração inspirada de oxigênio
SAL	Salina
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SMP	Simple Manobra de Pressurização
VM	Ventilação Mecânica

RESUMO

Yoshioka EM. *Alterações pulmonares e sistêmicas em modelo de Lesão pulmonar aguda de etiologia pulmonar e extra pulmonar após ventilação mecânica de curto prazo. [Tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 53p.

A inflamação pulmonar pode variar de acordo com o sítio primário da injúria e poder ser afetado pelo estresse mecânico gerado pela ventilação mecânica. (VM) Objetivos: estudar as eventuais diferenças na resposta pulmonar e sistêmica na lesão pulmonar aguda pulmonar (LPA_P) e extra pulmonar (LPA_{Exp}) após ventilação mecânica. **Métodos:** Camundongos BALB/c foram divididos em doze grupos. Os grupos controle pulmonar (C_P) e extra pulmonar (C_{Exp}) receberam solução salina (SAL) ou Lipopolissacarídeo (LPS) via intratraqueal (IT) ou intraperitoneal (IP) respectivamente. Os grupos foram submetidos ou não a simples manobra de pressurização (SMP) até 45 cm H₂O. **Resultados:** Os grupos LPA_P e LPA_{Exp} não ventilados apresentaram o mesmo nível de inflamação; uma diferença estatisticamente significativa na densidade de células inflamatórias foi observada no grupo LPA_P VM (3,84±1,28 cels/μ²) comparado ao grupo LPA_{Exp} VM ((1,75±0,14 cels/μ²), p=0,013. O mesmo foi observado na LPA_P SMP (2,92±0,44 cels/μ²) comparado ao LPA_{Exp} SMP (1,46±0,23 cels/μ²), p<0,0001. LPA_P mostrou estatisticamente significativo aumento no ΔEI (56,19 ± 12,26 cm H₂O) em comparação ao LPA_{Exp} SMP (26,88 ± 36,38 cm H₂O) após SMP (p = 0,029). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada no estresse oxidativo no rim. **Conclusão:** Observamos um padrão diferente da resposta inflamatória e mecânica pulmonar comparando LPA pulmonar e extra-pulmonar submetido à ventilação mecânica de curto prazo. Embora a ventilação mecânica represente uma ferramenta essencial para estabilizar o paciente crítico, é necessário individualizar a abordagem do tratamento ventilatório.

Descritores: lesão pulmonar aguda, fisiopatologia, ventilação mecânica, respiração com pressão positiva, camundongos.

SUMMARY

Yoshioka EM. *Pulmonary and Extra pulmonary ALI: local and systemic pathophysiological differences after short term mechanical ventilation*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 53p.

Lung inflammation may vary according to the primary site of injury and may be affected by the mechanical stress generated by mechanical ventilation (MV). **Objectives:** to address possible differences in lung and systemic responses in pulmonary and extra pulmonary ALI after mechanical ventilation. **Methods:** BALB/c mice were divided in twelve groups of six animals. In pulmonary and extrapulmonary control or ALI groups received either saline or LPS (intratracheally instilled or intraperitoneally injected), respectively. Ventilated groups were either recruited or not with a single recruitment maneuver (SRM) reaching 45 cm H₂O. **Results:** At baseline ALI P and ALI EXP non ventilated groups presented the same level of inflammation; a statistically significant difference in density of inflammatory cells was noted in ALI P MV ($3,84 \pm 1,28$ cells/ μ^2) compared to ALI EXP MV ($1,75 \pm 0,14$ cells/ μ^2), $p=0,013$. The same was observed in ALI P SRM ($2,92 \pm 0,44$ cells/ μ^2) compared to ALI EXP SRM ($1,46 \pm 0,23$ cells/ μ^2) ventilated groups ($p<0,0001$). ALI P showed a statistically significant increase in ΔEI ($56,19 \pm 12,26$ cm H₂O) in comparison to ALI EXP ($26,88 \pm 36,38$ cm H₂O) after SRM ($p = 0,029$). No statistical differences were observed in kidney oxidative stress. **Conclusion:** We observed a different pattern of response in lung inflammation and mechanics comparing pulmonary and extra pulmonary ALI, submitted to short term mechanical ventilation. Although mechanical ventilation represents a fundamental tool to stabilize critical patients, it is essential to individualize the approach of the ventilatory treatment.

Descriptors: Acute Lung Injury/ Pathophysiology; positive pressure breathing; mice

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A primeira descrição científica de edema pulmonar de origem não cardíaca data de 1821 quando Laennec descreveu essa patologia no livro “A Treatise on Diseases of the Chest” e o classificou como anasarca idiopática dos pulmões ⁴.

Foi apenas em 1967 quando Ashbaugh, Bigelow et cols descreveram uma patologia clínica conhecida como “acute respiratory distress in adults” que pela primeira vez mostrou-se que esta patologia tinha características próprias podendo ser desencadeada por uma ampla gama de insultos como aspiração do conteúdo gástrico, sepse, trauma, quase afogamento, etc. Os primeiros pacientes descritos apresentavam infiltrado pulmonar difuso bilateral e necessitavam de ventilação mecânica com altos níveis pressóricos ⁴.

Em 1992 o Consenso Americano-Europeu desenvolveu e padronizou uma definição para a Síndrome do Desconforto Respiratório. Este comitê recomendou que um novo termo, a lesão pulmonar aguda (LPA) fosse introduzida e definida como uma síndrome de inflamação, aumento da permeabilidade associado a uma ampla anormalidade clínica radiológica e fisiológica que não pode ser explicado, mas pode coexistir com hipertensão pulmonar e está associado frequentemente com sepse, aspiração,

pneumonia primária ou politrauma e menos comumente com politransfusão, embolia gordurosa, pancreatite e outros. Também foi designado o termo Agudo e não mais adulto para a síndrome do desconforto respiratório (SDRA) para pacientes com LPA com piora da oxigenação. A LPA e SDRA são de início agudo e persistente, associado com um ou mais fatores de risco conhecidos e são caracterizados por hipoxemia arterial refratária a oxigenoterapia e infiltrado alveolar difuso ³. A única diferença entre as duas situações é o grau de oxigenação; enquanto na LPA a relação PO_2/FiO_2 é menor que 300, na SDRA esta relação é menor que 200 ³.

