Carla Augusto Thomaz de Aquino Holms

Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de suínos submetidos a lesão pulmonar aguda induzida por ácido clorídrico e tratados com solução salina hipertônica

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

Programa de: Anestesiologia

Orientador: José Otávio Costa Auler Júnior

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Holms, Carla Augusto Thomaz de Aquino

Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de suínos submetidos a lesão pulmonar aguda induzida por ácido clorídrico e tratados com solução salina hipertônica / Carla Augusto Thomaz de Aquino Holms. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Anestesiologia .

Orientador: José Otávio Costa Auler Júnior.

Descritores: 1.Lesão pulmonar aguda 2.Solução salina hipertônica 3.Suínos
4.Ácido clorídrico 5.Citocinas 6.Inflamação

USP/FM/DBD-320/12

Este trabalho teve auxílio da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos
n°. 2008/55376-7 e 2008/56732-4

Dedicatórias

Aos meus pais, Rose Mary e Gilberto, e meu irmão Gilberto, por tudo que passamos juntos

Aos meus avós Yolanda e Mario pelo amor incondicional

Ao companheiro de vida Marco Antonio, obrigada por todo o incentivo e por sempre acreditar em mim

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Otávio Costa Auler Jr pela orientação e confiança.

À Profa Dra. Denise Tabacchi Fantoni por todo o apoio e estímulo, confiança e ensinamentos prestados.

À Denise Aya Otsuki pelo inestimável apoio, incentivo e auxílio na elaboração deste trabalho.

À Márcia Kahvegian por todos os ensinamentos prestados, incentivo e colaboração na realização deste estudo.

Ao Gilberto Nascimento por todo o suporte e auxílio com os animais durante a realização da parte experimental.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – pelo suporte financeiro que proporcionou a realização deste trabalho.

À todos os professores e funcionários do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia do VPT – FMVZ/USP.

À Dra Cristina Massoco pelo inestimável apoio desde o início deste projeto.

Ao Dr Paulo Gutierrez, pelo auxílio durante o treinamento e execução dos exames histopatológicos.

À equipe do LIM 11, em especial a Dra Paulina Sannomiya, pelo auxílio durante a análise das interleucinas.

À todos meus colegas de pós-graduação, Caroline, Jessica, Roberta, Fabrício, Alessandro e Alexandre, por todo o incentivo e companhia.

Aos colegas de pós graduação que viraram amigos, em especial Larissa, Daniela, Roberta e Ana Carolina.

À todos os pós graduandos, veterinários e funcionários da FMVZ-USP.

Às companheiras de curso Karina Yazbek e Shéllen Chen, pela tolerância e apoio.

Às amigas Adriana e Thais, pelo apoio, incentivo e compreensão pelas ausências constantes.

À todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Normatização adotada

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 Cardoso, 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 FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Lesão pulmonar aguda e o endotélio pulmonar	7
3.2 Resposta inflamatória pulmonar	10
3.3 Solução salina hipertônica	13
4 MÉTODOS	16
4.1 Local de realização do trabalho.....	16
4.2 Animais	17
4.3 Protocolo anestésico.....	17
4.4 Divisão dos grupos.....	18
4.5 Preparo dos animais	18
4.6 Lesão pulmonar.....	19
4.7 Ventilação	20
4.8 Monitoração	21
4.8.1 Hemodinâmica	21
4.8.2 Oxigenação sanguínea e hematócrito	23
4.8.3 Ventilação e mecânica pulmonar	23
4.9 Estudo da resposta inflamatória	24
4.10 Análise histológica do tecido pulmonar	28
4.11 Delineamento experimental	29
4.12 Destino dos animais	30
4.13 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Animais	33

