Ellen Caroline Toledo do Nascimento

Progressão microestrutural e molecular da lesão pulmonar em um modelo de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Ellen Caroline Toledo do

Progressão microestrutural e molecular da lesão pulmonar em um modelo de
Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo / Ellen Caroline Toledo do
Nascimento. -- São Paulo, 2013.

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

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Descritores: 1.Modelos animais de doenças 2.Síndrome do desconforto respiratório
do adulto 3.Alvéolos pulmonares/lesões 4.Alvéolos pulmonares/patologia 5.Matriz
extracelular 6.Ventilação mecânica

USP/FM/DBD-245/13

Dedicatória

"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."
Fernando Pessoa (Ricardo Reis)

Agradecimentos:

Aos meus pais pelas oportunidades, pela força e todo o amor. Mãe, como sempre fantástica! Pai, o que seria de mim e do Excel sem você!

Irmã, não tem ninguém mais legal que você no mundo!

À Daniela, pela delicadeza, carinho e companheirismo.

Ao meu irmão, pela diversão, força e apartamento dividido.

À Profa. Marisa, pelas discussões científicas, pelo aprendizado, pelas conversas nos momentos ruins, pela amizade. Chefe, você é realmente uma pessoa fantástica.

Ao amigo Prof. Chin pelo aprendizado, pelas discussões científicas, por todo o suporte e apoio.

Ao Prof. Marcelo, pela fantástica convivência científica e pela Coca-Cola compartilhada.

À Profa. Patrícia, pela amizade, pelas oportunidades e por me entusiasmar à carreira.

À Dra. Fabíola e à Profa. Thaís, por todo o apoio, amizade e carinho.

Ao amigo Mauro, pela amizade, ajuda e tempo dedicado ao estudo. Pelas discussões no LIM, no telefone, mensagens de SMS, no Skype... No mundo moderno há diversas formas de se incomodar alguém e acho que usei todas! Obrigada Mauro! Você é sensacional!

Aos amigos do Samu do porco, vocês foram espetaculares! Obrigada pelas noites acordadas nos experimentos, pela ajuda com a “super legal” máquina de insuflar formol e pelas risadas! Tati e Maína, obrigada pela amizade! Ruy, valeu pelas pizzas de atum! Você é genial!

Ao Luiz, pela amizade, apoio, risadas e pelas fantásticas discussões em francês sobre a “farine dynamique”!

Aos amigos do LIM-09, Susi, Adriana, Vinícius, Eduardo, Marcelo, Guilherme, Raquel... Pelas madrugadas com os porcos, por toda a assistência nos experimentos e pela diversão no “Sujinho”.

Às amigas da Patologia Molecular, Natália e Carol, valeu por todos os momentos compartilhados! Obrigada pela ajuda com os géis, pela solidariedade nas inúmeras transferências mal sucedidas e pela torcida!

As amigas Sibebe, Sandra e Alessandra por toda a força, pela amizade e confiança. Si, valeu mesmo!

Ao Dr. Roberto Ibrahim, pela oportunidade, confiança, amizade e apoio.

Ao Dr. Fila, pela confiança, amizade e discussões empresariais.

Aos amigos da patologia, Fábio, Jú, Daniel, Melissa, Gerusa, Mauro, Vanessa, Marcela, Patrícia, Humberto, Annacarol, Cris Ribeiro, Cris Nimir, Denilson, Victor, Karine, Lucas, Marília e Julizia pela convivência, pelos momentos divertidos e por tudo que eu aprendi com vocês.

À amiga Milena e a família Souza, por toda a força e entusiasmo!

Aos amigos “paulistanos”, Tamina, Tamara, André, Carol, Douglas, Luciano e Daniel, por todo o incentivo.

Aos amigos Gláucio, Carlos, Livia, Bruno, Gianni, Elen e Bia, obrigada pela torcida!

Ao amigo que ajudou a formatar a tese e preferiu o anonimato, muito obrigada!

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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 Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo.....	1
1.2. Epidemiologia.....	3
1.3. Caracterização histológica da SDRA.....	6
1.4. Ventilação mecânica.....	8
1.4.1. Lesão induzida pelo ventilador.....	9
1.4.2. Estratégia ventilatória protetora.....	10
1.5. Tomografia de impedância elétrica.....	13
1.6. Remodelamento da matriz extracelular.....	15
1.7. Justificativa do estudo.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MÉTODOS.....	25
3.1. Local do estudo.....	25
3.2. Delineamento do estudo.....	25
3.2.1. Preparo dos animais e monitoração.....	26
3.2.1.1. Tomografia de impedância elétrica.....	27
3.3. Outros cuidados.....	29
3.4. Indução da lesão pulmonar.....	29
3.5. Ventilação Mecânica por tempo prolongado.....	31
3.6 Coleta do material.....	32
3.7. Descarte do animal.....	34
3.8. Análise Morfológica	34
3.8.1. Proporção de Fibras de Colágeno.....	36

3.9. Análise Molecular	37
3.9.1. Extração do RNA.....	37
3.9.2. Quantificação do RNA.....	37
3.9.3. Síntese de c-DNA.....	37
3.8.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	38
3.9.5. PCR quantitativo em tempo real	38
3.9.5.1. Versican, Colágeno tipo I e Colágeno tipo III.....	38
3.9.5.2. Decorin e Biglican.....	40
3.10. Análise de mecânica pulmonar e imagem.....	41
3.11. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. O Modelo experimental.....	47
4.2. Evolução temporal da lesão.....	48
4.2.1. Progressão regional da lesão.....	50
4.2.2. Sinalização para o processo fibroproliferativo.....	56
4.2.3. Evolução funcional do pulmão.....	60
4.3. Correlação da gravidade da lesão pulmonar com parâmetros da ventilação.....	65
4.4. Correlação da ventilação regional com expressão de componentes da MEC	67
4.5. Correlação dos parâmetros morfológicos com variáveis fisiológicas (troca gasosa e mecânica pulmonar)	69
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1. O modelo.....	71
5.2. Distribuição regional e mecanismos da lesão.....	73
5.3. Progressão da lesão.....	78
5.4. Limitações.....	83
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

Lista de abreviaturas:

et al. (e outros)

Lista de símbolos:

mmHg (milímetros de mercúrio)

cmH₂O (centímetros de água)

mL (mililitros)

Kg (quilogramas)

cm (centímetros)

Lista de siglas:

SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo)

CCEA (conferência do consenso europeu americano)

PaO₂ (pressão parcial de oxigênio)

FiO₂ (fração inspirada de oxigênio)

LPA (lesão pulmonar aguda)

PEEP (pressão expiratória final positiva, do inglês “positive end-expiratory pressure”)

CPAP (do inglês “continuous positive airway pressure”)

UTI (unidade de terapia intensiva)

VM (ventilação mecânica)

LPIV (lesão pulmonar induzida pelo ventilador)

TC (tomografia computadorizada)

ARDSnet (do inglês “Acute Respiratory Distress Syndrome Network”)

LBA (lavado broncoalveolar)

PaCO₂ (pressão parcial de gás carbônico)

TIE (tomografia de impedância elétrica)

DAD (dano alveolar difuso)

MEC (matriz extracelular)

TGF-β (fator de transformação do crescimento beta, do inglês “*transforming growth factor beta*”)

FGF (fator de crescimento fibroblástico, do inglês “fibroblastic growth factor”)

MMP-2 (matriz metaloproteinase – 2)

MMP-9 (matriz metaloproteinase – 9)

TIMP (inibidor tecidual de metaloproteinases, do inglês “tissue inhibitor of metalloproteinases”)

RNA_m (ácido ribonucleico mensageiro)

GAG (glicosaminoglicanas)

Lista de Tabelas

Tabela 1. PEEP e pressão de platô durante a ventilação lesiva.....31

Tabela 2. PEEP e FiO₂.....31

Tabela 3. Sequência dos iniciadores (*primers*) *sense* e *anti-sense* para os genes versican, colágeno tipo I e colágeno tipo III.....40

Tabela 4. Referência dos ensaios utilizados para os genes decorin e biglican e tamanho dos respectivos *amplicons*.....41

Tabela 5. Parâmetros histológicos e funcionais nos grupos Sham e Lesão.....47

Lista de Figuras

Figura 1. Posição da faixa de eletrodos do tomógrafo de impedância elétrica ao redor da caixa torácica em um suíno em 3D.....	28
Figura 2. Fotografia representativa da UTI experimental do Laboratório de Pneumologia Experimental (LIM-09).....	32
Figura 3. Fotografia dos blocos pulmonares dos grupos Sham, Lesão e Lesão+VM.....	33
Figura 4. Imagem capturada do monitor da tomografia de impedância elétrica demonstrando a análise da ventilação regional.....	41
Figura 5. Fotografias demonstrando as alterações histológicas observadas no dano alveolar difuso em humanos e as mesmas alterações histológicas observadas no nosso modelo experimental em porcos.....	46
Figura 6. Densidade neutrofílica nos grupos Lesão e Lesão+VM. A densidade neutrofílica foi maior no grupo Lesão. Não há diferença estatística entre as regiões anteriores e posteriores.....	48
Figura 7. Densidade neutrofílica no grupo Sham, grupo Lesão e grupo Lesão+VM.....	49
Figura 8. Índice de hemorragia alveolar nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	49
Figura 9. Hemorragia alveolar no grupo Sham, grupo Lesão e grupo Lesão+VM.....	50
Figura 10. Espessamento septal em μm nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	51
Figura 11. Fotografias representativas do espessamento septal nas regiões anteriores dos grupos Sham; Lesão; Lesão+VM	51
Figura 12. Área alveolar em μm^2 nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	52
Figura 13. Perda de área alveolar em μm^2 ($\times 10^3$) nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	52
Figura 14. Fotografias representativas das áreas alveolares nas regiões posteriores nos grupos Sham; Lesão; e Lesão+VM.....	53
Figura 15. Índice de membrana hialina nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	54
Figura 16. Fotografias representativas da membrana hialina nas regiões anteriores dos grupos Sham; Lesão; e Lesão+VM.....	54
Figura 17. Índice de edema intraalveolar nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	55

Figura 18. Fotografias representativas do edema intraalveolar nas regiões anteriores nos grupos Sham; Lesão; Lesão+VM.....	55
Figura 19. Expressão de colágeno tipo I nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	56
Figura 20. Expressão de colágeno tipo III nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	57
Figura 21. Expressão de versican nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	57
Figura 22. Expressão de decorin nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	58
Figura 23. Expressão de biglican nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	58
Figura 24. Proporção de fibras colágenas nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	59
Figura 25. Proporção de fibras colágenas. Grupo Sham; grupo Lesão; e grupo Lesão+VM.....	59
Figura 26. Pressão parcial de oxigênio em mmHg na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O.....	60
Figura 27. Complacência pulmonar na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O.....	61
Figura 28. Ventilação regional (DeltaZ) nos grupos Lesão e Lesão+VM.....	62
Figura 29. Imagem capturada do monitor TIE demonstrando a ventilação regional em um animal do grupo Lesão no momento da LPIV.....	62
Figura 30. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão+VM ao final das 40 horas de VM.....	63
Figura 31. Ventilação regional na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O.....	64
Figura 32. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O após LPIV.....	64
Figura 33. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão+VM na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O após 40 horas de ventilação mecânica.....	65
Figura 34. Correlação da ventilação regional com a densidade neutrofílica no grupo Lesão.....	66
Figura 35. Correlação da ventilação regional com o índice de membrana hialina no grupo Lesão.....	66
Figura 36. Correlação da ventilação regional com o índice de hemorragia no grupo Lesão.....	67

Figura 37. Correlação da ventilação regional com a expressão de colágeno tipo I no grupo Lesão+VM.....	67
Figura 38. Correlação da ventilação regional com a expressão gênica de colágeno tipo III no grupo Lesão+VM.....	68
Figura 39. Correlação da ventilação regional com a expressão de versican no grupo Lesão+VM.....	68
Figura 40. Correlação da densidade neutrofílica com a PaO ₂ na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O.....	69
Figura 41. Correlação do espessamento septal e complacência pulmonar na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH ₂ O.....	70

RESUMO

Nascimento, ECT. Progressão microestrutural e molecular da lesão pulmonar em um modelo de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: O padrão de distribuição da lesão pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) tem sido alvo de interesse de estudos com tomografia computadorizada. Entretanto, pouca informação é disponível quanto a distribuição e progressão histológica da lesão pulmonar na SDRA. **Objetivos:** Caracterizar a distribuição e progressão histológica da lesão pulmonar em modelo experimental de SDRA em suínos pela quantificação de parâmetros estruturais, inflamatórios e de remodelamento da matriz extracelular (MEC) e correlacioná-los com variáveis funcionais e de tomografia de impedância elétrica (TIE). **Métodos:** Vinte e três porcas da raça Landrace foram divididos em três grupos: 1) Sham (n=5): animais submetidos ao preparo e monitorização; 2) Lesão (n=9): animais submetidos ao protocolo de lesão e eutanasiados após 3 horas; 3) Lesão+MV: animais submetidos ao protocolo de lesão e eutanasiados após 40 horas de ventilação mecânica (VM) segundo a "estratégia ARDSnet". Os parâmetros histológicos foram mensurados por análise de imagem e incluíam: área alveolar, índice de espessamento septal, densidade neutrofílica, membrana hialina, hemorragia, edema intraalveolar e proporção de fibras colágenas. As medidas de cada parâmetro foram normalizadas pela mediana do grupo Sham. Expressão gênica de proteínas da MEC (colágeno tipo I e tipo III, versican, biglican e decorin) foram quantificados por PCR em tempo real. A ventilação regional foi mensurada por TIE. Foram analisadas regiões anteriores e posteriores do pulmão para cada variável. **Resultados:** A densidade neutrofílica foi menor no grupo Lesão+VM ($p=0,02$). A análise da área alveolar no grupo Lesão+VM mostrou que as regiões posteriores apresentaram menor área que as regiões anteriores ($p=0,012$). Entretanto, o espessamento septal foi maior no grupo Lesão+VM, especialmente nas regiões anteriores, quando comparado ao grupo Lesão ($p\leq 0,01$). Em consonância com esses achados, as regiões anteriores exibiram maior índice de membrana hialina e de edema intraalveolar que as regiões posteriores em ambos os grupos ($p<0,03$) e a expressão de colágeno tipo I foi maior na região anterior comparada à região posterior do grupo Lesão+VM ($p=0,001$). A análise da TIE mostrou que as regiões anteriores receberam maior volume corrente que as regiões posteriores no grupo Lesão ($p<0,001$). Nestes animais, a ventilação regional foi correlacionada à densidade neutrofílica ($r=0,48$; $p=0,04$), ao índice de hemorragia ($r=0,74$; $p=0,001$) e ao índice de membrana hialina ($r=0,56$; $p=0,016$). No grupo Lesão+VM, a ventilação regional foi correlacionada à expressão de colágeno tipo I ($r=0,494$; $p=0,05$), colágeno tipo III ($r=0,656$; $p=0,006$) e versican ($r=0,732$; $p=0,001$). **Conclusão:** Esse estudo mostra a progressão histopatológica e apresentação regional da lesão pulmonar em um modelo de SDRA em suínos. Nesse modelo, o suporte com ventilação mecânica protetora foi eficiente para reduzir a inflamação parenquimatosa, mas não inibiu a progressão da lesão e a sinalização para o processo fibroproliferativo. No curso

da lesão, após 40 horas, as regiões anteriores sofreram progressiva redução do lúmen alveolar associada à deposição de membrana hialina e espessamento septal. A lesão progrediu com sinalização difusa para o reparo tecidual, mas com predomínio de expressão de colágeno tipo I nas regiões anteriores. Contudo, a deposição de colágeno parece ser um evento mais tardio.