1.2 Epidemiologia

Vários estudos mostram que a mortalidade da LPA/SDRA vem diminuindo. Rubenfeld et cols analisaram pacientes acima de 15 anos de idade em 21 hospitais americanos no período de 1999 a 2000 e concluíram que a incidência da LPA era de 86,2 por 100 mil pessoa-ano; a mortalidade hospitalar foi de 38% e a idade estava estatisticamente relacionada com o índice de mortalidade ³⁴. Já o estudo retrospectivo de Erickson et cols selecionou pacientes elegíveis para LPA e que necessitaram de ventilação mecânica no período de 1996 a 2005. Este estudo mostrou que no período de 1996-1997 a mortalidade foi de 35% e caiu para 26% nos anos de 2004-2005. Vale ressaltar que foram excluídos pacientes com insuficiência renal e que necessitaram de tratamento dialítico ⁷.

Em termos nacionais, destaca-se o trabalho de Fialkow e cols.⁸ que estudaram prospectivamente pacientes com LPA/SDRA, segundo critérios do Consenso Americano-Europeu, no período de 1999 a 2000. A mortalidade para LPA foi de 44% e SDRA 46,7%; a mortalidade hospitalar para pacientes com LPA foi 48% e 46,7% para SDRA os que não tinham LPA; a mortalidade hospitalar foi de 26, 5%.

A grande maioria dos estudos aponta queda na mortalidade dos pacientes com LPA/SDRA possivelmente pela melhoria no entendimento da patologia e medidas de suporte como a ventilação mecânica.

1.3 Fisiopatologia

A lesão pulmonar aguda (LPA) é o termo usado para descrever a resposta pulmonar a injúria que ocorre diretamente nos pulmões ou como consequência da lesão ou inflamação em outros locais do organismo. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) representa o evento final mais grave do espectro desta condição no qual é amplo o processo inflamatório nos pulmões e que geralmente é acompanhada por uma agressiva fibrose².

Pacientes com lesão pulmonar aguda (LPA) ou síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são influenciados por diversos fatores. Um dos mais importantes mecanismos que determinam a gravidade da lesão pulmonar é a magnitude da lesão à barreira epitélio alveolar. A possibilidade de reparo da lesão epitelial no estágio inicial é o maior

determinante da recuperação ⁴¹. Tratamentos específicos para acelerar o reparo epitelial não existem. A maioria das modalidades de tratamentos testados recentemente é baseada na diminuição da resposta inflamatória dos pulmões no sentido de minimizar a lesão inicial ⁹.

No aspecto pulmonar, dois componentes distintos constituem a barreira alvéolo capilar: o endotélio microvascular e o epitélio alveolar. Para a normalidade da função pulmonar, há necessidade de alvéolos intimamente associados a capilares adequadamente perfundidos. O capilar pulmonar normal apresenta endotélio seletivamente permeável, onde as proteínas permanecem no intravascular, enquanto os fluídos atravessam as membranas como resultado do balanço entre as forças hidrostáticas e gradientes oncóticos. O equilíbrio entre essas forças permite, habitualmente, que pequenas quantidades de proteínas extravasem para o espaço intersticial pulmonar. Porém existem três mecanismos para impedir a formação de edema intersticial: proteínas intravasculares mantêm gradiente osmótico favorável à reabsorção de líquido; os linfáticos intersticiais podem drenar grande quantidade de líquido para a circulação, junções intercelulares firmes, entre as células epiteliais alveolares, previnem o enchimento dos espaços aéreos ^{38, 41}.

Os pulmões são particularmente vulneráveis a lesões inflamatórias, porque os mediadores são liberados na circulação e os pulmões recebem a totalidade do débito cardíaco. Como consequência, os neutrófilos são atraídos, tornam-se ativados liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesam diretamente o epitélio alveolar e o

endotélio vascular, propagando o processo inflamatório. Desse modo, as barreiras habitualmente responsáveis por impedir o edema alveolar são perdidas, havendo escape de proteínas do espaço intravascular em direção ao espaço intersticial, edema intersticial e alveolar. O influxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos altera a integridade do surfactante pulmonar, com lesão adicional ao tecido pulmonar e colapso alveolar ^{38,41}. Como consequência da agressão pulmonar, da instalação de edema e de microatelectasias, inúmeras alterações fisiopatológicas se estabelecem ^{38,41}. Esquema da fisiopatologia da LPA/SDRA pode ser visto na Figura 1.

Fonte: Minamino e Komuro²³

Figura 1. Mecanismo celular da LPA.

Tradicionalmente tem se dividido a SDRA como direta ou indireta dependente do tipo de insulto inicial. No estágio inicial o insulto direto ou indireto tem características distintas²⁷.

1.3.1 Insulto direto

O insulto direto tem sido estudado em modelos experimentais usando instilação intratraqueal de endotoxina, complemento ou fator de necrose tumoral. Após o insulto direto a estrutura primariamente lesada é o epitélio pulmonar. A lesão do epitélio alveolar ocasiona ativação do macrófago alveolar e uma cascata de inflamação dá início então a inflamação intrapulmonar. A prevalência de dano epitelial determina a localização da anormalidade patológica no espaço intra-alveolar, com alvéolo edemaciado, presença de fibrina, colágeno, agregado neutrofílico, sangue e freqüentemente é descrito como consolidação pulmonar^{22,27}.

1.3.2 Insulto indireto

Já o insulto indireto tem sido estudado em modelos experimentais através da administração intraperitoneal ou intravenosa de toxinas. Após o insulto indireto, a lesão pulmonar ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios do local inicialmente lesionado (extra pulmonar) para a circulação sistêmica. Neste caso, o primeiro alvo do dano é a célula endotelial vascular pulmonar com aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de monócitos, leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e outras células. Alteração devido o insulto indireto é patologicamente caracterizado pela congestão microvascular e edema intersticial^{22,27}.

Hoelz et al.¹² compararam tecido pulmonar em autópsia de indivíduos com SDRA e verificaram que existem diferenças segundo a etiologia. Eles

observaram que na SDRA pulmonar havia o predomínio de colapso alveolar, exsudato fibrotico e edema da parede alveolar.