5.2 Variáveis hemodinâmicas	34
5.2.1 Frequência cardíaca e pressões	34
5.2.2 Hematócrito	38
5.2.3 Índices de resistência vascular	39
5.2.4 Débito e Índices cardíacos.....	40
5.3 Ventilação	43
5.3.1 Frequência respiratória e volume corrente	43
5.3.2 Pressões de vias aéreas	44
5.3.3 Complacência pulmonar estática.....	45
5.3.4 Índice de volume de sangue intra-torácico e conteúdo extravascular de água pulmonar	46
5.4 Hemogasometria	47
5.4.1 Sangue arterial.....	47
5.4.2 Relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	51
5.4.3 Sangue venoso-misto.....	53
5.5 Resposta inflamatória.....	54
5.5.1 Contagem neutrófilos do lavado broncoalveolar.....	54
5.5.2 <i>Burst</i> oxidativo	54
5.5.2 Citocinas do lavado broncoalveolar	58
5.5.3 Citocinas séricas	61
5.6 Análise histopatológica	62
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	85
8 REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A – Posicionamento dos eletrodos de TIE ao redor do tórax do animal	21
Figura 1 B – Detalhe da cinta	21
Figura 2 A – Placa de 96 poços para ELISA com os respectivos poços padrão, branco e amostra após a adição de Peróxido de Hidrogênio e Tetrametilbenzidina.....	27
Figura 2 B – Placa de 96 poços para ELISA com os respectivos poços padrão, branco e amostra após adição de Ácido Sulfúrico	27
Figura 3 – Diagrama representando parte do delineamento experimental proposto pelo estudo	30
Figura 4 – Citograma representando o Burst oxidativo do lavado broncoalveolar de animal do grupo ALI (lesão), utilizando-se os estímulos DCFH+PMA.....	57
Figura 5 – Citograma representando o Burst oxidativo do lavado broncoalveolar de animal do grupo Sham (controle), utilizando-se os estímulos DCFH+PMA	57
Figura 6 A – Corte histológico da zona intermediária do lobo pulmonar diafragmático direito de animal do grupo Sham	63
Figura 6 B – Corte histológico da zona intermediária do lobo pulmonar diafragmático direito de animal do grupo HS	63
Figura 7 A – Corte histológico da zona intermediária do lobo pulmonar diafragmático direito de animal do grupo ALI	63
Figura 7 B – Corte histológico da zona intermediária do lobo pulmonar diafragmático direito de animal do grupo ALI+HS	63
Figura 8 – Painel demonstrativo dos campos pulmonares analisados	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação da pressão sistólica da artéria pulmonar	37
Gráfico 2 – Variação da pressão média da artéria pulmonar	37
Gráfico 3 – Variação do índice de resistência vascular pulmonar	42
Gráfico 4 – Variação do índice de trabalho sistólico do ventrículo direito	42
Gráfico 5 – Variação da complacência pulmonar estática	45
Gráfico 6 – Variação da PaO ₂	49
Gráfico 7 – Variação da PaCO ₂	49
Gráfico 8 – Variação de sódio plasmático	51
Gráfico 9 – Variação da relação PaO ₂ /FiO ₂	52
Gráfico 10 – Variação do burst oxidativo do lavado broncoalveolar	56
Gráfico 11 – Valores de TNF- α e IL-1 β	59
Gráfico 12 – Valores de IL-6	59
Gráfico 13 – Valores de IL-8	60
Gráfico 14 – Valores de IL-10	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão de peso, volume de HCl instilado e volume de HS infundido	33
Tabela 2 – Frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM)	34
Tabela 3 – Pressão venosa central (PVC), pressão arterial pulmonar sistólica (PAPS), pressão arterial pulmonar diastólica (PAPD), pressão pulmonar arterial média (PAPM) e pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP)	36
Tabela 4 – Valores de hematócrito.....	38
Tabela 5 – Índices de resistência vascular sistêmica (IRVS) e pulmonar (IRVP).....	39
Tabela 6 – Valores de débito cardíaco (DC), índice cardíaco (IC), índice de volume sistólico (IVS), índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (ITSVE) e direito (ITSVD)...	41
Tabela 7 – Frequência respiratória (FR) e volume corrente	43
Tabela 8 – Pressões de pico (PPico), plateau (PPlat), média (PM) e pressão inspiratória (PI) das vias aéreas.....	44
Tabela 9 – Complacência pulmonar estática, índice de volume de sangue intra-torácico e conteúdo extravascular de água pulmonar	46
Tabela 10 – Valores de gases do sangue arterial, lactato e pH	48
Tabela 11 – Valores de eletrólitos e equilíbrio ácido-base (ABE).....	50
Tabela 12 – Fração inspirada de oxigênio e relação PaO ₂ /FiO ₂	52
Tabela 13 – Valores de gases do sangue venoso-misto	53
Tabela 14 – Contagem de neutrófilos do lavado broncoalveolar.....	54
Tabela 15 – Valores de burst oxidativo do lavado broncoalveolar	55
Tabela 16 – Valores das citocinas no lavado broncoalveolar	58
Tabela 17 – Valores de TNF- α sérico.....	61
Tabela 18 – Escores analisados na análise histopatológica	62