Descritores: Modelos animais de doenças; Síndrome do desconforto respiratório do adulto; Alvéolos pulmonares/lesões; Alvéolos pulmonares/patologia; Matriz extracelular; Ventilação mecânica.

ABSTRACT

Nascimento, ECT. Microstructural and molecular progression of the pulmonary injury in a model of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: The pattern of lesion distribution in acute respiratory distress syndrome (ARDS) has been addressed in computed tomography studies. However, there is little information concerning the progression and distribution of histological lung injury in ARDS. Objectives: To characterize the histological progression and distribution of lung injury in a pig ARDS model by the quantification of structural, inflammatory and extracellular matrix (ECM) remodeling parameters and to correlate them with functional and electrical impedance tomography (EIT) variables. **Methods:** Twenty-three healthy female Landrace pigs were divided into three groups: 1) Sham (n=5): animals subjected to preparation and monitoring; 2) Injury (n=9): animals subjected to the injury protocol and euthanized after 3 hours. 3) Injury+MV (n=9): animals subjected to the injury protocol and euthanized after 40 hours of ARDSnet mechanical ventilation. Histological parameters measured by image analysis included: alveolar area, septal thickening index, neutrophils density, hyaline membrane, hemorrhage, alveolar edema and collagen fibers content. The parameters values were normalized by Sham group median values. Gene expression of ECM proteins (collagen type I and type III, versican, biglycan and decorin) was quantified by Real Time-PCR. Regional ventilation was measured by EIT. For each variable the anterior and posterior regions of the lung were analyzed. **Results:** Density neutrophil was lesser in the Injury+MV group ($p=0.02$). Alveolar area in the posterior regions of the Injury+MV group was lesser than the anterior regions ($p=0.012$). However, the septal thickening was higher in Injury+MV group, especially in the anterior regions, when compared to the Injury group ($p\leq 0.01$). In consonance with such findings, the hyaline membrane and alveolar edema index in the anterior region was higher than the posterior region in both groups ($p<0.03$) and the expression of collagen type I was significantly higher in the anterior region compared to the posterior region in lungs of Injury+MV ($p=0.001$). The EIT showed that the non-dependent regions (anterior) received more ventilator influx than the dependent regions ($p<0.001$) in the Injury group. In these animals, the regional ventilation was correlated to neutrophil density ($r=0.48$; $p=0.04$), hemorrhage index ($r=0.74$; $p=0.001$) and hyaline membrane index ($r=0.56$; $p=0.016$). In Injury+MV group, the regional ventilation was correlated to collagen type I ($r=0.494$; $p=0.05$), collagen type III ($r=0.656$; $p=0.006$) and versican ($r=0.732$; $p=0.001$) expressions. **Conclusion:** This study shows the histopathological progression and the regional presentation of the pulmonary lesion in the ARDS pig model. In our model, the support with protective ventilation was efficient to reduce parenchymal inflammation, but did not inhibit the injury progression and signaling to the fibroproliferative process. Animals ventilated for 40 hours, the anterior regions underwent a progressive reduction in the alveolar lumen associated with alveolar walls thickening and hyaline

membrane deposition. The injury progressed with diffuse activation of tissue repair pathway, but with the predominance of collagen type I expression in anterior regions. However, in our study, the deposition of collagen rich matrix is a later event.

Descriptors: Disease models/animal; Acute respiratory distress syndrome; Pulmonary alveoli/lesions; Pulmonary alveoli/pathology; Extracellular matrix; Respiration, Artificial;

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), conforme descrita por Ashbaugh et al. em 1967, se caracteriza por um quadro agudo de taquipnéia, hipoxemia e perda de complacência pulmonar após exposição a fatores variados, como, por exemplo, pneumonia e traumatismo múltiplo (Ashbaugh et al., 1967). Desde a descrição original, SDRA tornou-se uma entidade patológica de significativa importância para intensivistas devido a sua incidência, alta taxa de mortalidade e os desafios no manejo ventilatório dos pacientes (Frutos-Vivar et al., 2006).

Os critérios clínicos para o diagnóstico da SDRA foram definidos em 1994 na Conferência do Consenso Europeu-Americano (CCEA) (Bernard et al., 1994). A SDRA foi definida como uma síndrome de insuficiência respiratória de instalação aguda, caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax; hipoxemia grave, definida como relação $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$; pressão de oclusão da artéria pulmonar $\leq 18\text{mmHg}$ ou ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda; e presença de um fator de risco para lesão pulmonar. Durante essa mesma conferência, foi criado o termo Lesão Pulmonar Aguda (LPA), cuja definição é idêntica à da SDRA, exceto pelo grau menos acentuado de hipoxemia presente na LPA ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$), com a finalidade de se identificar os pacientes mais precocemente durante a evolução de seu quadro clínico (Bernard et al., 1994).

Recentemente, foi publicada uma nova classificação e definição de gravidade de SDRA (ARDS Definition Task Force, 2012). Esta nova proposta, conhecida como Definição de Berlim, classificou pacientes com SDRA em três categorias de acordo com a gravidade da lesão: leve ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ com PEEP ou $\text{CPAP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$); moderada ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ com $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$); e grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ com $\text{PEEP} > 5 \text{ cmH}_2\text{O}$). Sob esta definição, para um paciente ser categorizado como tendo SDRA, este deve apresentar: a) quadro de instalação aguda, isto é, presença de um fator desencadeador provável dentro de 7 dias antes do quadro de SDRA ou reconhecimento da piora respiratória neste período de 7 dias; b) imagens radiológicas de tórax (radiografia ou tomografia computadorizada) com opacidades bilaterais não totalmente explicáveis por insuficiência cardíaca ou excesso de fluidos; e c) PEEP de pelo menos $5 \text{ cmH}_2\text{O}$. Além disso, o critério anterior de pressão de oclusão da artéria pulmonar maior que 18 mmHg foi abolido e o conceito de lesão pulmonar aguda (LPA) extinto. Esta publicação (ARDS Definition Task Force, 2012) mostrou correlação das categorias SDRA com a mortalidade, dias livres de ventilador e duração da ventilação mecânica. A mortalidade aumentou conforme a gravidade da categoria de SDRA: leve (27%), moderada (32%) e grave (45%) (ARDS Definition Task Force, 2012). Os critérios de Berlim proporcionaram uma ligeira melhoria na capacidade de prever mortalidade e morbidade quando comparado à definição da CCEA.

1.2. Epidemiologia

A SDRA é a forma mais grave de insuficiência respiratória aguda e representa cerca de 10 a 15% das internações em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Estenssoro et al., 2002). Estudo epidemiológico prospectivo realizado em centros de terapia intensiva na Suécia, Dinamarca e Islândia mostrou que a incidência de insuficiência respiratória aguda foi de 77,6 por 100.000 pacientes-ano nestes países, dos quais 17,9 preenchiam os critérios da CCEA para LPA e 13,5 para SDRA. A taxa de mortalidade entre os pacientes com insuficiência respiratória aguda, incluindo LPA e SDRA, foi de 41,0%, 42,2% para LPA isoladamente e 41,2% para pacientes com critérios para SDRA (Luhr et al., 1999). Um estudo de coorte brasileiro em 12 unidades de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo demonstrou que 49% dos 1732 pacientes incluídos foram admitidos nas unidades por insuficiência respiratória aguda, sendo que 141(8%) dos 889 restantes desenvolveram insuficiência respiratória aguda durante a estada na UTI (prevalência de 57%). Deste total, 10% apresentavam critérios para LPA/SDRA. A taxa de mortalidade foi de 48% (475 pacientes), sendo que 17% dos não-sobreviventes foram categorizados como LPA/SDRA (Franca et al., 2011).

Os dados existentes na literatura sobre a incidência de LPA e SDRA apresentam grande variabilidade, provavelmente, devido à confiabilidade do diagnóstico. As limitações dos critérios diagnósticos, baseados no consenso de 1994, e, posteriormente, revisados em 2012 com a definição de Berlim, e a inexistência de um teste laboratorial, radiológico ou patológico padrão ouro

resultam, provavelmente, em subdiagnóstico da síndrome e na identificação de uma população totalmente heterogênea (Rubenfeld et al., 2007; Laycock et al., 2010). Além disso, como os pacientes são cuidados em UTIs, a epidemiologia da síndrome está intrinsecamente relacionada aos recursos disponíveis em cada centro de terapia intensiva (Rubenfeld et al., 2007).

Estudo prospectivo realizado entre abril de 1999 e julho de 2000 em King County, Washington, Estados Unidos randomizou 1113 pacientes com $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$ mmHg. Destes 828 (74%) tinham $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ inicial ≤ 200 mmHg e 61 dos restantes (21%) que apresentavam $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ entre 300 e 200 mmHg progrediram com $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ menor que 200 mmHg. Segundo esse estudo, a incidência de LPA foi de 78,9 casos/100.000 pessoas-ano e a incidência de SDRA foi de 58,7 casos por 100.000 pessoas-ano. Extrapolando esses dados para a população americana, estima-se 190.600 casos de lesão pulmonar aguda por ano, que representam cerca de 2,2 milhões de dias em unidades de terapia intensiva (Rubenfeld et al., 2005).

Dados da população europeia mostram incidência de SDRA de 16 casos por 100.000 pessoas-ano na Escócia (Hughes et al., 2003). Já estudo multicêntrico irlandês observou incidência de LPA/SDRA em aproximadamente 19% de todas as admissões em unidades de terapia intensiva no período estudado. Dos 196 pacientes com critérios para LPA/SDRA neste estudo, 141 foram categorizados com LPA/SDRA já na admissão e os outros 55 desenvolveram durante a internação (Irish Critical Care Trials Group, 2008). Estatística holandesa mostra incidência de LPA e SDRA de, respectivamente, 29,3 e 24,0 casos por 100.000 pessoas-ano, segundo a definição da CCEA.

Estes são responsáveis por, respectivamente, 4684 e 3837 admissões anuais nas unidades de terapia intensiva daquele país (Wind et al., 2007).

Os dados sobre mortalidade também variam amplamente. Quando Ashbaugh et al. (1967) descreveram a síndrome inicialmente, a mortalidade estava em torno de 60%. Metaanálise realizada por Krafft et al. (1996) não observou mudanças nas taxas de mortalidade no período de 1967 a 1994. A taxa de mortalidade evidenciada foi de $53 \pm 22\%$, sem aparente tendência de melhora nos 22 estudos do período de 1994; nestes, a taxa de mortalidade foi de $51 \pm 19\%$. Já Zambon et al. (2008), em metaanálise realizada no período de 1994 a 2006, observaram redução da mortalidade em pacientes com LPA/SDRA. Phua et al. (2009) questionam essa redução da taxa de mortalidade em SDRA. Metaanálise realizada por esse grupo baseada em 89 estudos do período de 1984 a 2006 mostrou que a taxa de mortalidade permaneceu estática a partir de 1994, em torno de 44% para estudos observacionais e 36,2% para estudos randômicos controlados.

Dados do estudo realizado em King County, Estados Unidos, mostraram que a taxa de mortalidade para pacientes com LPA foi de 38,5% e 41,1% para aqueles com SDRA. Pacientes que inicialmente possuíam $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ maior que 200, mas menor ou igual a 300 e progrediram para $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$ mmHg apresentaram taxa de mortalidade semelhante aos pacientes qualificados inicialmente como SDRA (41%). Pacientes com lesão pulmonar aguda que não progrediram para $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ menor que 200 mmHg exibiram menor taxa de mortalidade comparada aos demais (28,6%). O fator de risco prevalente foi sepse grave de provável origem pulmonar (46%), seguido por sepse grave de

provável origem não-pulmonar (33%). Mortalidade variou de acordo com o fator de risco: 24,1% entre os pacientes com trauma grave, 40,6% entre pacientes com sepse de provável origem pulmonar e 43,6% entre pacientes com pneumonia aspirativa (Rubenfeld et al., 2005).

Apesar dos dados conflitantes, a taxa de mortalidade parece ter sofrido um decréscimo nas últimas décadas. Estudo de coorte realizado no período de 1996 a 2005 com 2451 pacientes de unidades de terapia intensiva com critérios para LPA demonstrou que entre 1996-1997 a taxa de mortalidade foi de 35% e declinou nos períodos subsequentes alcançando o valor de 26% entre 2004-2005. A taxa de mortalidade foi maior entre os pacientes que receberam maior volume corrente comparado aos pacientes com menor volume corrente. Entre estes, houve uma tendência de decréscimo da taxa de mortalidade com o decorrer do período, mas não houve diferença estatística significativa (Erickson et al., 2009).

As razões relacionadas à redução da mortalidade em SDRA não são totalmente claras. A introdução de um modelo de ventilação mecânica protetora, o início precoce de antibioticoterapia, a profilaxia para trombose e a melhora do manejo e aporte nutricional dos pacientes são alguns dos fatores que podem estar relacionados à qualidade do suporte clínico e diminuição da mortalidade (Dushianthan et al., 2011).

1.3. Caracterização histológica da SDRA.

Histologicamente, a lesão pulmonar é representada pelo Dano Alveolar Difuso (DAD), classicamente dividida em três estágios: inflamatória ou

exsudativa, proliferativa e fibrótica. Apesar da lesão ser tradicionalmente subdividida, essa classificação é puramente didática, pois é sabido que as fases se sobrepõem (Katzenstein, 2006). Na fase exsudativa, os alvéolos contêm fluido proteináceo, hemácias, neutrófilos e macrófagos. Edema e neutrófilos acumulam-se no interstício e membranas hialinas formam-se nos ductos alveolares. A fase exsudativa evolui para a fase proliferativa, sendo caracterizada por hiperplasia dos pneumócitos tipo II, acúmulo de fibroblastos e numerosos monócitos no interstício pulmonar (Katzenstein, 2006). As células mesenquimais, em particular fibroblastos e miofibroblastos intersticiais, migram, replicam e secretam proteínas da matriz extracelular, como o colágeno. Esse processo pode levar ao estabelecimento de fibrose intersticial e intraalveolar que caracteriza a fase fibrótica (Marshall et al., 2000). A evolução para a fibrose pulmonar ocorre pelo reparo inadequado em resposta à lesão pulmonar e é vista como resultado da interação entre miofibroblastos, fibroblastos, células inflamatórias agudas e células epiteliais com citocinas, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônia e fibrina (Ware, 2006).

Em estudo recente, dano alveolar difuso esteve presente em 45% das autópsias em pacientes com critérios para SDRA e foi predominante nos casos de SDRA grave (58%), segundo os critérios de Berlim (Thille et al., 2013). Nur Urer et al. (2012) demonstraram que a fase exsudativa foi preponderante em autópsias com diagnóstico de dano alveolar difuso (75,7%) e o restante (24,2%) correspondiam a fase proliferativa. Os achados histológicos de edema e exsudato alveolar foram maiores na fase exsudativa, por outro lado, as taxas de descamação histiocítica, inflamação crônica, fibrina e fibrose alveolar

predominaram na fase proliferativa. Poucos estudos, entretanto, investigaram o padrão de distribuição do dano alveolar no território pulmonar. Barth et al. (1998) em estudo com 35 autópsias mostraram uma predominância de dano alveolar difuso crônico nas regiões pulmonares anteriores e nos lobos superiores e de dano alveolar agudo nas regiões posteriores e nos lobos inferiores; todavia, os achados histológicos não foram correlacionados com os parâmetros ventilatórios, não sendo possível a discussão sobre o efeito da ventilação mecânica na distribuição da lesão pulmonar nesses pacientes.