Podem levar a LPA/SDRA direta os seguintes casos: pneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, contusão pulmonar, embolia gordurosa, quase afogamento, inalação de agentes tóxicos, edema pulmonar de repetição após transplante de pulmão ou embolectomia pulmonar ⁴¹. Enquanto a sepsis, trauma grave com choque e politransusão, bypass cardiopulmonar, overdose de drogas, pancreatite aguda e hemotransusão podem evoluir para LPA/SDRA indireta ⁴¹.

1.4 Modelos animais

Modelos animais são importantes porque fornecem uma ponte entre o paciente e a bancada do laboratório. Hipóteses geradas em estudos humanos podem ser testadas diretamente em modelos animais e os resultados in vitro podem ser testados em modelos animais in vivo para avaliar sua relevância ²⁰.

Modelos animais de LPA podem reproduzir os mecanismos e consequências da lesão pulmonar em humanos, incluindo mudanças fisiológicas e patológicas que ocorrem. Devido à resposta dos pulmões a injúria mudarem com o tempo, a evolução e o reparo também podem ser reproduzidos no modelo, ainda que seja em um curto período de tempo.

Nos últimos anos a reprodução de modelos de LPA tem se utilizado a administração de LPS ²⁰.

1.5 LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípídeo presente na membrana externa de bactérias gram-negativa que é composto de uma bicamada lipídica (lipídeo A) e uma cadeia de dissacarídeo. A maioria dos efeitos do LPS é reproduzida pelo lipídeo A. A administração intratraqueal de LPS é acompanhada por um aumento de polimorfonucleares no espaço aéreo. O LPS é utilizado como modelo para estudar os efeitos da bactéria gram negativa tanto em animais quanto em humanos. O LPS é facilmente administrado e os resultados tendem ser reproduzidos em experimentos. LPS é um potente ativador da resposta inata imune via receptor Toll like 4 (TRL4) e tem pouca toxicidade direta às células in vitro. O uso de LPS fornece informações sobre os efeitos da resposta inflamatória no hospedeiro, que sofre com a infecção bacteriana ²⁰.

LPS já foi administrado via intravenosa e intratraqueal em humanos que teve como resultados inflamação sistêmica ^{13,31}.

A utilização de LPS pode evoluir para LPA e necessitar de suporte ventilatório devido à falência respiratória, uma das características importantes desta patologia.

1.6 Ventilação Mecânica

A LPA /SDRA é uma condição clínica caracterizada pela falência respiratória aguda, dano alveolar difuso, diminuição da complacência do

sistema respiratório levando ao comprometimento da ventilação/perfusão e conseqüentemente hipoxemia e hipercapnia. Embora a ventilação mecânica forneça suporte essencial para a vida pode causar lesão pulmonar. Normalmente regiões pulmonares aeradas são relativamente pequenas pela presença de atelectasia, estão edemaciado o que prejudica a troca gasosa e o volume pulmonar. Regiões pulmonares normais quando recebem a maior parte do volume corrente são expostos à tensão da parede alveolar e o estresse excessivo causando a hiperdistensão. A lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIVM) é causada por estresse excessivo ou tensão do tecido pulmonar que ocorre durante a ventilação mecânica e agrava a inflamação e provoca dano alveolar difuso. Estratégia de ventilação protetora inclui a ventilação com baixo volume corrente e pressão da via aérea limitada para reduzir a LPIVM permitindo a hipercapnia e moderada a elevada pressão expiratória final (PEEP) para manter os alvéolos abertos durante todo o ciclo ventilatório ^{19, 32,39}.

Amato et al no estudo randomizado com pacientes com SDRA concluíram que o grupo com ventilação de baixo volume corrente com uso de pressão controlada e peep acima de 20 mostrou maior taxa de desmame da VM, melhor sobrevida dos pacientes em 28 dias quando comparada com grupo ventilado de modo convencional (12 ml/kg e peep mais baixo para manter níveis de CO₂ entre 35-38 mmHg) ¹.

O estudo do ARDSNet em 2000 mostrou que VT com 6 ml/kg do peso predito em pacientes com LPA mostrou uma diminuição da mortalidade

hospitalar e menor número de dias de ventilação quando comparado com o grupo que ventilou com 12 ml/kg de peso ³⁶.

1.7 LPA e lesão renal

Estratégias ventilatórias inadequadas promovem estresse mecânico que desajusta o equilíbrio pulmonar desencadeando a lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV); a resposta inflamatória desencadeada pode não se limitar ao pulmão levando a um processo sistêmico de falência orgânica ^{11,36}. As consequências da hiperdistensão pulmonar incluem dano físico-direto com rompimento do epitélio alveolar, endotélio capilar, indução da resposta inflamatória com a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem evoluir para injúria renal e falência de outros órgãos em pacientes com SDRA ¹⁹. A ventilação mecânica pode afetar a função e perfusão renal em indivíduos saudáveis. O aumento da pressão intratorácica associado à ventilação com pressão positiva diminui o retorno venoso para o coração, o que pode resultar na diminuição do débito cardíaco. Isso pode levar a hipotensão e choque responsivo a volume, o que é comum nos casos de pós intubação quando a ventilação mecânica é iniciada. O aumento da pressão intratorácica está correlacionado com a diminuição do fluxo renal e da taxa de filtração glomerular ¹⁵.

A ventilação mecânica comprime as estruturas do mediastino e vasculatura pulmonar resultando no aumento da pós-carga levando a uma diminuição do débito cardíaco e perfusão renal independentemente dos

efeitos sobre o retorno venoso. O aumento da pressão intratorácica como nos caso de pulmões rígidos como na LPA/SDRA age diminuindo o fluxo sanguíneo renal, aumentando a pressão venosa renal comprimindo a vasculatura renal levando a lesão renal aguda ¹⁵.