RESUMO

Holms, CATA. **Avaliação da resposta inflamatória pulmonar de suínos submetidos a lesão pulmonar aguda induzida por ácido clorídrico e tratados com solução salina hipertônica.** São Paulo, 2012. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: A lesão pulmonar aguda (LPA) decorrente de aspiração do conteúdo gástrico é freqüente em pacientes com nível de consciência comprometido e depressão dos reflexos de vias aéreas. A solução salina hipertônica (HS) a 7,5% apresenta resultados ainda controversos quanto ao seu potencial efeito protetor na resposta inflamatória pulmonar. **OBJETIVOS:** Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito antiinflamatório da solução salina hipertônica no modelo experimental de lesão pulmonar por aspiração de ácido clorídrico (HCl). **MÉTODOS:** Foram utilizados 32 suínos (n=32; 8/grupo) divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: Sham, onde os animais foram somente anestesiados, ventilados e observados; HS, onde os animais receberam infusão de HS a 7,5% (4 ml/kg), sem LPA; ALI, onde os animais foram submetidos à LPA com HCl; ALI+HS, onde os animais foram submetidos à LPA com HCl e tratados com HS a 7,5% (4 ml/kg). Foram mensurados parâmetros hemodinâmicos e ventilatórios. Amostras de sangue foram coletadas para hemogasometria e análise dos níveis plasmáticos de TNF- α . Foram coletadas amostras do lavado broncoalveolar para mensuração das seguintes citocinas: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , e realização do *burst* oxidativo das células pulmonares. O tecido pulmonar foi coletado para análise histológica posterior. A análise estatística foi realizada pela análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) seguida por teste de Tukey. O grau de significância estabelecido foi de 5% ($p<0,05$). **RESULTADOS:** Houve diferença estatística significativa quanto aos parâmetros ventilatórios, oxigenação sanguínea, *burst* oxidativo e análise histológica pulmonar dos grupos ALI e ALI+HS, quando comparados aos grupos Sham e HS. Níveis de IL-6 e IL-8 apresentaram-se mais elevados nos grupos ALI e ALI+HS, porém sem diferença estatística entre grupos. **CONCLUSÃO:** O modelo de LPA estudado foi capaz de promover lesão pulmonar direta e heterogênea, porém o

grupo tratado com solução salina 7,5% não apresentou diferença estatística sobre o grupo não tratado no que alude aos parâmetros avaliados.

Descritores: Lesão pulmonar aguda; Solução salina hipertônica; Suínos; Ácido clorídrico; Citocinas; Inflamação.

SUMMARY

Holms, CATA. **Lung inflammatory response in pigs submitted to acute pulmonary injury by hydrochloric acid and treated with hypertonic saline.** São Paulo, 2012. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

BACKGROUND: Acute lung injury (ALI) caused by aspiration of gastric contents is not unusual in patients with depression of airway reflexes. The potential anti-inflammatory effects of hypertonic saline 7.5% (HS) is still controversial on pulmonary response. **OBJECTIVES:** This study aimed to evaluate the potential anti-inflammatory effect of hypertonic saline (HS) in a swine model of hydrochloric acid (HCl) aspiration. **METHODS:** 32 pigs (n=32; 8/group) were randomly divided into the following groups: Sham, the animals were only anesthetized, ventilated and observed; HS, the animals received an 7.5% hypertonic saline infusion (4ml/kg); ALI, animals were submitted to ALI with HCl infusion; ALI+HS, animals were submitted to ALI with HCl infusion and treated with 7.5% hypertonic saline (4ml/kg). Hemodynamic and ventilatory parameters were measured. Blood samples were collected for blood gas analysis and plasma levels mensuration of TNF- α . Bronchoalveolar samples were also collected for IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α cytokine mensuration and oxidative burst analysis. Lung tissue was collected for histological analysis. A parametrical analysis of variance with repeated measurement (ANOVA) followed by Tukey test was done. The significance level was set at 5% ($p<0,05$). **RESULTS:** There were estatistical differences regarding to ventilatory parameters, oxigenation, oxidative burst and pulmonary histological evaluation in ALI and ALI+HS groups, when compared to Sham and HS. IL-6 and IL-8 levels were higher in ALI and ALI+HS groups. However, no statistical difference were found between groups. **CONCLUSION:** The ALI model was effective to promote diffuse and heterogeneous lung injury. However, the group treated with 7.5% hypertonic saline did not presented statistical difference when compared to the non treated group regarding the evaluated parameters.