1.4. Ventilação mecânica.

A ventilação mecânica (VM) é o principal recurso de suporte à vida na SDRA e colabora para resolução da lesão pulmonar na maioria dos pacientes. A relativa queda da mortalidade, principalmente a partir da década de 1990, é relacionada à melhora do manejo de pacientes críticos nas unidades de terapia intensiva (Abel et al., 1998), principalmente em relação às estratégias de ventilação mecânica (Matthay e Zimmerman, 2005). É bem estabelecido o benefício da utilização de ventilação pulmonar com baixos volumes correntes (6ml/Kg) (estratégia protetora) em relação aos altos volumes previamente utilizados (12 ml/Kg) (ventilação convencional) (ARDSnet, 2000; Fan et al., 2005). O uso de menores volumes correntes resulta em maior taxa de sobrevivência e dias livres de ventilador (ARDSnet, 2000). No entanto, há ainda discordância em relação aos valores de pressão positiva expiratória final (PEEP) a serem aplicados. Amato et al. (1998) relataram queda na mortalidade ao utilizar valores elevados de PEEP (2 cmH₂O acima do ponto inferior de

inflexão da curva pressão-volume realizada para cada paciente) associados a baixos volumes, justificando a utilização da PEEP elevada para evitar a reabertura cíclica dos alvéolos e bronquíolos colapsados, fenômeno sabidamente crítico para a exacerbação do processo inflamatório pulmonar (Slutsky, 1999). Já o estudo apresentado pela “Acute Respiratory Distress Syndrome Network” (Brower et al., 2004) não observou clara associação entre uso de valores elevados de PEEP e queda da mortalidade dos pacientes. Mais recentemente, Villar et al. (2006) também demonstraram declínio da mortalidade em pacientes ventilados com baixos volumes correntes e altos valores de PEEP, mantendo a discussão sobre os valores adequados de PEEP a serem empregados.

1.4.1. Lesão induzida pelo ventilador

O conhecimento da distribuição da lesão no território pulmonar com o uso de tomografia computadorizada (TC) (Caironi et al., 2006) foi fundamental para a melhoria do suporte ventilatório da SDRA. Os pulmões visualizados na TC exibem basicamente dois compartimentos: um atelectásico, comprimido, com perda maciça da aeração e aumento na densidade do tecido pulmonar, resultante de vários componentes: alta permeabilidade com aumento do líquido extravascular, infecção e inflamação pulmonar, localizado predominantemente nas regiões dependentes (posteriores) e outro mais ventilado e distendido, localizado nas regiões não dependentes (anteriores), denominado “baby lung” (Gattinoni et al., 1987; Rouby et al., 2003).

Um dos grandes avanços no tratamento de pacientes com SDRA decorre da constatação de que a ventilação mecânica, se inadequadamente ajustada, pode causar ou exacerbar a lesão pulmonar subjacente, resultando na lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV) (Ware, 2006). A LPIV é semelhante à lesão causada pela SDRA, portanto, difícil de reconhecer e de diferenciar da lesão pulmonar primária. Os principais mecanismos envolvidos na lesão pulmonar causada pela ventilação são a hiperdistensão do “baby lung” e a abertura e fechamento cíclico dos alvéolos da região dependente colapsada, conhecido como atelectrauma. Além disso, a lesão desencadeada pelo estresse mecânico ativa e libera uma série de mediadores inflamatórios (o biotrauma) que resulta em resposta inflamatória sistêmica e local, com disfunção pulmonar e de outros órgãos. (Slutsky et al., 1999; Fan et al., 2005).

1.4.2. Estratégia ventilatória protetora

Ainda não existe um consenso quanto à estratégia ventilatória ideal. Com os estudos em tomografia computadorizada, sabe-se que as áreas consideradas normalmente areadas são pequenas (“baby lung”) e provavelmente recebem a maior parte do volume corrente durante a ventilação mecânica (Gattinoni et al., 2001), ou seja, são submetidas a excessivo estresse e tensão alveolar. Já o compartimento não aerado pode ser ciclicamente reareado e exposto a estresse de cisalhamento (Grasso et al., 2004). Acredita-se que a melhor estratégia seria a que proporcionasse uma adequada relação hiperdistensão/colapso e com isso permitisse a redução do estresse mecânico e do biotrauma.

Atualmente, a estratégia protetora mais utilizada é a descrita pelo grupo ARDSnet (ARDSnet, 2000). Esta estratégia associa o uso de baixo volume corrente com valores ajustados de FiO_2 e PEEP baseados em uma tabela construída por especialistas (ARDSnet, 2000). Segundo essa estratégia, o papel prejudicial do colapso alveolar sintetiza-se em gerar hiperdistensão nas regiões pulmonares anteriores (não dependentes). Assim, bastaria reduzir o volume corrente e a pressão inspiratória para aliviar a hiperdistensão e proteger o pulmão. Entretanto, segundo Terragni et al. (2007) a estratégia “ARDSnet” pode não ser protetora em todos os pacientes com SDRA. Nesse estudo, um terço dos pacientes submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 6 ml/kg e pressão de platô inferior a 30 cm de H_2O apresentou considerável hiperdistensão, aumento na concentração de mediadores inflamatórios e mais dias submetidos à VM.

Gattinoni et al (2006), em estudo sobre recrutamento pulmonar, mostraram que a porcentagem de áreas potencialmente recrutáveis no pulmão após aumento da PEEP, isto é, áreas não aeradas cuja aeração foi restaurada, de acordo com a tomografia computadorizada, está relacionada à gravidade da lesão. O grupo com maior porcentagem de pulmão potencialmente recrutável apresentou maior proporção de áreas não aeradas, menor $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2$, menor complacência, maior PaCO_2 e taxa de mortalidade, comparada ao grupo com menor porcentagem de tecido pulmonar potencialmente recrutável. Acredita-se que um maior conhecimento sobre a quantidade de áreas pulmonares não aeradas e a porcentagem de pulmão recrutável possa ser importante para o estabelecimento de uma terapêutica eficaz (Gattinoni et al., 2006). Nesse

sentido, a pressão expiratória final positiva (PEEP) desponta como uma importante variável a ser mais bem estudada.

Sabe-se que a utilização da PEEP induz recrutamento alveolar e evita o estresse por abertura e fechamento cíclico de alvéolos; por outro lado, acredita-se que um maior incremento da PEEP possa resultar em hiperdistensão (Puybasset et al., 2000a). Segundo Carvalho et al. (2007), o uso de PEEP alta foi associada a recrutamento alveolar e hiperdistensão em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por ácido oleico, mesmo com a utilização de baixo volume corrente. Após as manobras de recrutamento, a titulação da PEEP (partindo de 26 cmH₂O) com a finalidade de atingir um valor de PEEP com a menor elastância possível (na maioria dos animais em torno de 16 cmH₂O) aumentou as áreas pouco aeradas, entretanto, obteve-se redução proporcional das áreas hiperinsufladas. Uso de PEEP mais alta não apresentou benefício em estudo conduzido com 549 pacientes ventilados com baixo volume corrente e pressão de platô inferior a 30 cmH₂O (média da PEEP nos primeiros quatro dias do estudo no grupo maior PEEP foi de $13,2 \pm 3,5$ cmH₂O e no grupo menor PEEP foi de $8,3 \pm 3,2$ cmH₂O) (Brower et al., 2004). Meade et al. (2008) também não observaram diferenças na taxas de mortalidade e de barotrauma entre os pacientes ventilados com PEEP mais alta (níveis de PEEP ajustados segundo a FiO₂), e pacientes com níveis de PEEP considerados convencionais (média de $9,8 \pm 2,7$ cmH₂O nas primeiras 72 horas). Já estudo publicado por Mercat et al. (2008) mostrou que o grupo de pacientes randomizados para estratégia com altos níveis de PEEP (PEEP foi individualmente titulada e limitada pela pressão de platô) não foi associado a

um aumento de barotrauma, exibiu maior média de dias livres de ventilador, maior média de dias livre de insuficiência de órgãos e melhora na função pulmonar, porém, sem evidência estatística de redução da mortalidade.

Apesar dos recentes ensaios clínicos não mostrarem redução da taxa de mortalidade com o uso de níveis elevados de PEEP, foi observada melhora em alguns objetivos secundários (Brower et al., 2004; Meade et al., 2008; Mercat et al., 2008). Talvez isso se deva à utilização de um nível subótimo de PEEP (Tucci et al., 2011). A dúvida sobre o valor ideal de PEEP ainda permanece. O advento de monitores pulmonares à beira do leito parece ser uma excelente alternativa para otimizar a estratégia ventilatória, mensurar as áreas de colapso e hiperdistensão e titular a PEEP individualmente, alcançando um valor ideal para cada paciente dependendo do gravidade da sua injúria pulmonar (Blankman et al., 2012).

1.5. Tomografia de Impedância Elétrica

A presença de hiperdistensão e/ou colapso nos pulmões de pacientes com SDRA pode ser avaliada indiretamente através das medidas de mecânica pulmonar ou diretamente através de exames radiológicos. Gasometria arterial e curva pressão-volume fornecem informação da função pulmonar como um todo, entretanto, falham na determinação do comportamento regional do pulmão (Riera et al., 2011 e Denaï et al., 2010). A tomografia computadorizada, considerada padrão ouro, além de expor o paciente à radiação, requer o deslocamento deste da UTI até o centro de radiologia (Denaï et al., 2010).

A tomografia de impedância elétrica (TIE) é uma ferramenta promissora, não-invasiva e livre de radiação que produz imagens da ventilação pulmonar regional à beira leito, em tempo real (Denai et al., 2010; Costa et al., 2009). A TIE é baseada no parâmetro físico de resistência fisiológica, ou seja, a impedância é determinada pela capacidade de um tecido de se opor à passagem da corrente elétrica. A resistência de um tecido é determinada pela sua morfologia, conteúdo de ar, quantidade de líquido intra e extracelular e volume sanguíneo. A técnica consiste na injeção de uma pequena corrente elétrica através de eletrodos colocados na superfície do tórax (Blankman et al., 2012). A corrente injetada por um par de eletrodos gera diferentes voltagens nos demais, dependendo da resistência encontrada nos diferentes tecidos por onde passa. Utilizando um algoritmo matemático, as medidas serão traduzidas em uma imagem de secção transversal de 32 pixels x 32 pixels. A TIE é capaz de gerar imagens a partir da distribuição dos valores de impedância nos diferentes tecidos. No caso específico do pulmão, com essa ferramenta é possível estimar as variações de volume graças às alterações na resistência tecidual produzidas pela entrada e saída de ar (Tomicic et al., 2010).

Estudo em pacientes críticos com insuficiência respiratória aguda demonstrou que esse método permite detectar o colapso regional ou a hiperdistensão pulmonar localizada com extrema sensibilidade (Victorino et al., 2004). As mudanças de resistividade pulmonar foram linearmente proporcionais ao volume pulmonar. Regiões dependentes (posteriores) têm comportamento diferente das regiões não dependentes (anteriores). Esta diferença pôde ser avaliada através da TIE, sendo possível o cálculo da

relação entre as amplitudes ventilatórias anterior/posterior. Quando esta relação foi maior que 1:1, observou-se queda da oxigenação e colapso basal alveolar à tomografia computadorizada (Victorino et al., 2004). Mais ainda, tem-se observado que a técnica tem potencial para permitir uma leitura acurada dos níveis de ventilação alveolar, perfusão sanguínea e constantes de tempo para cada região do parênquima pulmonar (Fagerberg et al., 2009). Excelente acurácia também foi observada quando as medidas de ventilação e volume pulmonar obtidas pela TIE foram comparadas aos resultados da tomografia de emissão de positron (Richard et al., 2009).

1.6. Remodelamento da matriz extracelular

Apesar dos avanços no manejo da SDRA, a mortalidade permanece alta, em torno de 36-44% (Phua et al., 2009). Alveolite fibrosante é uma bem conhecida consequência da lesão pulmonar aguda e pode contribuir para a insuficiência respiratória e morte de vários pacientes (Marshall et al., 1998). Aumento nos níveis de procolágeno tipo III foi detectado no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA e fortemente associado a risco aumentado para desfecho fatal (Clark et al., 1995). Chesnutt et al. (1997) mostraram que alveolite fibrosante começa precocemente no curso clínico da lesão pulmonar aguda e a presença de níveis elevados de procolágeno III é um preditor de pior resultado. Fibrose está presente em 53% das biópsias a céu aberto em pacientes com SDRA submetidos à ventilação mecânica (Papazian et al., 2007) e em 55% das autópsias de não-sobreviventes (Meduri, 1993).

A maior característica da fibrose pulmonar, além do influxo de células inflamatórias, é um aumento absoluto na síntese e deposição de matriz extracelular, rica em colágeno (Armstrong et al., 1999). Esta representa o arcabouço tridimensional da parede alveolar, composta de uma camada de células epiteliais e células endoteliais, suas membranas basais e uma fina camada intersticial entre o endotélio capilar e o epitélio alveolar (Pelosi et al., 2007; Moriondo et al., 2007).

A matriz extracelular (MEC) é composta por uma rede de diferentes macromoléculas, incluindo o colágeno, elastina e as proteoglicanas (Moriondo et al., 2007). O colágeno apresenta um papel quase puramente mecânico, importante para a resistência à expansão, e as fibras elásticas são responsáveis pela força de recolhimento elástico do parênquima (Pelosi e Negrini, 2008). As macromoléculas não fibrilares, como o ácido hialurônico e as proteoglicanas, preenchem os espaços vazios entre a trama de fibras insolúveis, estabilizando a arquitetura tridimensional da matriz tecidual fibrosa (Pelosi e Negrini, 2008). Proteoglicanas são compostas de um eixo de proteínas de multidomínio unidas através de uma ligação covalente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas (Pelosi e Negrini, 2008; Passi et al., 1998; Negrini et al., 1998; Pelosi et al., 2007; Al-Jamal e Ludwig, 2001). Estas consistem de longas cadeias de polissacarídeos, lineares e heterogêneas feitas da repetição de unidades dissacárides. Diferente das proteoglicanas, que contêm glicosaminoglicanas sulfatadas (heparan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato e queratan sulfato), o ácido hialurônico é constituído de glicosaminoglicanas não sulfatadas, unidas por ligações não covalentes a um

eixo protéico (Pelosi e Negrini, 2008; Ludwig, 2007). Diferentes subclasses de proteoglicanas são descritas e incluem grandes proteoglicanas agregadas, como versican e agrecan; proteoglicanas de membrana basal, como perlecan; proteoglicanas ricas em repetição de pequenas leucinas, como decorin, biglican, lumican e fibromodulina; e proteoglicanas de superfície celular, como sindecan (Ludwig, 2007).

Proteoglicanas apresentam diferentes funções biológicas. Versican, devido à alta carga iônica de suas múltiplas cadeias adjacentes de glicosaminoglicanas, tem um papel crítico na determinação do conteúdo de água ou turgor das matrizes extracelulares, influenciando no comportamento viscoelástico tecidual, assim como na migração e proliferação celular. Adicionalmente, perlecan atua como uma barreira à filtração e sindecan funciona, primariamente, como um receptor de superfície celular para ligantes da matriz. Decorin e biglican ligam-se ao colágeno e afetam à fibrilogênese e a organização da matriz. Proteoglicanas também se ligam a vários fatores de crescimento, como o TGF- β e fator de crescimento fibroblástico (FGF), e modulam seus efeitos na proliferação celular e deposição da matriz por influência na sua biodisponibilidade (Pelosi e Rocco, 2008).

As proteases possuem um papel essencial na modulação da MEC. Durante o crescimento e desenvolvimento, esta experimenta continuo remodelamento. Esse processo é facilitado por proteases que mediam a quebra das proteínas da matriz, necessário para que estas possam ser resintetizadas e reorganizadas (Moraes et al., 2003). Embora muitas proteases sejam capazes de clivar as moléculas da matriz extracelular, a

família de metaloproteinases de matriz Zn^{++} (MMPs) e seus inibidores são, provavelmente, os mediadores fisiologicamente relevantes na degradação da matriz (Pelosi et al., 2007).