Nos últimos anos surgiram novas informações sobre terapêuticas da LPA/SDRA, entretanto, até o momento não existe nenhuma terapêutica medicamentosa realmente efetiva. Esta escassez de terapias eficazes para LPA/SDRA deve-se principalmente à complexa resposta inflamatória, multifatorial e multicêntrica que se instala nestes pacientes, tornando virtualmente impossível a existência de um tratamento unificado. Sendo assim, resta-nos aplicar com o máximo de cautela as estratégias disponíveis de ventilação mecânica. O parênquima pulmonar distal representa um tecido contínuo, onde epitélio, endotélio e interstício dispõem-se de maneira harmoniosa e totalmente interligada. Qualquer dano a um desses integrantes repercutirá em destruição deste equilíbrio e disfunção da membrana alvéolo capilar com conseqüente impacto nas trocas gasosas e nas propriedades mecânicas do órgão. A SDRA ocorre como resposta a agressões de naturezas variadas, envolvendo todos os componentes da matriz extracelular, bem como o epitélio e o endotélio alveolares. O tratamento ventilatório, embora seja essencial para o paciente com insuficiência respiratória, deve ser aplicado com cautela para minimizar sua interferência negativa na história natural da doença e evitar o desencadeamento de uma cascata de eventos pró-fibróticos que levam a uma evolução desfavorável dos processos de reparo pulmonar.

Justificamos o presente estudo como uma tentativa de melhor entendimento das respostas pulmonar e sistêmica na LPA de etiologia pulmonar e extra-pulmonar, frente à ventilação mecânica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Estudar as possíveis diferenças na resposta inflamatória pulmonar em dois modelos de LPA: de etiologia pulmonar e extra pulmonar, após ventilação mecânica de curto prazo e recrutamento alveolar.
2. Analisar as repercussões sistêmicas em dois modelos de LPA: de etiologia pulmonar e extra pulmonar, após ventilação mecânica de curto prazo e recrutamento alveolar, tomando como base as alterações de estresse oxidativo renal.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

Foram utilizados camundongos machos, com idade de 6-8 semanas, peso de 21-25 g, da linhagem BALB/C provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em animais de laboratório (CEMIB) da UNICAMP.

Os animais passaram uma semana no biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM – 20), da Faculdade de Medicina da USP a fim de se adaptarem novo ambiente e lá permaneceram até o final do experimento. Durante todo o período receberam cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidado e uso de animais de laboratório” (NIH publication 85-23, revisado em 1984).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo n °041/10).

3.1 Protocolo de sensibilização

Os animais foram divididos em doze grupos de seis animais cada (Figura 2). O protocolo de sensibilização para LPA utilizado foi o de Menezes et cols ²¹. O grupo pulmonar recebeu instilação intratraqueal (IT) e o extra pulmonar, solução via intraperitoneal (IP). Nos grupos controle pulmonar e extra pulmonar (C_p e C_{exp} respectivamente) solução salina (NaCl 0,9%) foi administrada (0,05 ml via IT- e 0,5 ml IP respectivamente). Os animais do

grupo LPA pulmonar e extra pulmonar receberam LPS (E.coli, 055: B5 {Sigma ®} na concentração de 10 µg em 0,05 ml IT de salina e 125 µg em 0,05 ml -IP- de salina respectivamente).

Para a instilação intra traqueal, os animais foram inicialmente sedados com 0,04 ml intramuscular da solução de quetamina (0,4 ml) + xilazina (0,1ml). Posteriormente realizou-se em cada animal uma pequena incisão na região cervical a fim de expor a traquéia para a instilação de salina ou LPS. No final do procedimento, a região cervical foi suturada com fio de sutura (fio mononylon 5-). Os animais foram colocados novamente em gaiolas separadas até o dia seguinte.

Figura 2. Grupos de animais, onde NVM= não ventilação mecânica; VM ventilação mecânica e SMP=simples manobra de pressurização.

Os animais que receberam LPS via IT foram então chamados de LPA pulmonar (LPA_p); os que receberam esta substância por via IP foram denominados LPA extra pulmonar (LPA_{Exp}).

Já o grupo salina foi chamado Controle pulmonar (C_p) quando receberam salina IT e Controle Extra pulmonar (C_{Exp}) se receberam via IP

3.2 Mecânica Ventilatória

Vinte e quatro horas após a sensibilização os animais foram anestesiados via IP com 60 mg/kg de ketamina e 12 mg/kg de xylazina. A seguir foram randomizados em dois grupos: VM ou SMP.

Os animais do grupo VM foram traqueostomizados e colocados no ventilador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada – Fotos 1 e 2), com os seguintes parâmetros: V_T 6ml/kg, FiO_2 30%, peep 5, frequência 90 rpm. Os animais receberam 20 mg/kg via IP de thiopental® e 1mg/kg de brometo de pancurônio via IP, após 20 minutos de ventilação com os parâmetro descritos acima, foram obtidas medidas de mecânica do sistema respiratório (Figura 3).

Os animais do grupo SMP, foram submetidos à pressurização pulmonar com valores de PEEP progressivos, aumentados a cada 1 minuto nos valores de: 10, 15, 20, 30, 45, seguidos de uma redução para 30 e 15 cm H₂O por um minuto cada. Ao retornar da pressurização (tentativa de mimetizar uma manobra de recrutamento alveolar), foi mantido PEEP em 15 cm H₂O até o final do experimento, totalizando 20 min de ventilação mecânica. Medidas de mecânica pulmonar foram tomadas antes, durante e após a manobra de pressurização (Figura 4).

Ao final do experimento a traquéia foi clampeada mantendo-se uma PEEP de 15 cm H₂O, para posterior retirada dos pulmões. A seguir os animais foram exsanguinados e foram retirados os pulmões e coração em monobloco. Os pulmões foram fixados em formaldeído a 10%. Após a

fixação, as amostras foram emblocadas em parafina e foram feitos cortes de 5 μm de espessura. Foram feitas colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise morfométrica. De cada grupo também foi retirada uma amostra do pulmão que foi imerso em glutaraldeído para a microscopia eletrônica.

Ainda, após o término do experimento foi retirado de cada animal, o rim direito que foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido e posteriormente congelado no freezer a -70°C .

Figura 3. Protocolo de ventilação no grupo submetido à ventilação mecânica sem pressurização pulmonar. Tempo total de ventilação = 20min.

Figura 4. Protocolo de ventilação do grupo submetido a pressurização pulmonar (mimetizando manobra de recrutamento). Tempo total de ventilação = 20min.

Figura 5. Fotografia do equipamento onde foi realizado o experimento flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá.

Figura 6. Fotografia em detalhe da coluna de água utilizada para pressurização pulmonar.