Descriptors: Acute lung injury, 7.5% Hypertonic saline, Swine, Hydrochloric acid, cytokine, inflammation

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda causada pela aspiração de conteúdo gástrico é de ocorrência freqüente em pacientes que apresentam alteração de consciência e consequente depressão dos reflexos protetores das vias aéreas, principalmente em casos de traumas onde houve ingestão recente de alimentos, retenção de conteúdo estomacal, jejum pré-cirúrgico inadequado ou doença gastro-intestinal (1). A incidência de aspiração durante procedimentos anestésicos também é bastante elevada (2). A lesão pulmonar aguda conseqüente à aspiração pode evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), apresentando elevada taxa de mortalidade (2, 3).

Em relação aos achados clínicos e patológicos provocados pela aspiração de ácido clorídrico, mostram-se presentes numerosas alterações pulmonares, tais como edema e diminuição da complacência pulmonar, ruptura da barreira alvéolo-capilar e ativação da cascata inflamatória. Estas alterações são responsáveis pela diminuição da capacidade respiratória e hipoxemia, o que, em conjunto com a resposta inflamatória exacerbada, pode desencadear lesão de múltiplos órgãos e sistemas (4).

Modelos experimentais de lesão pulmonar aguda induzida por instilação de compostos ácidos apresentam como característica a grande infiltração de neutrófilos e edema pulmonar (5-7). De acordo com este tipo característico de lesão encontrada, propôs-se que uma forma efetiva de terapêutica deveria abranger protocolos que fossem capazes de reduzir o acúmulo de líquido livre alveolar (8, 9), bem como a infiltração pulmonar de células polimorfonucleares (2, 10-12).

Soluções hiperosmolares, dentre elas a solução salina hipertônica, já demonstraram potencial para modulação da resposta inflamatória pulmonar tanto em culturas celulares quanto em modelos experimentais de sepse e choque hemorrágico (13, 14). Este potencial efeito anti-inflamatório seria decorrente do fortalecimento da barreira endotelial pulmonar, reduzindo a permeabilidade vascular pulmonar, aumentando a formação de actina e inibindo a expressão de moléculas de adesão leucocitárias, principalmente P-selectina e L-selectina (15, 16). Consequentemente,

estas alterações dificultariam a ligação dos neutrófilos com o endotélio pulmonar, resultando em menor lesão pulmonar pós-trauma (17). Nos casos de lesão pulmonar aguda secundária decorrente de pancreatites, síndrome isquemia/reperfusão, sepse ou lesão pulmonar por administração de ácido oléico, alguns estudos experimentais também demonstraram que o emprego das soluções hiperosmolares mostrou-se benéfico, sendo capaz de interferir nas interações celulares entre neutrófilos e o endotélio vascular e alterar a expressão de selectinas e integrinas na superfície dos neutrófilos, demonstrando efeito protetor nas lesões pulmonares (18-21).

Entretanto, o emprego das soluções hiperosmolares no modelo de lesão pulmonar induzida por ácido clorídrico possui literatura escassa, e um tanto controversa. Em estudo realizado em 1996 por Rabinovici e col., observou-se diminuição na formação de edema e melhora na oxigenação em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por HCl em ratos que foram tratados com solução salina hipertônica (22). No entanto, ainda existem controvérsias quanto aos possíveis efeitos benéficos das soluções hiperosmolares nas barreiras endoteliais pulmonares quando há lesão direta sobre o endotélio pulmonar (23).