As MMPs apresentam vários inibidores naturais, entre estes se destacam as TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases). Quatro TIMPs já foram identificadas e caracterizadas em mamíferos. Cada TIMP inibe uma MMP específica e a relação MMP/TIMP correlaciona-se significativamente com a evolução e/ou gravidade em várias doenças humanas (Greenlee et al., 2007). O balanço de MMPs e TIMPs determina a renovação da MEC, ou seja, um excesso de MMPs ou um déficit de TIMPs pode resultar em excesso de degradação da matriz (ElKington e Friedland, 2006).

Em condições patológicas, a perda do papel protetor da MEC, em relação à carga de fluido intersticial, pode ser um importante fator que resultaria no desenvolvimento súbito de edema pulmonar grave, SDRA e insuficiência de múltiplos órgãos (Negrini et al., 1998). O desenvolvimento precoce de edema intersticial pulmonar tem mostrado estar associado à degradação das proteoglicanas e um enfraquecimento das ligações intermoleculares entre as fibras, resultando em desorganização da rede de fibras tridimensional da matriz (Negrini et al., 2006). Embora a degradação da matriz envolva todas as famílias de proteoglicanas, edema hidrostático é acompanhado por uma clivagem de versican, enquanto edema por lesão endotelial causa fragmentação principalmente de perlecan e tem apenas um pequeno efeito sobre versican (Negrini e Passi, 2007). Entretanto, trabalho anterior com marcação imunoistoquímica de tecido pulmonar humano com LPA mostrou marcação de

versican em paredes alveolares espessadas; os miofibroblastos mostraram marcação intracelular para decorin e coloração para pró-colágeno do tipo I, sugerindo síntese precoce de colágeno (Bensadoun et al., 1996).

A matriz extracelular pulmonar altera-se em resposta a regimes ventilatórios anormais, sendo um dos fatores determinantes da pior evolução clínica dos pacientes. Hiperdistensão das regiões não dependentes mostrou estar associada a expressão precoce de pró-colágeno III (de Carvalho et al., 2007). Berg e colaboradores (1997) relataram que acentuada distensão do pulmão resulta em aumento na expressão de RNAm de vários componentes da matriz, como pró-colágeno e fibronectina. Breen (2000) mostrou, em cultura de fibroblastos, aumento na expressão gênica de colágeno em resposta a estiramento mecânico excessivo. Pouca informação, entretanto, é disponível no que concerne aos efeitos do estiramento mecânico nas proteoglicanas pulmonares (Pelosi e Negrini, 2008). Al-Jamal e Ludwig (2001) observaram que ratos submetidos à ventilação mecânica com altos volumes apresentaram aumento significativo da expressão de versican e alteração da sua distribuição quando comparados aos animais ventilados com baixo volume. Além disso, verificou-se aumento na expressão de biglican, embora sem alterações no padrão de distribuição. Moriando et al. (2007) evidenciaram significativa fragmentação de glicosaminoglicanas (GAGs) e ativação de MMP-9 e -2 em ratos mecanicamente ventilados quando comparados aos animais não ventilados, sugerindo que a tensão tecidual naquele grupo aumentaria os efeitos proteolíticos das enzimas liberadas, resultando em fragmentação das GAGs. Nessa linha, a ventilação mecânica pode afetar as macromoléculas que

constituem a matriz extracelular (colágeno, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas) e impactar no comportamento biomecânico do parênquima pulmonar (Rocco et al., 2009).

1.7. Justificativa do estudo

Fatores relacionados à progressão da lesão pulmonar, remodelamento do parênquima e regulação do reparo são pouco compreendidos. Alterações no colágeno são o principal foco dos estudos que investigam o papel das proteínas da matriz extracelular no remodelamento da SDRA (Santos, 2008). Poucos estudos, entretanto, investigaram o papel das proteoglicanas no desenvolvimento e progressão da lesão pulmonar aguda. Atualmente, é impossível falar sobre evolução da lesão pulmonar na SDRA sem levar em consideração a ventilação mecânica, já que esta é parte da história natural da síndrome. Apesar da histologia do dano alveolar difuso já estar bem descrita, pouco se sabe sobre o impacto da ventilação mecânica preconizada (considerada protetora) sobre o parênquima pulmonar. Vários questionamentos ainda não apresentam respostas na literatura: quais os parâmetros histológicos e moleculares que se alteram no curso da SDRA? A ventilação mecânica protege o pulmão da fibroproliferação? Quais as repercussões morfológicas e moleculares no parênquima pulmonar em relação a esse modelo de ventilação? Como se manifesta o dano alveolar na progressão da lesão nas diferentes regiões pulmonares (dependente e não dependente)? Portanto, esse estudo foi planejado com o objetivo de caracterizar a progressão histológica e a

distribuição da lesão pulmonar em um modelo de SDRA em suínos submetidos a ventilação mecânica protetora (estratégia "ARDSnet") por longo período, por meio da quantificação de parâmetros estruturais, inflamatórios e de remodelamento da matriz extracelular em diferentes regiões do pulmão.

2. OBJETIVOS

1. Caracterização da progressão histológica e da distribuição da lesão pulmonar em um modelo de SDRA em animais de grande porte submetidos à ventilação mecânica protetora (“estratégia ARDSnet”).
2. Avaliação da expressão de proteínas associadas ao remodelamento da matriz extracelular nas diferentes regiões pulmonares.
3. Correlação dos diferentes parâmetros histológicos com parâmetros funcionais e da tomografia de impedância elétrica.

3. MÉTODOS

3.1. Local do estudo

Este estudo foi conduzido no Departamento de Patologia, FMUSP, em colaboração com o Laboratório de Pneumologia Experimental (LIM-09) do HC-FMUSP e foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq).

3.2. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e randomizado em modelo animal de SDRA. Foram utilizados porcos fêmeas da raça Landrace, com peso entre 30 a 35 kg, procedentes da granja RG (localizada em Suzano – SP). O animal foi transportado para o laboratório no dia do estudo e foi mantido em jejum até ser anestesiado.

A escolha da espécie suína deveu-se à grande semelhança morfológica de seus pulmões (Hedenstierna et al., 2000) e ao comportamento hemodinâmico bem próximo ao dos humanos (Hannon et al., 1990).

Vinte e três animais foram utilizados para o estudo, divididos em três grupos:

1. Sham (n= 5 animais): animais submetidos ao preparo e monitorização (cerca de 5 horas)
2. Lesão (n= 9 animais): animais submetidos ao protocolo de lesão: lavagem (cerca de 45 minutos) e ventilação Lesiva (3 horas) e eutanasiados na sequência.
3. Lesão + VM (lesão + ventilação mecânica, n=9 animais): animais submetidos ao protocolo de lesão e eutanasiados após 40 horas de ventilação mecânica protetora (ARDSnet, 2000).

3.2.1. Preparo dos animais e monitoração

A anestesia e sedação inicial foram realizadas por injeção intramuscular de quetamina (5mg/kg), acepromazina (0,1mg/kg) e midazolam (0,5 mg/kg). O animal foi monitorado através de eletrocardiograma (ECG) e oximetria utilizando o monitor multiparamétrico Dixtal® Portal DX 2020 (Dixtal, São Paulo, Brasil) e oxigenado com auxílio de máscara nasal conectada a uma fonte de oxigênio a 100%. Foi realizada punção para acesso venoso auricular para infusão de propofol (3mg/kg) e do soro de manutenção. Após indução anestésica, foi realizada a intubação orotraqueal com tubo traqueal de 7,5 mm de diâmetro (com “cuff”) para ventilação mecânica com ventilador mecânico Newport E500 (Califórnia, EUA).

Após a intubação orotraqueal, foi iniciada infusão contínua de anestesia total intravenosa com quetamina (1 a 2mg/kg/h), fentanil (3 a 5µg/kg/h), brometo de pancurônio (0,06 mg/kg/h) e midazolan (0,5 mg/kg/h), diluídos em solução

fisiológica e ministrados através de bomba de infusão durante todo o experimento.

A artéria femoral esquerda foi puncionada para introdução de cateter arterial para monitorização da pressão arterial. Através de incisão na região inferior do abdômen foi realizada cistostomia para introdução de sonda do tipo Foley na bexiga para controle do débito urinário. Posteriormente, foi realizada a traqueostomia com inserção de tubo traqueal 7,5 mm (com *cuff*) para a ventilação mecânica.

Foram considerados para o estudo os animais que apresentaram: uma soma da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) e PaCO_2 maior que 400 mmHg, sob ventilação mecânica com volume corrente de 10ml/kg; $\text{FiO}_2 = 1$; PEEP de 10 cmH₂O. Esta gasometria era colhida 10 minutos após manobra de recrutamento pulmonar com delta de pressão de 20 cmH₂O e PEEP de 15 cmH₂O. Caso o animal não preenchesse esses critérios, era excluído deste protocolo.

3.2.1.1. Tomografia de impedância elétrica

Os dados de TIE foram adquiridos através de um tomógrafo de impedância desenvolvido no LIM-09 do HC-FMUSP em conjunto com a Faculdade de Engenharia da Poli/USP, capazes de produzir 50 imagens relativas por segundo, reproduzindo ao vivo a imagem da ventilação pulmonar.

Os trinta e dois eletrodos da TIE foram aplicados num plano correspondente ao 4°-5° espaço intercostal (Figura 1) sobre a pele previamente tricotomizada. Para aquisição das imagens, correntes elétrica inócuas (5-8 mA;

125 KHz) foram injetadas através de pares de eletrodos numa sequência rotatória.

Através deste aparelho foi possível obter dados em tempo real da variação da impedância torácica através de aplicativo desenvolvido no software Labview (National Instruments, EUA). Os dados da tomografia de impedância elétrica foram salvos nos tempos inicial (denominado basal), final da LPIV, na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O (inicial e final) e ao final das 40 horas de ventilação mecânica protetora.

Figura 1. Posição da faixa de eletrodos do tomógrafo de impedância elétrica ao redor da caixa torácica em um suíno em 3D.

3.3. Outros cuidados

Profilaxia de infecção: foi administrado antibiótico profilático durante todo o período de estudo - ampicilina 1 grama por via endovenosa a cada 6 horas e gentamicina 150mg/kg por via endovenosa 1 vez ao dia.

Profilaxia de Tromboembolismo pulmonar: heparina não fracionada 3.000U via subcutânea 12/12 horas.

Umidificação das vias aéreas: através de umidificador aquecido.

Aspiração de vias aéreas: foi realizada com sistema fechado (*Trachcare®* infantil) somente quando necessário (presença de secreção visível na ausculta pulmonar ou visualizada na curva do ventilador).

Nutrição: soro de manutenção (soro glicosado 5% 1000mL, NaCl 20% 30mL e KCl 19,1% 10mL) por via endovenosa associado a soro glicosado 5% por sonda nasogástrica 500mL em 24horas.

3.4. Indução da lesão pulmonar

Os animais do grupo Lesão e grupo Lesão+VM foram submetidos a lesão pulmonar por meio do método de lavagens pulmonares sequenciais (intervalos de até 5 minutos) com solução fisiológica (SF) 0,9%, 30 ml/kg de peso, até que se obteve uma $PaO_2 < 100$ mmHg estável por no mínimo 5 minutos (Lachmann et al., 1980).

Posteriormente, foi iniciada a LPIV através do uso de pressões inspiratórias elevadas, seguindo uma tabela de PEEP e pressão de platô que foi

ajustada conforme a oxigenação (saturação periférica ou gasometria arterial) (Tabela 1). Após 30 minutos desta ventilação lesiva, foi realizado uma manobra de recrutamento, com PEEP de 35 cmH₂O e delta de pressão de 15 cmH₂O, seguido de uma lavagem pulmonar. Após esta lavagem, a ventilação lesiva foi retomada com PEEP de 16 cmH₂O e delta de pressão de 15 cmH₂O e, posteriormente, esses valores foram ajustados conforme tabela 1 até completar 3 horas ou por tempo inferior, caso a PEEP fosse maior que 15 cmH₂O após o tempo mínimo de 1 hora e 30 minutos de ventilação lesiva.

Após a ventilação lesiva, os animais (grupos Lesão e Lesão+VM) foram submetidos à homogeneização pulmonar através de uma manobra de recrutamento alveolar com PEEP de 35 cmH₂O e delta de pressão de 15 cmH₂O. Após esta manobra, o delta de pressão foi mantido e a PEEP reduzida para 15 cmH₂O e, após 10 minutos, foi colhida uma gasometria arterial e gravado imagens da TIE (momento considerado como ventilação padrão). Posteriormente, para confirmar a indução da lesão pulmonar, os animais foram ventilados em modo pressão controlada com delta de pressão de 15 cmH₂O e PEEP de 10 cmH₂O. A PaO₂ deveria ficar abaixo de 150mmHg na PEEP de 10 cmH₂O. Caso este objetivo não fosse atingido, a ventilação lesiva continuava até obter-se uma PaO₂ abaixo de 150mmHg com um tempo máximo de 5 horas de LPIV.

Tabela 1. PEEP e pressão de platô durante a ventilação lesiva

PEEP	3	5	7	9	11	13	15	17	19
Pressão de Platô	42	42	44	46	48	48	48	48	48

*Frequência respiratória: 20-40; I:E=1:2

3.5. Ventilação Mecânica por tempo prolongado

Após a indução e instalação da lesão pulmonar, os animais do grupo Lesão+VM foram ventilados por um período de 40 horas seguidas segundo a "estratégia ARDSnet" (ARDSnet, 2000). Foi utilizado o modo volume controlado, com volume corrente inicial de 6 mL/kg. A frequência respiratória foi ajustada conforme o protocolo para manter uma PaCO_2 entre 35 e 45 mmHg, mantendo pressão de platô menor ou igual a 30 cmH₂O.

A FiO_2 e a PEEP foram ajustadas em conjunto, de acordo com tabela 2 a fim de obter uma PaO_2 entre 55–80 mmHg ou uma saturação de oxigênio (SatO_2) entre 88–95%. Inicialmente, após a randomização, a PEEP foi ajustada em 14 cmH₂O e FIO_2 em 0,7.

Tabela 2. PEEP e FiO_2

FiO_2	30 %	40 %	40 %	50 %	50 %	60 %	70 %	70 %	70 %	80 %	90 %	90 %	90 %	100%
PEEP	5	5	8	8	10	10	10	12	14	14	14	16	18	18-24

*Relação I:E=1:1 a 1:2; Fluxo inspiratório de 60L/min; pausa inspiratória de 0,5 segundo.

*Frequência respiratória para manter PaCO_2 entre 35mmHg e 60mmHg.

*PEEP e FiO_2 ajustadas conforme tabela acima, para manter a $\text{SpO}_2 \geq 88\%$ ou $\text{PaO}_2 \geq 55\text{mmHg}$.

Figura 2. Fotografia representativa da UTI experimental do Laboratório de Pneumologia Experimental (LIM-09).

3.6. Coleta do material

Ao final do protocolo de lesão/ventilação os animais foram sacrificados. Para o sacrifício foi infundido um bolus adicional de sedação e uma dose de heparina não-fracionada endovenosa. Na sequência, os animais foram exsanguinados por canulação da aorta abdominal.

Após o sacrifício, foi realizada a esternotomia mediana para acesso aos pulmões. Estes foram retirados em bloco (Figura 3), submetidos a manobra de recrutamento pulmonar fora da caixa torácica com pressão inspiratória de 25 cmH₂O e sua conexão com o ventilador mecânico pinçada. Em seguida, o pulmão direito foi clampeado, retirado do bloco e fragmentos das regiões anterior e posterior do ápice e da base foram coletados e estocados em RNAlater

(Applied Biosystems, Foster City, CA). O tecido foi armazenado da seguinte forma: inicialmente overnight em geladeira de 2-8°C e após em freezer -80°C.