3.3 Avaliação morfométrica

Utilizando-se o método de morfometria convencional^{39,40} foi avaliada a densidade de células inflamatórias no parênquima pulmonar. Para a análise morfométrica foi feita leitura cega (o pesquisador não sabia a que grupo experimental a lâmina pertencia). Através da utilização de um retículo de 100 pontos e 50 retas acopladas à ocular de um microscópio óptico convencional, foram quantificadas o número de pontos que incidiam no tecido pulmonar e o número de células inflamatórias de cada campo. A densidade de células inflamatórias foi determinada pelo número de células inflamatórias dividido pela área do tecido. A contagem foi realizada em 10 campos em um aumento de 400x e os resultados foram expressos em células/ μm^2 (Figura 7).

Figura 7. Imagem do retículo que é acoplado a uma das oculares do microscópio.

3.4 Microscopia Eletrônica

Os pequenos fragmentos (1 mm x 1 mm) de pulmão fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7, 2, foram processados segundo rotina do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP.

Os espécimes foram estudados e micrografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI – modelo TECNAI 10 acoplado ao software AnalySIS Image Processing.

3.5 Estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo no rim foi realizada pelo método de peroxidação lipídica. A quantificação do malondialdeído foi utilizada para

determinar a taxa de peroxidação lipídica. Fragmentos de 100 µg do tecido renal foram pulverizados em nitrogênio líquido em 1 ml de KCl 1,15%. O material permaneceu sob agitação, a 4°C durante 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante. Para a reação, adicionou-se a 100 µl de amostra, 100 µl SDS (duodecil sulfato de sódio) a 8,1%, 750 µl de ácido acético a 20% e 70 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 40 min. A solução foi centrifugada e medida a absorbância a 532 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Os dados foram testados quanto ao tipo de distribuição usando teste Kolmogorov-Smirnov.e todos apresentaram distribuição normal. A comparação entre os grupos foi feita através do Test T para amostras independentes. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Mecânica do Sistema Respiratório

A Tabela 1 mostra os resultados da variação da mecânica respiratória em todos os grupos estudados. O grupo LPA_p e os grupos C_{Exp} não mostraram diferenças estatísticas na variação da elastância do sistema respiratório (ΔEI = Elastância final menos a inicial) após VM ou SMP. LPA_p SMP mostrou um aumento estatisticamente significativo no ΔEI ($56,19 \pm 12,26$ cm H₂O) em comparação ao LPA_{Exp} ($26,88 \pm 36,38$ cm H₂O), após SMP ($p = 0,029$).

Tabela 1. Variação da elastância (ΔEI) do sistema respiratório entre todos os grupos.

Grupo	n	ΔEI (média $\pm DP$)	valor p
C _p	5	7,79 $\pm$ 4,68	0,903
C _{Exp}	7	7,50 $\pm$ 3,58	
C _p SMP	6	40,38 $\pm$ 13,47	
C _{Exp} SMP	8	25,91 $\pm$ 15,38	0,092
LPA _p	7	11,98 $\pm$ 12,45	0,475
LPA _{Exp}	9	8,65 $\pm$ 5,06	
LPA _p SMP	10	56,19 $\pm$ 12,16	
LPA _{Exp} SMP	8	26,88 $\pm$ 36,39	0,029

C_p=controle pulmonar; C_{Exp}=controle extra pulmonar; C_p SMP= controle pulmonar submetido a manobra de pressurização; C_{Exp} SMP= controle extra pulmonar submetido a manobra de pressurização; LPA_p= Lesão pulmonar pulmonar; LPA_{Exp}= lesão pulmonar aguda extra pulmonar ; LPA_{Exp} SMP= lesão pulmonar aguda extra pulmonar submetido a simples manobra de pressurização; LPA_p SMP= lesão pulmonar aguda pulmonar submetido a simples manobra de pressurização

5.2 Resposta inflamatória do parênquima pulmonar

Figura 8. Fotomicrografia de pulmão de animal do grupo controle extra-pulmonar não ventilado. Observa-se a histoarquitetura pulmonar preservada (H&E aumento de 400x).

Figura 9. Fotomicrografia de pulmão do grupo LPApulm, após ventilação e pressurização pulmonar. Observam-se áreas de colapso ao lado de áreas aeradas, intenso infiltrado inflamatório, congestão vascular. Vale ressaltar a inhomogeneidade da distribuição da lesão pulmonar (H&E, 200x).

Figura 10. Fotomicrofias de pulmões dos animais dos grupos LPA_{exp} (A) e LPA_p (B) após ventilação mecânica e pressurização. Ambos os pulmões apresentam intenso infiltrado inflamatório, observando-se maior tendência ao colapso alveolar no grupo LPA_p. A análise morfológica mostrou maior infiltrado inflamatório neste grupo. (H&E, aumento de 400X).

5.3 Análise quantitativa

Os grupos LPA_p e LPA_{Exp} não ventilados apresentaram o mesmo nível de infamação alveolar, no entanto, uma diferença estatisticamente significativa na densidade de células inflamatórias foi observada em LPA_p VM ($3,84 \pm 1,28$ cels/ μ m²) em relação ao LPA_{Exp} VM.

Em relação ao LPA_{Exp} VM ($1,75 \pm 0,14$ cels/ μ m²), $p = 0,013$. O mesmo perfil foi observado em LPA_p SMP ($2,92 \pm 0,44$ cels/ μ m²) quando comparado com LPA_{Exp} SMP ($1,46 \pm 0,23$ cels/ μ m²) grupos ventilados ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Células inflamatórias no parênquima pulmonar de todos os grupos.