O exato mecanismo pelo qual a solução salina hipertônica interfere com a ativação de neutrófilos ainda não está totalmente esclarecido. Acredita-se que a solução salina hipertônica gere acúmulo intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (c-AMP), que por sua vez ativa a formação de proteína quinase-A c-AMP dependente, componente das cascatas de inibição que controlam a função dos neutrófilos (16, 24).

Deste modo, o objetivo principal deste projeto foi avaliar os efeitos protetores da solução salina hipertônica a 7,5% como possível terapêutica em modelo experimental suíno de lesão pulmonar aguda induzida por aspiração de ácido clorídrico. Para isto, analisou-se a presença e ativação de neutrófilos pulmonares, liberação de mediadores inflamatórios específicos e análise histopatológica pulmonar, bem como parâmetros hemodinâmicos e ventilatórios durante o período de experimentação. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da solução salina hipertônica 7,5% sobre a resposta inflamatória pulmonar, quando utilizada isoladamente como terapêutica em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por ácido clorídrico. Analisou-se a ativação de macrófagos pulmonares, bem como a detecção de mediadores inflamatórios específicos e exame histopatológico posterior. Também foram avaliados parâmetros ventilatórios globais e regionais, alterações hemodinâmicas, perfusão e extravasamento de água pulmonar.

Objetivos Específicos

- Quantificação das seguintes citocinas no lavado broncoalveolar: Interleucina-1 (IL-1- β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por meio de técnica de ELISA.
- Quantificação da expressão sérica do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por meio de técnica de ELISA.
- Determinação do *burst* oxidativo de macrófagos pulmonares, obtidos no lavado broncoalveolar dos animais estudados, por meio de citometria de fluxo.
- Avaliação histopatológica do tecido pulmonar.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lesão Pulmonar Aguda Direta

A lesão pulmonar aguda (LPA) é um processo de rápido desenvolvimento, caracterizado por estresse respiratório agudo, inflamação, edema pulmonar e hipoxemia grave, que ocorre como reação a um determinado estímulo nocivo ao tecido pulmonar (25, 26). Uma grande variedade de eventos fisiopatológicos estão associados ao desenvolvimento da LPA. Clinicamente, estes eventos podem ser divididos entre os que afetam o parênquima pulmonar de forma direta, tais como pneumonia e aspiração gástrica, e os que afetam o parênquima pulmonar de forma indireta, tais como sepse, queimaduras graves ou pancreatite (27). A LPA pode evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), relacionada à altas taxas de morbidade e mortalidade, e associada à falência de múltiplos órgãos e sistemas (27, 28).

O epitélio alveolar, primeira estrutura acometida no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda direta, desencadeia a ativação dos macrófagos alveolares, iniciando o intenso processo de reação inflamatória pulmonar (29), caracterizado pela expressão de moléculas de adesão leucocitárias pelas células endoteliais pulmonares, intenso influxo de neutrófilos e produção de citocinas. O tecido pulmonar afetado irá apresentar, além de lesões estruturais, alterações funcionais e aumento da permeabilidade celular (30), o que será traduzido clinicamente em trocas gasosas inadequadas, hipoxemia e redução da complacência pulmonar (25, 28).

Entre as principais propriedades fisiológicas do endotélio pulmonar pode-se citar a função de barreira e a síntese de componentes vasoativos que modulam o tônus vascular sistêmico e pulmonar, este último contribuindo para a realização da vasoconstrição pulmonar hipóxica (VPH), condição fisiológica única da circulação pulmonar que mantém a relação ventilação/perfusão em equilíbrio e otimiza a oxigenação sistêmica (28).

De acordo com Martin e Matute-Bello, em 2011, o modelo animal ideal de lesão pulmonar aguda deve ser aquele capaz de apresentar resposta inflamatória pulmonar aguda, aumento da permeabilidade alveolar, recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar e presença de exudato alveolar rico em proteínas e fibrinas. Todas essas alterações devem ser acompanhadas por hipoxemia aguda e queda na complacência pulmonar (31).