Após dissecação, o bloco contendo traqueia, brônquio fonte esquerdo e o pulmão esquerdo foi conectado a um sistema pressurizado e o pulmão recrutado com formalina tamponada a 10% a uma pressão de 25 cmH₂O. O bloco foi mantido ligado ao sistema a uma pressão 10 cmH₂O para fixação dos tecidos por 48 horas. Em seguida, o pulmão foi seccionado e fragmentos das regiões anteriores e posteriores do ápice e da base foram coletados, processados rotineiramente e embebidos em parafina para representação histológica.

Figura 3. Fotografia dos blocos pulmonares dos grupos Sham (A), Lesão (B) e Lesão+VM (C).

Cortes histológicos sagitais com 5µm de espessura de cada região foram corados por Hematoxilina & Eosina para avaliação histológica inicial e pela coloração de Picro-Sirius para identificação de fibras colágenas.

3.7. Descarte do animal

Ao final da necropsia e coleta de materiais, os animais foram condicionados em saco plástico específico para descarte de animais e encaminhados ao depósito de lixo biológico da FMUSP, devidamente identificados, para posterior incineração.

3.8. Análise Morfológica

A caracterização histológica da lesão foi determinada por meio de análise de imagem, utilizando-se o *software* Image-Pro[®] Plus 4.1 para Windows[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), instalado em um computador PC, o qual foi conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color VideoCamera, Victor Company of Japan Limited, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha).

Uma função específica foi desenvolvida no Software de Análise de Imagem, com a qual os seguintes parâmetros foram determinados em cada campo: área de ar, área de tecido, número de alvéolos e perímetro dos alvéolos.

As seguintes variáveis foram avaliadas nas lâminas coradas em Hematoxilina & Eosina nas regiões anteriores e posteriores do pulmão esquerdo de cada animal:

A) Parâmetros arquiteturais:

1. Área alveolar (μm^2): obtido pela relação entre a área de ar e o número de alvéolos em cada campo. A medida foi realizada em 10 campos no aumento de 100X.
2. Perda de área alveolar (μm^2): obtido pela área alveolar de cada campo dos animais dos grupos Lesão e Lesão+VM subtraída da mediana da área alveolar de cada região no grupo Sham. Esse parâmetro foi definido para estimar a variação de área alveolar nos grupos Lesão e Lesão+VM quando comparado ao pulmão normal (grupo Sham).
3. Índice de espessamento septal (μm): obtido pela relação entre a área de tecido e o perímetro total de superfície alveolar por campo. A medida foi realizada em 10 campos no aumento de 100X.

B) Parâmetros inflamatórios:

1. Densidade neutrofílica (células/ mm^2): obtida pela relação entre o número de neutrófilos e a área de tecido pulmonar em 20 campos no aumento 400X.
2. Índice de membrana hialina: determinado pela relação entre o número de alvéolos contendo membrana hialina e o número total de alvéolos em cada campo. A medida foi realizada em 10 campos no aumento de 100X.
3. Índice de hemorragia alveolar: obtido pela relação entre o número de alvéolos contendo acima de dez hemácias no lúmen e o número total de

alvéolos em cada campo. A medida foi realizada em 10 campos no aumento de 100X.

4. Índice de edema intraalveolar: obtido pela relação entre o número de alvéolos contendo edema e o número total de alvéolos em cada campo. A medida foi realizada em 10 campos no aumento de 100X.

3.8.1. Proporção de Fibras de Colágeno

Esse índice foi obtido com morfometria convencional em cortes histológicos corados por Picro-Sirius (Lanças et al., 2006). Usamos uma grade de 100 pontos com uma área conhecida ($173250 \mu\text{m}^2$ em aumento de 200X) acoplada à imagem gerada pelo analisador de imagem. A proporção de fibras de colágeno no tecido alveolar foi determinada pela divisão do número de pontos incidentes sobre a fibra de colágeno pelo número total de pontos incidentes sobre o septo alveolar em cada campo. As medidas foram realizadas em 15 campos de tecido pulmonar em cada região no aumento de 200X.

Para a apresentação dos resultados os valores de cada parâmetro histológico dos grupos Lesão e Lesão+VM foram normalizados pelos valores do grupo Sham.

3.9. Análise Molecular

3.9.1. Extração do RNA

As amostras foram pesadas e o RNA total foi extraído a partir de aproximadamente 15 mg de tecido pulmonar com *Ambion RNAqueous Kit* (Life Technology, Applied Biosystems, Foster City, CA) conforme o protocolo do fabricante. O material foi homogeneizado em tubos com esferas (*beads*) de cerâmica 1,4 mm em homogeneizador *Precellys* acoplado ao *Cryolys* (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, França) para manter a temperatura em 4°C. Foram realizados dois ciclos de 5 segundos com intervalo de 10 segundos entre os ciclos com 6000 rpm. Ao final do processo, foi obtido um volume de 50µL. O RNA foi armazenado a -80°C para posterior utilização.

3.9.2. Quantificação do RNA

A qualidade e a quantidade de RNA foi avaliada com o Agilent RNA 6000 Nano Kit no 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany) conforme o protocolo do fabricante.

3.9.3. Síntese de c-DNA

DNA complementar foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total com o kit comercial *High Capacity RNA to c-DNA Master Mix* (Applied Biosystems, Life

Technology, Foster City, CA), de acordo com as instruções do fabricante, resultando em uma solução com volume final de 20µL.

3.8.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os *primers* para Versican, Colágeno tipo I e Colágeno tipo III foram desenhados usando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e as sequências foram verificadas no Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para cada um dos genes alvo, foi realizada reação em cadeia da polimerase para padronizar a temperatura de anelamento e o tamanho do *amplicon*. A amplificação ocorreu a partir de cDNA obtido pela reação de transcrição reversa do RNA total de amostras diversas. A reação realizada no *Termociclador Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) consistia de 35 ciclos: início com temperatura de 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelação a 68°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 1 minuto. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose 2,5% e os *amplicons* visualizados em luz ultravioleta (UV).

3.9.5. PCR quantitativo em tempo real

3.9.5.1. Versican, Colágeno tipo I e Colágeno tipo III

Dois microlitros de cDNA de cada amostra foram misturadas em 0,4 µL de *primer forward* (*sense*), 0,4 µL de *primer reverse* (*anti-sense*), 10 µL de *Power*

SYBR GREEN (Applied Biosystems, Life Technology, Foster City, CA) e 7,2 µL de água DEPC em placa específica (MicroAmp, Applied Biosystems, Life Technology, Foster City, CA) e selada. Os níveis de RNAm foram quantificados no 7300 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Life Technology, Foster City, CA). A amplificação foi realizada em 35 ciclos com temperatura inicial de 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelação a 68°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 30 segundos.

Na fase de desnaturação, o *SYBR Green dye* permanece na solução e a emissão de fluorescência é acentuadamente reduzida. Quando a polimerização é completa o *SYBR Green dye* se liga à dupla-fita de DNA e a fluorescência é liberada. O ciclo no qual a fluorescência do meio ultrapassa aquela gerada de fundo é denominado "threshold cycle" (Ct). Esse valor foi utilizado para quantificar o produto amplificado em cada amostra.

O método de quantificação relativa ($\Delta\Delta C_t$) foi escolhido para a análise dos níveis de RNAm e o gene GADPH (Glicerolaldeído-3-Fosfatase Desidrogenase) foi usado como referência para a normalização.

Os oligonucleotídeos foram desenhados tomando como base a sequência de mRNA dos genes de interesse da espécie *Sus scrofa* (Tabela 3) tal como está depositada no banco de dados público de informações genômicas.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores (*primers*) *sense* e *anti-sense* para os genes versican, colágeno tipo I e colágeno tipo III.

Gene	Sense (posição 5'-3')	Anti-sense (posição 5'-3')	Temperatura de anelamento
Versican	TGT GTT CCA CAT CAC TGC TCC CAA	AAG CCG TTC CTC CAC GCT GC	68°C
Colágeno tipo I	GCG GCA GGA GGT TTC GGC AA	CTG GGT CAC CGG CGGAGG TA	68°C
Colágeno tipo III	AAG GGC AGG GAA CAA CTG ATG GTG	CAT GAC CAT TGG GAG GGC GGG	68°C

3.9.5.2. Decorin e Biglican

A quantificação da expressão dos genes foi realizada utilizando o sistema *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este ensaio utiliza sondas específicas aos transcritos que devem ser quantificados. As sondas foram marcadas na extremidade 5' com 6-carboxifluoresceína (FAM) e carregam 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) na sua extremidade 3'. Numa sonda não ligada ao DNA, a pequena distância entre FAM (*reporter dye*) e TAMRA (*quencher*) inibe a emissão da fluorescência pela primeira. Durante a PCR, à medida que os transcritos de interesse foram sendo amplificados, as sondas se ligaram de maneira específica aos produtos de amplificação e a FAM foi liberada pela atividade exonuclease da Taq polimerase. Dessa maneira, a intensidade da fluorescência da FAM corresponde à quantidade de produto de amplificação do transcrito analisado.

Foram usados *amplicons* menores que 250 pares de base. A abundância dos transcritos de genes *house-keeping* (GADPH) foi usada para avaliar a integridade do RNA no material analisado e para servir como normalização para os genes de interesse. Os oligonucleotídeos foram desenhados tomando como base a sequência de mRNA dos genes de interesse (Tabela 4) tal como está depositada no banco de dados público de informações genômicas.

Tabela 4. Referência dos ensaios utilizados para os genes decorin e biglican e tamanho dos respectivos *amplicons*.

Gene	Ensaio (número)	Tamanho do <i>amplicon</i>
Decorin	Ss03382179_s1	67
Biglican	Ss03375454_u1	74

A análise molecular do tecido pulmonar foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP sob responsabilidade do Professor Chin Jia Lin.

3.10. Análise de mecânica pulmonar e imagem

Os dados de mecânica pulmonar foram obtidos através do monitor NICO2® conectado ao aparelho de impedância elétrica. Este equipamento foi conectado a um computador com um aplicativo desenvolvido no software *LabView* (National Instruments, EUA) que armazenou os dados de fluxo, volume corrente e pressão conjuntamente com os dados de impedância elétrica. Esses dados foram posteriormente avaliados através de outro aplicativo para obtenção

de valores de complacência pulmonar pelo método de regressão linear múltipla, nos seguintes momentos: durante a LPIV e ventilação padrão com PEEP de 15 cmH₂O após a LPIV para o grupo Lesão; e ao final das 40 horas de ventilação mecânica protetora e ventilação padrão com PEEP de 15 cmH₂O após LPIV e após 40 horas de VM para o grupo Lesão+VM.

Para avaliarmos a distribuição da ventilação regional, o pulmão foi dividido em quatro quadrantes (anterior direito, posterior direito, anterior esquerdo e posterior esquerdo) para obtenção dos valores de delta Z (variação da impedância elétrica em cada região escolhida).

Figura 4. Imagem capturada do monitor da tomografia de impedância elétrica demonstrando a análise da ventilação regional.

3.11. Análise estatística

As variáveis foram testadas para normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQ; percentil 25-75%). As variáveis funcionais foram comparadas usando o teste não-paramétrico Wilcoxon para medidas pareadas. Os parâmetros histológicos e de expressão gênica foram comparados entre os grupos (Sham e Lesão para a tabela 5; e Lesão e Lesão+VM para os demais resultados) e entre as regiões anteriores e posteriores usando um modelo linear de efeitos mistos. Para cada variável, foram considerados dois valores de cada região (anterior e posterior), dois vindos do ápice pulmonar e dois da base pulmonar. As variáveis categóricas grupo e região (anterior ou posterior) e sua interação (quando significativa) foram modeladas como efeitos fixos. As variáveis foram tratadas como medidas repetidas (regiões anterior e posterior; ápice e base). Os parâmetros que apresentaram interação significativa entre grupo e região foram testados para avaliar a diferença entre as regiões em cada grupo com teste pareado de Wilcoxon. As correlações entre as variáveis funcionais e as variáveis histológicas; e entre os parâmetros ventilatórios e as variáveis histológicas ou de expressão gênica foram realizadas com o teste de Spearman para medidas não-paramétricas. Para a análise foi utilizado o pacote estatístico SPSS (SPSS, Chicago, EUA) versão 17. Foram consideradas significantes as análises com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. O Modelo experimental

Apresentamos a seguir a caracterização histológica da lesão pulmonar obtida com o método de lavagem pulmonar associada à LPIV, assim como a comparação dos diferentes parâmetros analisados entre o grupo Lesão e o grupo Sham (Tabela 5).

O modelo experimental de SDRA desenvolvido no Laboratório de Pneumologia Experimental (LIM-09) mostra evidência de lesão tecidual associada à disfunção fisiológica (conforme demonstrado na Tabela 5). A lesão histológica nos pulmões obtida por este modelo é caracterizada por um dano alveolar difuso, semelhante ao observado em humanos, isto é, formação de membrana hialina, edema intraalveolar, hemorragia e exsudato neutrofílico.

Figura 5. Fotografias demonstrando as alterações histológicas observadas no dano alveolar difuso (hemorragia, edema, infiltrado neutrofílico e membrana hialina em humanos (A, B, C e D) e as mesmas alterações histológicas observadas no nosso modelo experimental em porcos (E, F, G e H).

A comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos grupos Sham e Lesão são apresentadas abaixo.

Parâmetros inflamatórios: Houve aumento significativo da densidade neutrofílica, do índice de edema intraalveolar, do índice de hemorragia alveolar e do índice de membrana hialina no grupo Lesão quando comparado com o grupo Sham.

Parâmetros arquiteturais: O grupo Lesão mostrou menor área alveolar e maior índice de espessamento septal quando comparado ao grupo Sham.

Parâmetros funcionais: O grupo lesão demonstrou menor pressão parcial de oxigênio e menor complacência pulmonar comparado ao grupo Sham.

Tabela 5. Parâmetros histológicos e funcionais nos grupos Sham e Lesão.

	Região	Sham	Lesão	P (entre grupos)
Área alveolar em $\mu\text{m}^2 (\times 10^3)$	Anterior	14,8 (13,1 – 15,1)	5,9 (4,1 – 13,2)	0,012
	Posterior	9,2 (8,4 – 9,9)	6,4 (3,7 – 10,1)	
Índice de espessamento septal (μm^2)	Anterior	2,93 (2,84 – 3,15)	4,79 (3,4 – 6,1)	0,004
	Posterior	3,27 (3,15 – 3,69)	4,39 (3,51 – 5,04)	
Índice de membrana hialina	Anterior	0	0,12 (0,06 – 0,18)	0,002
	Posterior	0	0,03 (0,01 – 0,07)	
Densidade neutrofílica ($\text{células} \times 10^3/\text{mm}^2$)	Anterior	1,14 (0,85 – 1,52)	2,10 (1,29 – 3,41)	0,019
	Posterior	0,95 (0,74 – 1,8)	1,71 (0,89 – 2,73)	
Índice de hemorragia alveolar	Anterior	0	0,04 (0,01 – 0,07)	0,001
	Posterior	0	0,02 (0,008 – 0,06)	
Índice de edema intraalveolar	Anterior	0 (0 – 0,0048)	0,02 (0,01 – 0,08)	0,030
	Posterior	0 (0 – 0,0048)	0,019 (0,01 – 0,07)	
PaO₂ (mmHg) *		401,0 (386 – 533)	42,9 (33,5 – 66,8)	<0,001
Complacência pulmonar (mL/cmH₂O) §		20,0 (19,2 – 29,4)	10,4 (8,3 – 14,0)	0,001

*Pressão parcial de oxigênio: no grupo Sham a gasometria foi colhida com PEEP de 5 cmH₂O; no grupo lesão a gasometria foi colhida após a lesão e manobra de recrutamento alveolar usando PEEP de 10cmH₂O

§ Complacência na PEEP de 15 cmH₂O

Nas variáveis acima, não houve diferença significativa entre as regiões anterior e posterior. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil (IQ 25%-75%)

4.2. Evolução temporal da lesão

Os dados a seguir representam a evolução das variáveis após 40 horas de ventilação mecânica.