Grupo s	n	células/ μ m ² (média $\pm$ DP)	valor p
C _p NVM	6	$1,70 \pm 0,31$	
C _{Exp} NVM	6	$1,92 \pm 0,37$	0,288
C _{Pulm} VM	6	$1,34 \pm 0,11$	
C _{Exp} VM	6	$1,47 \pm 0,13$	0,098
C _{Pulm} SMP	6	$1,74 \pm 0,22$	
C _{Exp} SMP	6	$1,24 \pm 0,41$	0,026
LPA _p VM	6	$2,35 \pm 0,28$	
LPA _{Exp} NVM	6	$2,05 \pm 0,50$	0,246
LPA _p VM	6	$3,84 \pm 1,28$	
LPA _{Exp} VM	6	$1,75 \pm 0,14$	0,013
LPA _p SMP	6	$2,92 \pm 0,45$	
LPA _{Exp} SMP	6	$1,46 \pm 0,23$	0,000

C_p=controle pulmonar; C_{Exp}=controle extra pulmonar; C_p SMP= controle pulmonar submetido a manobra de pressurização; C_{Exp} SMP= controle extra pulmonar submetido a manobra de pressurização; LPA_p= Lesão pulmonar pulmonar; LPA_{Exp}= lesão pulmonar aguda extra pulmonar ; LPA_{Exp} SMP= lesão pulmonar aguda extra pulmonar submetido a simples manobra de pressurização; LPA_p SMP= lesão pulmonar aguda pulmonar submetido a simples manobra de pressurização

5.4 Microscopia Eletrônica

As amostras de pulmão dos diversos grupos analisados foram aleatoriamente escolhidas e submetidas à análise qualitativa ao microscópio eletrônico.

As fotomicrografias a seguir mostram os diferentes aspectos encontrados nos grupos LPA exp e LPA p após ventilação e pressurização pulmonar. Observamos que o infiltrado inflamatório no grupo extra-pulmonar concentrou-se no interior dos septos alveolares, causando espessamento do mesmos. Neste grupo, os espaços alveolares permaneceram preservados e livres de infiltrado inflamatório ou debris celulares. Ao contrário, ao analisarmos os grupo LPA pulmonar, pudemos observar maior inomogeneidade na distribuição das lesões e muitas áreas com edema e infiltrado inflamatório intra alveolar. Interessante que , a quantidade de surfactante no interior dos espaços alveolares também nos pareceu maior.

Figura 11. Fotomicrografias eletrônicas do grupo LPA exp. Mostrando espesamento dos septos alveolares às custas de infiltrado inflamatório (☆) que não invade o espaço alveolar edema septal (△). Observa-se o intensa deformação do Pneumócito II (seta) após manobra de recrutamento alveolar. Foto A - aumento de 1250X; Foto B 3700x.

Figura 12. Fotomicrografias eletrônicas do grupo LPA pulmonar. Observa-se área com intenso edema e infiltrado inflamatório intra alveolar. Nota-se grande quantidade de surfactante na luz alveolar (setas) e o início da formação das membranas hialinas, com edemas e restos celulares visíveis no espaço alveolar (estrelas).

5.5 Estresse oxidativo no rim

Não foi observada diferença estatística no nível de estresse oxidativo renal comparando-se todos os grupos submetidos à ventilação mecânica (Tabela 3).

Tabela 3. Estresse oxidativo em todos os grupos submetidos a ventilação mecânica.

Grupo s	n	ng/mL (media $\pm$ DP)	valor p
C _p VM	4	0,029 $\pm$ 0,01	0,299
C _{Exp} VM	4	0,019 $\pm$ 0,01	
C _{Pulm} SMP	5	0,027 $\pm$ 0,016	0,521
C _{Exp} SMP	3	0,022 $\pm$ 0,001	
LPA _p VM	9	0,022 $\pm$ 0,007	0,436
LPA _{Exp} VM	3	0,026 $\pm$ 0,001	
LPA _p SMP	7	0,027 $\pm$ 0,008	0,298
LPA _{Exp} SMP	6	0,049 $\pm$ 0,044	

C_p=controle pulmonar; **C_{Exp}**=controle extra pulmonar; **C_p SMP**= controle pulmonar submetido a manobra de pressurização; **C_{Exp} SMP**= controle extra pulmonar submetido a manobra de pressurização; **LPA_p**= Lesão pulmonar pulmonar; **LPA_{Exp}**= lesão pulmonar aguda extra pulmonar ; **LPA_{Exp} SMP**= lesão pulmonar aguda extra pulmonar submetido a simples manobra de pressurização; **LPA_p SMP**= lesão pulmonar aguda pulmonar submetido a simples manobra de pressurização

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Mecânica do sistema respiratório

No presente estudo nós investigamos os efeitos de duas estratégias de ventilação mecânica na resposta inflamatória do parênquima pulmonar e estresse oxidativo renal em modelo experimental de LPA pulmonar e extra pulmonar. Observou-se um padrão diferente de resposta na inflamação do parênquima e mecânica pulmonar em função do sítio primário da lesão.

Imediatamente após um insulto direto, a estrutura primária lesada é o epitélio alveolar, enquanto o endotélio capilar permanece preservado. Essa agressão direta causa ativação de macrófagos alveolares e migração de neutrófilos para o interior do espaço alveolar desencadeando uma rede inflamatória levando à destruição do epitélio alveolar e disfunção do surfactante. Este padrão tem sido muitas vezes descrito como consolidação pulmonar, uma combinação de colapso alveolar e edema da parede alveolar na SDRA associada ao denso infiltrado inflamatório ²⁸. Paralelamente, imediatamente após um insulto indireto, a lesão pulmonar origina-se da ação de mediadores inflamatórios liberados a partir de focos extra pulmonares para o interior da circulação sistêmica. Neste caso, o primeiro alvo do dano indireto é o endotélio vascular pulmonar, com aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial ²⁸.

A ventilação mecânica é um dos aspectos mais importantes do cuidado e suporte no tratamento de pacientes com LPA e SDRA. No entanto usando diferentes modos de VM o clínico freqüentemente aplica níveis e padrões de volume corrente, concentração de oxigênio inspirado e pressões muito além do nível fisiológico ⁶. Pelosi e cols mostraram que a LPA pulmonar e extra pulmonar podem responder diferentemente à aplicação da PEEP. Estes autores demonstraram que na SDRA pulmonar, o aumento da PEEP causou aumento da elastância do sistema respiratório total devido a um aumento da elastância pulmonar sem alterações na elastância da parede torácica. Na SDRA extra pulmonar a aplicação da PEEP causou uma redução da elastância do sistema respiratório total devido principalmente a uma redução da elastância pulmonar ^{27,28}. Como limitação do presente estudo não foi mensurada a mecânica da parede torácica, no entanto foi possível observar um aumento mais pronunciado na elastância do sistema respiratório em um modelo de LPA pulmonar quando comparado ao extra pulmonar após uma manobra única de recrutamento mantida com peep 15 em ventilação mecânica de curto prazo. Estes resultados corroboram dados da literatura e reforçam os diferentes aspectos da injúria pulmonar e extra pulmonar, e seu comportamento diferenciado em relação à ventilação mecânica.