Houve diminuição significativa da densidade neutrofílica no grupo Lesão+VM ($p=0,02$) (Figuras 6 e 7), e uma tendência ($p=0,09$) à redução do índice de hemorragia alveolar (Figuras 8 e 9) quando comparado ao grupo Lesão. O índice de hemorragia alveolar e a densidade neutrofílica não exibiram diferenças regionais (Figuras 6 e 8). Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos na análise dos índices de membrana hialina e edema intraalveolar.

Figura 6. Densidade neutrofílica (células/mm²) nos grupos Lesão e Lesão+VM. A densidade neutrofílica foi maior no grupo Lesão ($p=0,02$). Não há diferença estatística entre as regiões anteriores e posteriores.

Figura 7. Densidade neutrofílica no grupo Sham (A), grupo Lesão (B) e grupo Lesão+VM (C).

Figura 8. Índice de hemorragia alveolar nos grupos Lesão e Lesão+VM. Há uma tendência à redução do índice de hemorragia alveolar no grupo Lesão+VM ($p=0,09$). Não há diferença estatística entre as regiões anteriores e posteriores.

Figura 9. Hemorragia alveolar no grupo Sham (A), grupo Lesão (B) e grupo Lesão+VM (C).

4.2.1. Progressão regional da lesão

Houve aumento significativo no índice de espessamento septal no grupo Lesão+VM quando comparado ao grupo Lesão ($p < 0,001$) (Figuras 10 e 11). A avaliação regional mostrou que o espessamento septal foi maior nas regiões anteriores em relação às regiões posteriores nos grupos Lesão e Lesão+VM ($p = 0,007$) (Figura 10). A análise da área alveolar mostrou que o grupo Lesão+VM apresenta uma distribuição mais heterogênea do grau de abertura alveolar comparado ao grupo Lesão ($p = 0,049$) (Figuras 12 e 14). A avaliação regional demonstrou que a área alveolar das regiões posteriores foi menor em relação às regiões anteriores ($p = 0,046$). A análise post-hoc mostrou que essa diferença se dá às custas do grupo Lesão+VM ($p = 0,012$) (Figura 12). Por outro lado, a perda de área alveolar (variação de área alveolar em relação ao pulmão normal do grupo Sham) apresentou uma distribuição mais heterogênea no grupo Lesão quando comparado ao grupo Lesão+VM ($p = 0,026$). As regiões

anteriores mostraram maior perda de área alveolar comparado às regiões posteriores ($p=0,018$), principalmente às custas do grupo Lesão (análise post-hoc $p=0,05$) (Figura 13).

Figura 10. Espessamento septal em μm nos grupos Lesão e Lesão+VM.

* $P < 0,01$ (entre região anterior e posterior).

Figura 11. Fotografias representativas do espessamento septal nas regiões anteriores dos grupos Sham (A); Lesão (B); e Lesão+VM (C).

Figura 12. Área alveolar em μm^2 nos grupos Lesão e Lesão+VM. Observe a distribuição heterogênea das áreas alveolares no grupo Lesão+VM. Regiões anteriores apresentam maior área alveolar quando comparado às regiões posteriores ($p=0,046$). A análise post-hoc mostra que essa diferença se dá às custas do grupo Lesão+VM (* $p=0,012$).

Figura 13. Perda de área alveolar em μm^2 ($\times 10^3$) nos grupos Lesão e Lesão+VM. Observe a distribuição heterogênea da perda de área alveolar no grupo Lesão. *Indica que a região anterior tem maior perda de área alveolar que a região posterior no grupo Lesão ($p=0,05$).

Figura 14. Fotografias representativas da áreas alveolares nas regiões posteriores nos grupos Sham (A); Lesão (B); e Lesão+VM (C).

A avaliação regional dos parâmetros inflamatórios mostrou que as regiões anteriores dos grupos Lesão e Lesão+VM apresentaram maior índice de membrana hialina em relação às regiões posteriores ($p=0,01$) (Figuras 15 e 16). O índice de edema intraalveolar também foi maior nas regiões anteriores comparadas às regiões posteriores nos grupos Lesão e Lesão+VM ($p=0,024$) (Figuras 17 e 18).

Figura 15. Índice de membrana hialina nos grupos Lesão e Lesão+VM.
* P= 0,01 (entre região anterior e posterior).

Figura 16. Fotografias representativas da membrana hialina nas regiões anteriores dos grupos Sham (A); Lesão (B); e Lesão+VM (C).

Figura 17. Índice de edema intraalveolar nos grupos Lesão e Lesão+VM. As regiões anteriores apresentaram maior índice de edema intraalveolar comparado às regiões posteriores (* $p=0,024$).

Figura 18. Fotografias representativas do edema intraalveolar nas regiões anteriores nos grupos Sham (A); Lesão (B); Lesão+VM (C).

4.2.2. Sinalização para o processo fibroproliferativo

Após 40 horas de ventilação mecânica, a análise da expressão gênica mostrou que o grupo Lesão+VM apresenta maior expressão de colágeno tipo I em relação ao grupo Lesão ($p < 0,001$) (Figura 19). O grupo Lesão+VM apresentou um padrão de distribuição mais heterogêneo da expressão de colágeno tipo I em relação ao grupo Lesão ($p = 0,001$) (Figura 19). A avaliação regional mostrou que a expressão de colágeno tipo I foi maior nas regiões anteriores comparada às regiões posteriores ($p = 0,001$). A análise post-hoc mostrou que essa diferença se dá às custas do grupo Lesão+VM ($p = 0,015$) (Figura 19). A expressão de colágeno tipo III foi maior no grupo Lesão+VM em relação ao grupo Lesão ($p < 0,01$) (Figura 20). A expressão de versican (Figura 21), decorin (Figura 22) e biglican (Figura 23) também foi maior no grupo Lesão+VM em relação ao grupo Lesão ($p < 0,001$). A análise das expressões gênicas de colágeno tipo III, versican, decorin e biglican não demonstraram diferenças regionais.

Figura 19. Expressão de colágeno tipo I nos grupos Lesão e Lesão+VM ($\Delta\Delta Ct$). Expressão de colágeno tipo I foi maior no grupo Lesão+VM ($p < 0,001$) *Região anterior foi maior que a região posterior ($p = 0,015$).

Figura 20. Expressão de colágeno tipo III nos grupos Lesão e Lesão+VM (ΔΔCt). Expressão de colágeno tipo III foi maior no grupo Lesão+VM (p<0,01).

Figura 21. Expressão de versican nos grupos Lesão e Lesão+VM (ΔΔCt). Expressão de versican foi maior no grupo Lesão+VM (p<0,001).

Figura 22. Expressão de decorin nos grupos Lesão e Lesão+VM (ΔΔCt). Expressão de decorin foi maior no grupo Lesão+VM ($p < 0,001$).

Figura 23. Expressão de biglican nos grupos Lesão e Lesão+VM (ΔΔCt). Expressão de biglican foi maior no grupo Lesão+VM ($p < 0,001$).

A análise morfométrica da proporção de volume de fibras colágenas não evidenciou diferença estatística entre os grupos ou entre as regiões anteriores e posteriores (Figuras 24 e 25).

Figura 24. Proporção de fibras colágenas nos grupos Lesão e Lesão+VM. Não há diferença estatística entre os grupos ou entre as regiões.

Figura 25. Proporção de fibras colágenas. (A) Grupo Sham; (B) grupo Lesão; e (C) grupo Lesão+VM.

4.2.3. Evolução funcional do pulmão

A análise dos parâmetros funcionais na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O mostrou que após o tempo prolongado de ventilação mecânica protetora houve melhora da PaO₂ ($p=0,006$) no grupo Lesão+VM em relação ao grupo Lesão (Figura 26). Não foi observada diferença estatística entre os dois grupos em relação à complacência pulmonar nos mesmos padrões. Entretanto, a análise do grupo Lesão+VM mostrou piora na complacência pulmonar na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O após 40 horas de ventilação mecânica protetora em relação a gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O pós-LPIV ($p=0,01$) (Figura 27).

Figura 26. Pressão parcial de oxigênio em mmHg na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O nos grupos Lesão e Lesão+VM. PaO₂ foi maior no grupo Lesão+VM ($p=0,006$).

Figura 27. Complacência pulmonar (em mL/cmH₂O) na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O, o grupo Lesão+VM tem complacência pulmonar pior ao final das 40 horas comparado ao momento pós-LPIV ($p=0,015$).

A análise da ventilação regional pela TIE demonstra que, conforme o estabelecido pelo nosso protocolo, o grupo Lesão recebeu maior volume corrente comparado ao grupo Lesão+VM ($p<0,001$) (Figura 28, 29 e 30). Além disso, a avaliação regional mostrou uma tendência da ventilação (DeltaZ) se concentrar nas regiões anteriores em relação às regiões posteriores no grupo Lesão (na LPIV) ($p=0,055$) (Figura 28 e 29).

Figura 28. Ventilação regional (DeltaZ) nos grupos Lesão e Lesão+VM. A ventilação regional (DeltaZ) é maior no grupo Lesão em relação ao grupo Lesão+VM. * Indica tendência da ventilação se concentrar nas regiões anteriores no grupo Lesão ($p=0,055$).

Figura 29. Imagem capturada do monitor TIE demonstrando a ventilação regional em um animal do grupo Lesão no momento da LPIV. No gráfico ao lado, observa-se os valores de DeltaZ (ventilação regional) no momento da LPIV.

Figura 30. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão+VM ao final das 40 horas de VM. No gráfico ao lado, observa-se os valores de DeltaZ que foram semelhantes nas regiões anteriores e posteriores dos pulmões direito e esquerdo.

A análise da ventilação regional pela TIE na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O demonstrou que a distribuição da ventilação é mais heterogênea no grupo Lesão, ou seja, regiões anteriores e posteriores diferentes, em relação ao grupo Lesão+VM ($p=0,043$) (Figura 31, 32 e 33). A ventilação se concentrou mais nas regiões anteriores quando comparada às regiões posteriores ($p=0,041$). A análise post-hoc mostrou que essa diferença se dá às custas do grupo Lesão ($p=0,03$) (Figura 31 e 32).

Figura 31. Ventilação regional (DeltaZ) na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O (GP PEEP 15). * Indica que a região anterior recebeu maior volume corrente comparada à região posterior do grupo Lesão ($p=0,03$).

Figura 32. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O após LPIV. No gráfico ao lado, observa-se que a ventilação regional (DeltaZ) foi maior nas regiões anteriores ("upper").

Figura 33. Imagem capturada do monitor da TIE de um animal do grupo Lesão+VM na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O após 40 horas de ventilação mecânica. No gráfico ao lado, observa-se que a ventilação regional (DeltaZ) foi semelhante nas regiões anteriores e posteriores dos pulmões direito e esquerdo.

4.3. Correlação da gravidade da lesão pulmonar com parâmetros da ventilação

No grupo Lesão, a ventilação regional (DeltaZ) durante a ventilação lesiva (LPV) se correlacionou positivamente com a densidade neutrofílica ($r=0,48$; $p=0,044$) (Figura 34); com o índice de membrana hialina ($r=0,56$; $p=0,016$) (Figura 35); e com o índice de hemorragia alveolar ($r=0,74$; $p<0,001$) (Figura 36).

Figura 34. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com a densidade neutrofílica (células $\times 10^3/\text{mm}^2$) no grupo Lesão ($r=0,48$; $p=0,044$).

Figura 35. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com o índice de membrana hialina no grupo Lesão ($r=0,56$; $p=0,016$).

Figura 36. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com o índice de hemorragia no grupo Lesão ($r=0,74$; $p<0,001$).

4.4. Correlação da ventilação regional com expressão de componentes da MEC

A ventilação regional no grupo Lesão+VM (DeltaZ) ao final das 40 horas (hs) de protocolo se correlaciona positivamente com a expressão gênica de colágeno tipo I ($r=0,49$; $p=0,05$) (Figura 37), colágeno tipo III ($r=0,65$; $p=0,006$) (Figura 38) e versican ($r=0,73$; $p=0,001$) (Figura 39).

Figura 37. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com a expressão de colágeno tipo I no grupo Lesão+VM ($r=0,49$; $p=0,05$).

Figura 38. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com a expressão gênica de colágeno tipo III no grupo Lesão+VM ($r=0,65$; $p=0,006$).

Figura 39. Correlação da ventilação regional (DeltaZ) com a expressão de versican no grupo Lesão+VM ($r=0,73$; $p=0,001$).

4.5. Correlação dos parâmetros morfológicos com variáveis fisiológicas (troca gasosa e mecânica pulmonar)

A densidade neutrofílica nos grupos Lesão e Lesão+VM apresentou correlação negativa com a pressão parcial de oxigênio na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O ($r=-0,59$; $p= 0,012$) (Figura 40). O espessamento septal nos grupos Lesão e Lesão+VM se correlacionou de forma negativa com a complacência pulmonar na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O ($r=-0,62$; $p=0,012$) (Figura 41).

Figura 40. Correlação da densidade neutrofílica (células/mm²) com a PaO₂ (mmHg) na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O ($r=-0,59$; $p= 0,012$).

Figura 41. Correlação do espessamento septal (μm) e complacência pulmonar (mL/cmH₂O) na gasometria padrão com PEEP de 15 cmH₂O ($r=-0,62$; $p=0,012$).

5. DISCUSSÃO

5.1. O modelo

Esse estudo mostra a progressão histopatológica e a apresentação regional da lesão pulmonar aguda em um modelo experimental de SDRA em suínos ventilados por longo prazo.

Existem diversos modelos experimentais de lesão pulmonar aguda descritos na literatura. O desenvolvimento de um modelo que reproduza as alterações agudas e crônicas observadas na SDRA em humanos e que possibilite um estudo da patogênese e progressão da lesão tem sido um desafio (Martin e Matute-Bello, 2011). Em geral, todos os modelos existentes se baseiam na principal característica da SDRA: a lesão da barreira alvéolo-capilar. Tendo em vista o mecanismo inicial da lesão, os modelos são divididos em três grupos: injúria do endotélio (exemplos: modelos baseados na administração de ácido oleico e endotoxina), injúria do epitélio (modelos desenvolvidos a partir da instilação de ácido clorídrico, administração de bleomicina, lavagem de surfactante e ventilação mecânica) e injúria do epitélio e do endotélio (exemplo: lesão por isquemia e reperfusão) (Matute-Bello et al., 2008).

Os modelos baseados na ventilação mecânica levam em consideração os princípios da “lesão pulmonar induzida pelo ventilador”, ou seja, a VM se inadequadamente ajustada pode causar ou mesmo exacerbar a lesão

pulmonar (Slutsky, 2005). O estresse mecânico sobre o parênquima, resultado de altas pressões ou volume e reabertura e fechamento cíclico de alvéolos ativa vias intracelulares, processo denominado “mecanotransdução”, com liberação de mediadores inflamatórios (biotrauma) (Vlahakis e Hubmayr, 2005).

O modelo de lavagem salina, desenvolvido por Lachmann et al. em 1980, baseia-se na observação de que a SDRA está relacionada à depleção e disfunção do surfactante. Nesse modelo, solução salina quente é instilada no pulmão visando reduzir a concentração de surfactante no parênquima e com isso alterar a tensão superficial dos alvéolos. Os modelos de lavagem se caracterizam por uma alteração homogênea, mas com recuperação funcional em horas. É sabido que lavagem salina seguida por ventilação com altos volumes e baixo PEEP pode produzir uma lesão similar à observada em pacientes com SDRA (Matute-Bello et al., 2008). Portanto, decidimos associar ventilação mecânica lesiva à lavagem do surfactante, pois nos interessava um modelo que fosse apropriado para estudo de ventilação a longo prazo.