6.2 Inflamação do parênquima pulmonar

A manutenção do funcionamento do epitélio alveolar em pacientes com lesão pulmonar aguda é um fator importante. O epitélio alveolar é muito mais resistente que o endotélio pulmonar à lesão, esta barreira pode, portanto, impedir que o líquido de edema invada os espaços aéreos ²⁹. É interessante notar que na SDRA pulmonar, uma resposta inflamatória alveolar mais intensa é observada durante a fase aguda quando comparada à SDRA extra pulmonar ^{12,24}.

A ventilação mecânica pode agir como indutor inflamatório e fibrótico no pulmão. As forças de distensão aplicadas ao parênquima pulmonar podem induzir respostas pro inflamatórias e pró fibroticas através de um processo chamado mecanotransdução ¹⁸. Respostas celulares a estímulos mecânicos podem ativar a proliferação celular, apoptose, produção de interleucinas e outros processos ^{17,26,38}. Em um cenário onde o epitélio alveolar é diretamente atingido como na LPA pulmonar esses estímulos mecânicos podem ser mais prejudiciais. É importante ressaltar que, no mesmo órgão, podem-se observar simultaneamente as diferentes fases da SDRA, seja por variação inicial no grau de agressão em diferentes locais do pulmão, seja por regulação local dos mecanismos de resposta antiinflamatória compensatória ou ainda por ação de forças mecânicas entre as células envolvidas. Do mesmo modo, a cronologia dos eventos pode não ser exatamente igual em todas as regiões e em todos os momentos ^{12,21}.

Ao se detalhar experimentalmente a história do remodelamento tecidual na SDRA nas diferentes etiologias até 8 semanas após o insulto inicial, observou-se que na SDRA o processo fibrogênico se inicia já nas primeiras 24 horas, independente da etiologia. Porém, uma vez cessado o estímulo etiológico direto ou indireto, o comportamento do remodelamento tecidual diverge totalmente. Nos animais submetidos à lesão direta, observou-se deposição crescente e contínua de colágeno que permanece estável até a oitava semana, seguida de deposição de fibras elásticas, com diferença estatística após a primeira semana. Já nos animais submetidos a insulto inicial indireto, os níveis de deposição de colágeno caíam, já na primeira semana após o insulto, aos níveis basais, sendo que a elastose também não pôde ser observada³⁵. Sem dúvida, trata-se de modelo animal com ressalvas à extrapolação direta ao organismo humano, entretanto, tais diferenças devem ser observadas com maior atenção no paciente crítico, podendo até determinar estratégias de ventilação mecânica diferentes de acordo com a etiologia da SDRA inicial.

6.3 Estresse oxidativo renal

A ventilação mecânica com pressão positiva pode alterar a perfusão renal. Dois componentes que contribuem para a diminuição da perfusão e da função renal causada por pressão positiva na ventilação mecânica podem ser categorizados como hemodinâmicos e neuro-hormonais. O aumento da pressão intratorácica demonstrou correlacionar-se com uma diminuição no

fluxo plasmático renal, taxa de filtração glomerular e da produção de urina durante a ventilação mecânica. A pressão positiva em pacientes com aumento da pressão intra-torácica e da pressão intra abdominal pode agir para diminuir o fluxo sanguíneo renal aumentando a pressão venosa renal e pela compressão da vasculatura renal levando a lesão renal aguda ^{15,34}.

Uma complicação comum do ALI / ARDS é a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (DMOS), que ocorre em até 90% dos pacientes. MODS, que freqüentemente afeta os rins e fígado, como evidenciado pelos marcadores bioquímicos de lesão e peroxidação lipídica ^{5,30}. No presente estudo, tentamos acessar as consequências de uma manobra de recrutamento sobre a peroxidação lipídica nos rins, mas os nossos resultados não mostraram alterações estatisticamente significativas. Certamente, o desenvolvimento de insuficiência renal aguda durante a ventilação mecânica representa um processo multifatorial que pode tornar-se mais importante na presença de comorbidades ^{16,37}. Além disso, no presente estudo, os animais foram submetidos a um período curto de ventilação mecânica. Hegeman et al demonstraram que houve lesão renal em animais somente após duas horas em ventilação mecânica, assim o tempo representa um outro fator determinante ¹⁰.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Nosso estudo foi capaz de mostrar um padrão diferente de resposta inflamatória do parênquima pulmonar com repercussões na mecânica do sistema respiratório em modelo de LPA pulmonar e extra pulmonar submetido à ventilação mecânica de curto prazo, apontando uma maior tendência à piora da inflamação na LPA de etiologia pulmonar. Tais diferenças tornaram-se mais evidentes após pressurização pulmonar, tentando mimetizar manobra de recrutamento alveolar. Nossos resultados reforçam a idéia de que embora a ventilação mecânica represente uma ferramenta fundamental para estabilizar o paciente em estado crítico, é essencial individualizar a abordagem para o tratamento ventilatório, pois a estratégia de ventilação pode interferir negativamente no remodelamento pulmonar, dependendo da etiologia da LPA.
2. Não observamos diferenças sistêmicas relativas ao grau de estresse oxidativo nos rins quando comparamos os modelos de LPA pulmonar e extra pulmonar após ventilação mecânica de curto prazo. Tais achados podem ser justificados mais provavelmente pela curta duração do experimento.

ANEXO

7 Anexo

Anexo 1 – Aprovação de Comissão de Ética para análise de Pesquisa (CAPPesq)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/04/03, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 041/03, intitulado: "ANÁLISE DA RESPOSTA DO EPITÉLIO E ENDOTÉLIO ALVEOLAR AO STRESS MECÂNICO REPRESENTADO PELA MANOBRAS DE RECRUTAMENTO ALVEOLAR NA LESÃO PULMONAR AGUDA DE ETIOLOGIA PULMONAR E EXTRA- PULMONAR INDUZIDA PELO LPS- UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/c" apresentada pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa.