O estudo em animais de grande porte nos permitiu induzir uma lesão com parâmetros histológicos similares aos que são observados em humanos com SDRA grave, caracterizada por dano alveolar difuso, isto é, exsudato neutrofílico, edema alveolar, membrana hialina, hemorragia e um padrão heterogêneo de sinalização para o processo fibroproliferativo. Esses achados foram acompanhados de hipoxemia aguda e redução da complacência pulmonar.

Além disso, nosso estudo foi um dos poucos em que os animais são submetidos a longo período de ventilação mecânica e no qual foi feita uma análise fisiopatológica regional. Os animais ventilados por 40 horas mostraram

que as alterações pulmonares progridem com redução do infiltrado neutrofílico e da hemorragia alveolar; aumento do colapso, do espessamento septal e da sinalização para o remodelamento da matriz extracelular.

O disparo para o processo fibroproliferativo inicia-se precocemente no curso da SDRA (Santos, 2008), porém a deposição de matriz rica em colágeno parece ser um processo mais tardio (Fukuda et al., 1987). Após 40 horas de ventilação mecânica, os animais já demonstravam septos alveolares espessados, com marcada deposição de membrana hialina e perda de área alveolar, principalmente nas regiões anteriores (não-dependentes). Surpreendentemente, o edema intraalveolar também mostrou maior acúmulo nessas mesmas regiões, diferente do que se acreditava na literatura (Broccard et al., 1997; Gattinoni et al., 1987).

5.2. Distribuição regional e mecanismos da lesão

O padrão de distribuição da lesão pulmonar na SDRA é de grande interesse para a determinação dos parâmetros ventilatórios, já que a heterogeneidade da lesão determina em parte a dificuldade de manuseio clínico desses pacientes. Estudos em TC foram essenciais para a caracterização da lesão na SDRA (Caironi et al., 2006). Até a década de 80, SDRA era considerada um processo homogêneo no parênquima pulmonar, usualmente demonstrada pelas radiografias anteroposterior de tórax. Os primeiros trabalhos em TC mudaram drasticamente essa visão. O principal achado na TC de tórax em pacientes com SDRA é uma lesão heterogênea

representada por áreas de insuflação relativamente normais do parênquima pulmonar localizadas nas regiões não dependentes, opacificação em vidro fosco nas regiões intermediárias, e consolidação nas regiões posteriores (dependentes) (Gattinoni et al., 2001; Gattinoni e Pesenti, 2005). Em adição ao gradiente de densidade vertical, existe também um gradiente cefalocaudal com densidade aumentada do ápice pulmonar para a base (Puybasset et al., 2000b).

A quantidade de tecido considerado normalmente aerado em pacientes adultos com SDRA, localizado nas regiões não dependentes, em média pesaria 200 a 400 g, o que corresponderia ao pulmão de uma criança em torno dos 4 a 5 anos de idade. Gattinoni et al. (1987) investigaram a relação entre a anatomia e a mecânica respiratória na lesão pulmonar aguda. O achado interessante foi que a complacência pulmonar foi relacionada às áreas de tecido considerado normalmente aerado, mas não relacionado à quantidade de tecido não aerado ou às regiões pobremente aeradas. Esses estudos em tomografia computadorizada resultaram no conceito de *baby lung* (Gattinoni et al., 1987).

Nossos achados estão parcialmente de acordo com esses estudos. Os dados de tomografia de impedância elétrica mostram que as regiões não dependentes foram as que receberam a maior fração de ventilação regional, principalmente durante a lesão induzida pelo ventilador (representada pelo grupo Lesão). Entretanto, a análise histológica das áreas dos alvéolos no grupo Lesão mostrou uma redução difusa dos lúmens alveolares em todas as regiões, com uma maior perda de área alveolar nas regiões anteriores (não dependentes) em relação ao grupo Sham. Ao final das 40 horas de ventilação mecânica protetora, o que se observa é um parênquima pulmonar com lúmens

alveolares reduzidos e septos espessos; as regiões posteriores (dependentes) são as mais colapsadas, entretanto, as regiões anteriores são as que mais perdem área alveolar. Em consonância com esses achados, as regiões anteriores também apresentam maior espessamento septal associado a acentuada deposição de membrana hialina, retenção de edema no interior dos alvéolos e sinalização para a produção de colágeno tipo I.

O conhecimento sobre a heterogeneidade da lesão pulmonar é provavelmente uma das chaves para a compreensão dos mecanismos de lesão. Estudos prévios mostraram resultados controversos em relação à distribuição da lesão pulmonar. Broccard et al. (1997) mostraram que as regiões posteriores dos pulmões de cachorros com lesão pulmonar aguda induzida por ácido oleico e ventilados em posição supina, com PEEP maior ou igual a 10 cmH₂O, exibiram maior escore histológico final quando comparadas às regiões anteriores. Caruso et al. (2003) observaram que ventilação com baixo volume corrente e sem PEEP em ratos saudáveis induz resposta pró-inflamatória e pró-fibrogênica, principalmente nas regiões anteriores. Tsuchida et al. (2006) demonstraram que em ratos submetidos a ventilação lesiva (volume corrente de 25 mL/Kg e PEEP de 4 a 7 cmH₂O), a lesão das vias aéreas ocorreu em ambas áreas atelectásicas e não atelectásicas, já a lesão alveolar predominou nas regiões anteriores. Caruso (2006) propõe que essa discordância poderia ser resultado da utilização de diferentes parâmetros ventilatórios. O uso de uma PEEP mais alta no estudo de Broccard et al (1997) poderia ter reduzido a atelectasia nas regiões dependentes e hiperdistendido as regiões não dependentes, causando um desvio da ventilação no sentido das

regiões dependentes. O nosso estudo mostra que as regiões anteriores durante a “lesão induzida pelo ventilador” receberam a maior parte do volume corrente (conforme o nosso protocolo). O maior volume de ventilação foi diretamente relacionado à densidade neutrofílica no tecido pulmonar, à deposição de membrana hialina e à hemorragia alveolar.

Nossos dados sustentam o conceito de que mesmo a região anterior, considerada mais aerada, está envolvida pelo processo inflamatório (Bellani et al., 2009). A análise morfológica mostrou um maior acúmulo de edema e hemorragia alveolar nos pulmões lesados (grupo Lesão), com predomínio do edema nas regiões anteriores. Na progressão da lesão, observamos uma tendência à redução de hemorragia alveolar, entretanto, o edema intraalveolar se mantém, permanecendo mais acentuado nas regiões anteriores. Em 1995, Sandiford et al. demonstraram que o aumento da permeabilidade vascular pulmonar é difuso nos pulmões de pacientes com SDRA; entretanto, não observaram relação com o gradiente anteroposterior. Em estudo com microscópio *in vivo*, Pavone et al. (2007) evidenciaram que as regiões não dependentes são as primeiras a desenvolver injúria alveolar (caracterizada por instabilidade alveolar) após ventilação lesiva, e a introdução de uma PEEP maior (grupo com PEEP de 10 cmH₂O comparado ao grupo com PEEP de 3 cmH₂O) não reduziu o edema intraalveolar e intersticial.

Essa tendência não foi observada em relação à concentração de células inflamatórias, pelo contrário, o infiltrado neutrofílico apresentou um padrão de distribuição difuso, com melhora no grupo submetido à ventilação mecânica protetora. Bellani et al. (2009), em estudo com tomografia por

emissão de pósitrons/tomografia computadorizada (PET-CT), mostraram que os pulmões de pacientes com LPA/SDRA têm uma intensa atividade metabólica em áreas aeradas e não aeradas, provavelmente devido a atividade de leucócitos polimorfonucleares. Nossos achados sugerem que o infiltrado neutrofílico em LPA/SDRA decorre do estímulo inflamatório da própria síndrome, já que a ventilação mecânica melhora esse parâmetro.

A densidade de neutrófilos no parênquima pulmonar se mostrou inversamente relacionada à pressão parcial de oxigênio (PaO_2), achado diferente do observado por Pavone e colaboradores (2007), que não evidenciaram correlação entre injúria alveolar (instabilidade alveolar no microscópio *in vivo*) e queda da pressão parcial de oxigênio. Os neutrófilos podem migrar para o pulmão sem necessariamente causar injúria, como demonstrado pelo grupo Sham. Para a lesão ocorrer, a ativação dos neutrófilos é necessária. Durante a lesão pulmonar aguda, os leucócitos e as células residentes nos pulmões, células epiteliais e endoteliais ativadas secretam quimiocinas. Estas são localmente retidas pela matriz rica em proteoglicanos, o que permite a formação de um gradiente para o estímulo inflamatório. Em um processo mediado por selectinas, quimiocinas e integrinas, os neutrófilos rolam pelo endotélio, aderem e extravasam, ultrapassam o vaso sanguíneo e migram para o sítio inflamatório. Durante a migração, os neutrófilos ativados liberam vários mediadores, como proteases e oxidantes, que propiciam o aumento da permeabilidade vascular, apoptose e necrose celular (Grommes e Soehnlein, 2011). O dano à célula endotelial provoca extravasamento de fluidos dos capilares para o interstício e para os espaços intraalveolares; a destruição da camada epitelial adiciona debris celulares ao exsudato, contribuindo para a

formação da membrana hialina (Katzenstein, 2006). Consequentemente, ocorrem prejuízos na produção e função do surfactante, diminuição da complacência pulmonar, hipoxemia e hipercapnia.

5.3. Progressão da lesão

Apesar de estudos prévios já indicarem que o processo inflamatório se propaga por todo o pulmão (Sandiford et al., 1995; Bellani et al., 2009) pouco se conhece sobre a progressão da lesão pulmonar e a própria história natural da SDRA. Os nossos achados mostram que independente da resolução do exsudato neutrofílico agudo no grupo submetido a 40 horas de ventilação mecânica protetora, a lesão progride. A redução das células inflamatórias não corrige a lesão da barreira alvéolo-capilar, o afluxo de fluidos derivados do plasma para o espaço aéreo continua, formando mais membrana hialina.

Deposição de membrana hialina geralmente acompanha alveolites agudas e crônicas (Idell et al., 1989). Observações prévias sugerem uma relação entre fibrina transicional e subsequente fibrose. Em modelo de injúria pulmonar com bleomicina, deposição precoce de fibrina ocorre durante a fase inicial da alveolite exsudativa e persiste com a fibrose alveolar e intersticial que se sucedem (Idell et al., 1989). No estágio de organização do dano alveolar difuso, remanescentes de membrana hialina podem invariavelmente ser identificados em septos alveolares espessados; em alguns casos, é provável que a fibrose represente a organização da própria membrana hialina (Katzenstein, 2006). Deposição intraalveolar de fibrina também ocorre em

formas ativas de doenças intersticiais do pulmão, sugerindo que organização e remodelamento da fibrina transicional contribuem para a fibrose pulmonar em doenças inflamatórias crônicas (Basset et al., 1986).

A membrana hialina é uma marca da fase aguda da SDRA e pode ser vista já nas primeiras 12 horas, entretanto, se torna menos proeminente no estágio organizante da lesão (Katzenstein, 2006). No curso da SDRA, a fibrina liga-se ao fibrinogênio e outras proteínas para formar uma matriz provisória que permite a migração e invasão de miofibroblastos e células endoteliais que darão origem ao tecido de granulação (Svee et al., 1996). A adesão e migração de fibroblastos são mediados por componentes da matriz extracelular (Turley et al., 1985). Com a progressão da injúria, estes podem sofrer remodelamento e culminar em fibrose pulmonar, o estágio final da SDRA.

Estudo recente em pacientes encaminhados à autópsia entre os anos de 1991 e 2010 correlacionou as alterações histopatológicas observadas nos pulmões na SDRA com a duração da lesão. As alterações exsudativas foram predominantes na primeira semana da injúria e diminuíram com o tempo. As alterações da fase proliferativa, caracterizadas principalmente pela hiperplasia de pneumócitos II, iniciam-se precocemente no curso da síndrome e aumentam com a duração lesão. Já fibrose foi raramente observada na primeira semana de injúria, mas foi notada em cerca de 61% dos pacientes com mais de três semanas de evolução. Interessantemente, a fibrose pulmonar foi mais frequente na última década, assim como o número de pacientes submetidos a mais de três semanas de ventilação mecânica (Thille et al., 2013). A introdução de estratégias protetoras foi provavelmente a responsável pelos melhores resultados em UTIs nesse período, porém o tempo prolongado da VM pode ser

um dos fatores determinantes para o estabelecimento da fibrose pulmonar (Thille et al., 2013).

O parênquima pulmonar e principalmente a rede de macromoléculas que compõem a matriz extracelular podem produzir uma resposta adaptativa quando expostos a estímulos mecânicos durante a ventilação. No pulmão normal em que a expansão é homogênea, o estímulo é distribuído de maneira uniforme à trama de fibras que constituem a matriz intersticial (Tucci et al., 2011). Em um cenário de lesão aguda, a aeração pulmonar tem uma distribuição heterogênea. O pulmão residual aerado localizado fundamentalmente na região anterior é relativamente pequeno (*baby lung*) e recebe a maior parte do volume corrente insuflado pelo ventilador, portanto, exposto a excessiva tensão e deformação (Muders e Wrigge, 2010; Tucci et al., 2011). Em teoria, o uso de baixos volumes correntes deveria minimizar o estresse mecânico, entretanto hiperdistensão foi observada em um terço dos pacientes submetidos à estratégia ventilatória *ARDSnet* (Terragni et al., 2007). Esse estímulo físico danoso pode ser transmitido para as células pulmonares, fenômeno denominado mecanotransdução (Plataki e Hubmayr, 2010). Os nossos achados mostram que o estresse causado pela ventilação mecânica (maior DeltaZ) após 40 horas está fortemente correlacionado ao aumento da expressão gênica de componentes da matriz extracelular. Nossa hipótese é que com a progressão da lesão o estímulo mecânico tenha alterado as células pulmonares, ocorrendo sinalização para migração de miofibroblastos (Svee et al., 1996) e aumento na expressão gênica de colágenos e proteoglicanos, com predomínio de expressão de colágeno tipo I nas regiões anteriores. A relação

entre tensão mecânica e aumento da expressão de colágeno tipo I já havia sido demonstrada por Breen (2000) em cultura de fibroblastos.

A principal característica da fibrose pulmonar, além do influxo de células inflamatórias, é um aumento absoluto na síntese e deposição de matriz extracelular, rica em colágeno (Armstrong et al., 1999). É bem estabelecido que o processo de fibrose inicia-se precocemente no curso da SDRA (Santos, 2008). Concentrações do peptídeo procolágeno III estão elevadas em lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com LPA/SDRA já nas primeiras 24 horas do diagnóstico, assim como a atividade mitótica dos fibroblastos (Marshall et al., 2000). Elevados níveis de procolágeno III foram demonstrados em edema pulmonar a partir do primeiro dia de LPA/SDRA (Chesnutt et al., 1997).

Alguns estudos já demonstraram que a matriz extracelular pulmonar se altera em resposta a regimes ventilatórios anormais. Berg et al. (1997) relataram que hiperdistensão do pulmão resulta em aumento na expressão de RNAm de vários componentes da matriz, como procolágeno e fibronectina. Al-Jamal e Ludwig (2001) observaram que ratos submetidos à ventilação mecânica com altos volumes apresentam significativo aumento da expressão gênica de versican e biglican.