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Dra. Elzara Marcia Nagy
 Pesquisador (a) Coorientador: Eliana Maria Yoshida

CEP-FMUSP, 15 de abril de 2003.

Prof. Dr. Edmar da Matta
 Coordenador
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Carlos Figueiredo Campos, 226, 3º andar - CEP 05403-070 - São Paulo - SP Fone: 011- 5088 9440 Fax: 011- 50881002 e-mail: cep.fmed@fmed.usp.br

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amato MBP, Barbas CSV, 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.
2. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax*. 2002; 57:540-6.
3. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 149:818-824.
4. Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172:798-806
5. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest*. 2006; 86:790-9
6. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema: respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 137:1159-64.
7. Erickson SE, Martin GS, Davis JL, Matthay MA, Eisner MD; NIH NHLBI ARDS Network. Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Crit Care Med*. 2009; 37:1574-9.

8. Fialkow L, Vieira SR, Fernandes AK, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Research Group. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. *Intensive Care Med.* 2002; 28:1644-8.
9. Geiser T Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Med Wkly.* 2003; 22:586-90.
10. Hegeman MA, Hennis MP, Heijnen CJ, Specht PA, Lachmann B, Jansen NJ, van Vught AJ, Cobelens PM. Ventilator-induced endothelial activation and inflammation in the lung and distal organs. *Crit Care.* 2009; 13:R182.
11. Hoelz C, Negri EM, Lichtenfels AJ, Conceição GM, Barbas CS, Saldiva PH, Capelozzi VL. Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. *Pathol Res Pract.* 2001; 197:521-30.
12. Hollenstein U, Homoncik M, Stohlawetz PJ, Marsik C, Sieder A, Eichler HG, Jilma B. Endotoxin down-modulates granulocyte colony-stimulating factor receptor (CD114) on human neutrophils. *J Infect Dis.* 2000; 182:343-6.
13. JF Pittet, RC Mackersie, TR Martin, and MA Matthay. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155:1187-205.
14. Koyner JL, Murray PT. Mechanical ventilation and the kidney. *Blood Purif.* 2010; 29:52-68.

15. Kuiper JW, Groeneveld AB, Slutsky AS, Plötz FB. Mechanical ventilation and acute renal failure. *Crit Care Med.* 2005; 33:1408-15.
16. Le A, Damico R, Damarla M, Boueiz A, Pae HH, Skirball J, Hasan E, Peng X, Chesley A, Crow MT, Reddy SP, Tudor RM, Hassoun PM. Alveolar Cell Apoptosis is Dependent on p38-MAPK-Mediated Activation of Xanthine Oxidoreductase in Ventilator-Induced Lung Injury. *J Appl Physiol.* 2008; 105:1282-90
17. Liu M. Ventilator-induced lung injury and mechanotransduction: why should we care? *Crit Care.* 2007; 11:168
18. Malhotra A. Low-tidal-volume ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2007; 357:1113-20.
19. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295:L379-99.
20. Mendez JL, Hubmayr RD. New insights into the pathology of acute respiratory failure. *Curr Opin Crit Care.* 2005; 11:29-36.
21. Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol.* 2005; 98:1777-83.
22. Minamino T, Komuro I. Regeneration of the endothelium as a novel therapeutic strategy for acute lung injury. *J Clin Invest.* 2006; 116:2316-9.

23. Negri EM, Hoelz C, Barbas CS, Montes GS, Saldiva PH, Capelozzi VL. Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen-elastic system fibers. *Pathol Res Pract*. 2002; 198 :355-61.
24. O'Croinin DF, Nichol AD, Hopkins N, Boylan J, O'Brien S, O'Connor C, Laffey JG, McLoughlin P. Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. *Crit Care Med*. 2008; 36:2128-35.
25. Oeckler RA, Hubmayr RD. Cell wounding and repair in ventilator injured lungs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; 163:44-53.
26. Pelosi P, Caironi P, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary forms of acute *Semin Respir Crit Care Med*. 2001; 22:259-68.
27. Pelosi P, D'Onofrio D, Chiumello D, Paolo S, Chiara G, Capelozzi VL, Barbas CS, Chiaranda M, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. *Eur Respir J Suppl*. 2003; 42:48s-56s.
28. Poirier B, Lannaud-Bournoville M, Conti M, Bazin R, Michel O, Bariéty J, Chevalier J, Myara I. Oxidative stress occurs in absence of hyperglycaemia and inflammation in the onset of kidney lesions in normotensive obese rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15:467-76.
29. Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas HL2nd, Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 20:458-64.

30. Putensen C, Theuerkauf N, Zinserling J, Wrigge H, Pelosi P. Meta-analysis: ventilation strategies and outcomes of the acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Ann Intern Med.* 2009; 151:566-76.
31. Ricci Z, Ronco C. Pulmonary/renal interaction. *Curr Opin Crit Care.* 2010; 16:13-8.
32. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest.* 2007; 131:554-62.
33. Santos FB, Nagato LKS, Boechem NM, Negri EM, Guimarães A, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol.* 2006; 100:98-106.
34. Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. Acute lung injury review. *Intern Med.* 2009; 48:621-30.
35. Vaneker M, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, Dijkman HB, Snijdelaar DG, Joosten LA, van der Hoeven JG, Scheffer GJ. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. *Anesthesiology.* 2007; 107:419-26.
36. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med.* 2000; 342:1301-8.

37. Vieira JM Jr, Castro I, Curvello-Neto A, Demarzo S, Caruso P, Pastore L Jr, Imanishe MH, Abdulkader RC, Deheinzelin D. Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2007; 35:184-91.
38. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000; 342:1334-49.
39. Weibel ER, Crystal RG. Structural organization of the pulmonary interstitium. In: Crystal RG, West JB, eds. *The Lung Scientific Foundations*. New York: Raven Press; 1991. p.369-87.
40. Weibel ER: Morphometry: Stereological theory and practical methods. In: *Models of lung disease: Microscopy and structural methods*. Gil J (Ed). New York: Marcel Dekker; 1990. p.199-247.
41. Wiedemann HP, Matthay MA, Gillis CN. Pulmonary endothelial cell injury and altered lung metabolic function. Early detection of the adult respiratory distress syndrome and possible functional significance. *Clin Chest Med.* 1990; 11:723-36.