Entretanto, pouca informação é disponível no que se refere ao comportamento dos proteoglicanos da matriz extracelular na distribuição e progressão da lesão pulmonar aguda. Venkatesan et al. (2000) observaram aumento da expressão de versican, heparan sulfato, biglican e fibromodulina em um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina anterior ao aumento da expressão de colágeno. Kolb et al. (2001) demonstraram que decorin, mas não biglican, foi capaz de inibir TGF-beta e

reduzir a fibrose pulmonar induzida por bleomicina. O nosso estudo mostrou aumento da expressão gênica de colágeno tipo 1, colágeno tipo 3, versican, biglican e decorin no grupo submetido a 40 horas de ventilação mecânica protetora. Esses achados estão em concordância com o conceito que não somente o colágeno, mas também os proteoglicanos têm um papel crucial no remodelamento tecidual e na progressão para a fibrose pulmonar (Bensadoun et al., 1996).

Proteoglicanos têm diferentes funções biológicas e seu papel no processo de fibroproliferação é diverso. Versican, devido a sua alta carga iônica, é fundamental na determinação do conteúdo aquoso da matriz extracelular (Pelosi e Rocco, 2008). Em nosso modelo, o aumento da expressão de versican no tecido pulmonar poderia resultar em maior adição de água ao interstício alveolar e contribuir para a formação da matriz edematosa necessária para a migração celular e proliferação. Proteoglicanos também se ligam a diferentes fatores de crescimento como TGF- β e fator de crescimento fibroblástico (FGF) e modulam os seus efeitos na proliferação celular e deposição de matriz por interferência na sua biodisponibilidade (Kolb et al., 2001; Rocco et al., 2009).

No processo de remodelamento tecidual, decorin e biglican ligam-se ao TGF- β e inibem a via de fibrillogênese do colágeno (Kolb et al., 2001; Pelosi e Rocco, 2008). Kolb et al. (2001) sugerem que apesar de biglican e decorin terem propriedades de ligação ao TGF- β semelhantes, sua localização poderia influenciar na sua performance. Decorin liga-se ao colágeno e TGF- β , limita a interação dessa citocina com receptores celulares e controla o seu efeito sobre

as células produtoras de matriz. Por outro lado, apesar do biglican se ligar ao TGF- β , sua localização no espaço pericelular e superfície celular não propicia um bloqueio efetivo da interação dessa citocina com os receptores celulares. Em nossos animais, o aumento da expressão de decorin e biglican no grupo submetido a um longo período de ventilação mecânica provavelmente é parte do processo de sinalização gênica para o reparo tecidual e pode ser interpretado como uma tentativa de regulação e inibição da produção de colágeno pelas células intersticiais pulmonares.

5.4. Limitações

A evolução da SDRA em nossos animais é dependente do modelo utilizado. A reprodutibilidade em pacientes de UTI requer estudo em humanos. O modelo de lesão se caracteriza por lavagens pulmonares com remoção do surfactante de todas as regiões pulmonares, seguido de uma ventilação em modo pressão controlada com altas pressões inspiratórias que determina volume corrente inicial elevado, com redução progressiva, piora da complacência pulmonar e hiperdistensão das regiões anteriores.

A lesão pulmonar induzida é extremamente grave, o que não reflete a lesão pulmonar da maioria dos pacientes com SDRA nos estudos clínicos até o momento.

O tempo do estudo, apesar de longo (40 horas), pode ainda assim não ser suficiente para reproduzir completamente a evolução da SDRA em

humanos. Em alguns estudos prévios (Brower et al., 2004; Meade et al., 2008; Mercat et al., 2008) os pacientes apresentaram melhora a partir do terceiro dia de ventilação mecânica.

Os recrutamentos realizados fora da caixa torácica (pelo ventilador mecânico com pressão inspiratória de 25 cmH₂O e pela instilação de formalina tamponada na mesma pressão) pós-LPIV para o grupo Lesão e após as 40 horas de ventilação mecânica protetora para o grupo Lesão+VM resultam em abertura de regiões atelectásicas, minimizam as diferenças regionais e pode abolir as correlações com a TIE.

6. CONCLUSÃO

Mostramos a evolução da lesão pulmonar aguda em um modelo experimental de depleção de surfactante com LPIV em animais de grande porte. No nosso modelo, o suporte com ventilação mecânica protetora foi eficiente para reduzir a inflamação parenquimatosa, mas não inibiu a progressão da lesão e a sinalização para o processo fibroproliferativo. A injúria pulmonar evoluiu de forma heterogênea e o estresse causado pela VM impactou principalmente nas regiões anteriores. No curso da lesão, após 40 horas, as regiões não dependentes sofreram uma progressiva redução do lúmen alveolar associada à deposição de membrana hialina, aumento do espessamento septal e expressão de colágeno tipo I. Apesar da predominância de RNAm de colágeno tipo I nessa região, a análise de expressão gênica mostrou que a sinalização para reparo tecidual acomete todo o parênquima pulmonar; entretanto, a deposição de matriz rica em colágeno parece ser um evento mais tardio.

7. REFERÊNCIAS

Abel SJ, Finney SJ, Brett SJ, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW. Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax*. 1998;53:292-4.

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

Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros D, Magaldi RB, Schettino GPP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CRR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute distress syndrome. *N Engl J Med*. 1998;338:347-54.

ARDS Definition Task Force, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *JAMA*. 2012;307:2526-33.

ARDSnet. 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.

Armstrong L, Thickett DR, Mansell JP, Ionescu M, Hoyle E, et al. Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1910-5

Ashbaugh DG, et al. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2:319-23.

Barth PJ, Höltermann W, Müller B. The spatial distribution of pulmonary lesions in severe ARDS. An autopsy study of 35 cases. *Pathol Res Pract*. 1998;194:465-71.

Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y, Crystal RG. Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. *Am J Pathol*. 1986;122:443-61.

Bellani G, et al. Lungs of patients with acute respiratory distress syndrome show diffuse inflammation in normally aerated regions: a [18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET/CT study. *Crit Care Med*. 2009;37:2216-22.

Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1819-28.

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

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:818-24.

Blankman P, Gommers D. Lung monitoring at the bedside in mechanically ventilated patients. *Curr Opin Crit Care*. 2012;18:261-6.

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

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 Jan;25(1):16-27.

Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, Schoenfeld D, Thompson BT; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2004;351:327-36.

Caironi P, Carlesso E, Gattinoni L. Radiological imaging in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27:404-15.

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

Caruso P. Ventilator-induced lung injury distribution: the key to understanding injury mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jan 1;175(1):95-6; author reply 96.

Carvalho AR, Jandre FC, Pino AV, Bozza FA, Salluh J, Rodrigues R, Ascoli FO, Giannella-Neto A. Positive end-expiratory pressure at minimal respiratory elastance represents the best compromise between mechanical stress and lung aeration in oleic acid induced lung injury. *CritCare*. 2007;11:R86.

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 Care Med*. 1997;156:840-5.

Clark JG, et al. 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;122:17-23.

Costa EL, Borges JB, Melo A, Suarez-Sipmann F, Toufen CJr, Bohm SH, Amato MB. Bedside estimation of recruitable alveolar collapse and hyperdistension by electrical impedance tomography. *Intensive Care Med.* 2009;35:1132-7.

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

Denaï MA, Mahfouf M, Mohamad-Samuri S, Panoutsos G, Brown BH, Mills GH. Absolute electrical impedance tomography (aEIT) guided ventilation therapy in critical care patients: simulations and future trends. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 2010;14:641-9.

Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J.* 2011;87:612-22.

Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 2006;61:259-66.

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.

Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Sáenz G, Moseinco M, Pozo M, Gómez A, Baredes N, Jannello G, Osatnik J. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2002;30:2450-6.

Fagerberg A, Söndergaard S, Karason S, Aneman A. Electrical impedance tomography and heterogeneity of pulmonary perfusion and ventilation in porcine acute lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53:1300-9.

Fan E, Needham DM, Stewart TE. Ventilatory management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2005;294:2889-96.

Franca SA, Toufen C Jr, Hownanian AL, Albuquerque AL, Borges ER, Pizzo VR, Carvalho CR. The epidemiology of acute respiratory failure in hospitalized patients: a brazilian prospective cohort study. *J Crit Care.* 2011;26:330.e1-8.

Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006;27:327-36.

Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol.* 1987;126:171-82.

Gattinoni L, Pesenti A. ARDS: the non-homogeneous lung; facts and hypothesis. *Intensive Crit Care Diag.* 1987;6:1-4.

Gattinoni L, Caironi P, Pelosi P, Goodman LR. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1701-11.

Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med.* 2005;31:776-84.

Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri VM, Quintel M, Russo S, Patroniti N, Cornejo R, Bugedo G. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2006;354:1775–1786.

Grasso S, Terragni P, Mascia L, Fanelli V, Quintel M, Herrmann P, Hedenstierna G, Slutsky AS, Ranieri VM. Airway pressure–time curve profile (stress index) detects tidal recruitment/hyperinflation in experimental acute lung injury. *Crit Care Med.* 2004;32:1018–1027.

Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007;87:69-98.

Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med.* 2011;17:293-307.

Hannon JP, Bossone CA, Wade CE. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci.* 1990;40(3):293-8.

Hedenstierna G, Hammond M, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Functional lung unit in the pig. *Respir Physiol.* 2000;120(2):139-49.

Hughes M, Mackirdy FN, Ross J, Norrie J, Grant IS, Scottish intensive care society. Acute respiratory distress syndrome: an audit of incidence and outcome in Scottish intensive care units. *Anaesthesia.* 2003;58:838-45.

Idell S, James KK, Gillies C, Fair DS, Thrall RS. Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage of rats with oleic acid and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *Am J Pathol.* 1989;135:387-99.

Irish critical care trials group. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. *Crit Care.* 2008;12:R30.

Katzstein ALA: Katzstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease. Major problems in Pathology (ed 4). Philadelphia. PA. Saunders. 2006, pp 18-34.

Krafft P, Fridrich P, Pernerstorfer T, Fitzgerald RD, Koc D, Schneider B, Hammerle AF, Steltzer H. The acute respiratory distress syndrome: definitions, severity and clinical outcome. An analysis of 101 clinical investigations. Intensive Care Med. 1996;22:519-29.

Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. Acta Anaesthesiol Scand. 1980;24:231-6.

Lanças T, et al. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. J Appl Physiol. 2006;100:1610-6.

Laycock H, Rajah A. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a review article. BJMP. 2010;3:324.

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

Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF study group. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159:1849-61.

Marshall R, Bellingan G, Laurent G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. Thorax. 1998;53:815-7.

Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N 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 TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. Crit Care Clin. 2011;27:735-52.

Matthay MA, Zimmerman GA. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. Am J Resp Cell Mol Biol. 2005;33:319-27.

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animals models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;295:L379-99.

Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, Davies AR, Hand LE, Zhou Q, Thabane L, Austin P, Lapinsky S, Baxter A, Russell J, Skrobik Y, Ronco JJ, Stewart TE, Lung Open Ventilation Study Investigators: Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA. 2008;299:637-45.

Meduri GU. Late adult respiratory distress syndrome. *New Horiz.* 1993;1:563-77.

Mercat A, et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008;299:646-55.

Moraes TJ, Chow CW, Downey GP. Proteases and lung injury. *Crit Care Med.* 2003;31:189-94.

Moriondo A, Pelosi P, Passi A, Viola M, Marcozzi C et al. Proteoglycan fragmentation and respiratory mechanics in mechanically ventilated healthy rats. *J Appl Physiol.* 2007;103:747-56.

Muders T, Wrigge H. New insights into experimental evidence on atelectasis and causes of lung injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010;24:171-82.

Negrini D, Passi A, Luca G, Miserocchi. Proteoglycan involvement during development of lesional pulmonary edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998;274:203-11.

Negrini D, Tenstad O, Passi A, Wiig H. Differential degradation of matrix proteoglycans and edema development in rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:470-7.

Negrini D, Passi A. Interstitial matrix and transendothelial fluxes in normal lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159:301-10.

Nur Urer H, Ersoy G, Yilmazbayhan ED. Diffuse alveolar damage of the lungs in forensic autopsies: assessment of histopathological stages and causes of death. *Scientific World Journal.* 2012;2012:657316.

Papazian L, et al. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med.* 2007;35:755-62.

Passi A, Negrini D, Albertini R, Luca G, Miserocchi G. Involvement of lung interstitial proteoglycans in development of hydraulic- and elastase-induced edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998;275:631-5.

Pelosi P, Negrini D. Extracellular matrix and mechanical ventilation in healthy lungs: back to baro-volotrauma. *Curr Opin Crit Care.* 2008;14:16-21.

Pelosi P, Rocco PRM, Negrini D, Passi A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc.* 2007;79:285-97.

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

Phua J, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: a systematic review. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:220-7.

Plataki M, Hubmayr RD. The physical basis of ventilator-induced lung injury. *Expert Rev Respir Med*. 2010;4:373-85.

Puybasset L, Gusman P, Muller JC, Cluzel P, Coriat P, Rouby JJ. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. III. Consequences for the effects of positive end-expiratory pressure. CT Scan ARDS Study Group. *Adult respiratory distress syndrome. Intensive Care Med*. 2000;26:1215-27.

Puybasset L, Cluzel P, Gusman P, Grenier P, Preteux F, Rouby JJ. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. I. Consequences for lung morphology. CT scan ARDS Study Group. *Intensive Care Med*. 2000;26:857-69.

Riera J, Riu PJ, Casan P, Masclans JR. Electrical impedance tomography in acute lung injury. *Med Intensiva*. 2011;35:509-17.

Richard JC, Pouzot C, Gros A, Tourevieille C, Lebars D, Lavenne F, Frerichs I, Guérin C. Electrical impedance tomography compared to positron emission tomography for the measurement of regional lung ventilation: an experimental study. *Crit Care*. 2009;13:R82.

Rocco PR, Dos Santos C, Pelosi P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anestesiol*. 2009;75:730-40.

Rouby JJ, Puybasset L, Nieszkowska A, Lu Q. Acute respiratory distress syndrome: lessons from computed tomography of the whole lung. *Crit Care Med*. 2003;31:285-95.

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353:1685-93.

Rubinfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*. 2007;131:554-62.

Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2008;34:619-30.

Slutsky, AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999;116:9-15.

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

Svee K, White J, Vaillant P, Jessurun J, Roongta U, Krumwiede M, Johnson D, Henke C. Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J Clin Invest*. 1996;98:1713-27.

Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, Corno E, Menaldo E, Davini O, et al. Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(2):160-6.

Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, Cortés-Puch I, Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:761-7.

Tomicic V, Fuentealba A, Martínez E, Graf J, Batista Borges J. The basics on mechanical ventilation support in acute respiratory distress syndrome. *Med Intensiva*. 2010;34:418-27.

Tsuchida S, Engelberts D, Peltkova V, Hopkins N, Frndova H, Babyn P, McKerlie C, Post M, McLoughlin P, Kavanagh BP. Atelectasis causes alveolar injury in nonatelectatic lung regions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:279-89.

Tucci MR, Beraldo MA, Costa ELV. Lesão pulmonar induzida pelo ventilador. *Pulmão RJ*. 2011;20:43-48.

Turley EA, Torrance J. Localization of hyaluronate and hyaluronate-binding protein on motile and non-motile fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1985;161:17-28.

Victorino JA, Borges JB, Okamoto VN, Matos GF, Tucci MR, Carames MP, Tanaka H, Sipmann FS, Santos DC, Barbas CS, Carvalho CR, Amato MB. Imbalances in regional lung ventilation: a validation study on electrical impedance tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:791-800.

Villar J, Kacmarek RM, Perez-Mendez L, Aguirre-Jaime A. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit Care Med*. 2006;34:1311-8.

Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1328-42.

Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27:337-49.

Wind J, Versteegt J, Twisk J, van der Werf TS, Bindels AJ, Spijkstra JJ, Girbes AR, Groeneveld AB. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: a survey. *Respir Med*. 2007;101:2091-8.

Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest*. 2008;133:1120-7.