O modelo de lesão pulmonar aguda baseado na instilação de ácido clorídrico (HCl) já foi aplicado anteriormente em trabalhos realizados com suínos (3, 32-35), bem como em cães (36), ratos (2, 5, 37) e coelhos (6, 11, 38, 39). Este modelo de lesão pulmonar direta tenta simular a aspiração gástrica do conteúdo estomacal, responsável por 11% de todos os casos de LPA (40).

Este modelo tem sido utilizado para estudo das alterações na hemodinâmica pulmonar, estratégias ventilatórias e mecanismos de recrutamento de neutrófilos (41), demonstrando concordância com o objetivo deste trabalho. O modelo de lesão pulmonar aguda por aspiração de HCl também é utilizado com certa frequência em estudos com o tomógrafo de impedância elétrica (TIE) (42, 43).

A lesão pulmonar aguda inicial desencadeada pela aspiração de HCl deve-se à lesão química da membrana alvéolo-capilar pulmonar (44), composta por duas estruturas distintas, o endotélio vascular e o epitélio alveolar (29). No entanto, o ácido é rapidamente neutralizado pelos tampões biológicos e a progressão da lesão torna-se então dependente dos macrófagos pulmonares residentes e dos neutrófilos recrutados para o local afetado. O processo de lesão tecidual tem início imediato, e atinge máxima extensão aproximadamente 6 horas após o insulto inicial. As alterações inflamatórias nessas primeiras 6 horas, por outro lado, são moderadas e localizadas nas áreas peri-necróticas. Ocorre progressão em extensão e gravidade dessas alterações após 12 a 24h, com exudação alveolar, formação de membrana hialina e hemorragia (45, 46).

O paciente com lesão pulmonar aguda rapidamente desenvolve hipoxemia e, por meio de exames de imagem, pode-se evidenciar um infiltrado pulmonar normalmente bilateral. Desde que não haja evidências de problemas cardíacos ou outros que justifiquem estas alterações, estas condições compõem o quadro clínico de

uma lesão pulmonar aguda de origem direta. De modo geral, são classificados como lesão pulmonar aguda os quadros em que a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ encontra-se entre 200 a 300 mm Hg. Quando esta relação encontra-se abaixo de 200 mm Hg, os pacientes podem ser considerados como portadores da síndrome do desconforto respiratório agudo (25).

Clinicamente, as lesões pulmonares de origem direta são caracterizadas por uma grande diminuição da complacência pulmonar e são aparentemente mais resistentes às intervenções terapêuticas, como por exemplo aplicação de PEEP (pressão positiva ao final da expiração) e manobras de recrutamento alveolar, quando comparadas às lesões pulmonares indiretas (47).

3.2 Resposta inflamatória pulmonar

A destruição inicial do tecido epitelial pulmonar causada pelo ácido clorídrico é o processo inicial de uma sequência de eventos que culmina com a instauração do processo de lesão pulmonar aguda (48). O aumento da permeabilidade alvéolo-capilar causada pela desrupção do endotélio favorece a entrada de constituintes do plasma para o espaço intersticial pulmonar, ocasionando edema, alterações na relação ventilação / perfusão e hipoxemia grave (49). As células epiteliais pulmonares, em conjunto com macrófagos residentes, dão início então à produção de diversas moléculas pró-inflamatórias, na tentativa de neutralizar o insulto (50).

Macrófagos e neutrófilos, primeira linha de defesa celular do trato respiratório inferior, produzem uma variedade de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são resultantes de uma sequência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio denominada *burst* oxidativo (51). No endotélio pulmonar, as espécies reativas de oxigênio produzidas principalmente pelos macrófagos residentes nos tecidos alveolares e endoteliais, normalmente aumentam a permeabilidade da barreira endotelial, participando dos processos de inflamação, morte celular e tecidual, causando mais efeitos deletéreos do que benéficos (50).

Resumidamente, a produção das espécies reativas de oxigênio inicia-se com a redução do oxigênio a superóxido (O_2^-), que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$). O H_2O_2 produzido, quando em contato com a enzima mieloperoxidase contida nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, gera o hipoclorito, que apresenta eficaz atividade microbiana. Os radicais livres produzidos, quando presentes em grande quantidade, podem induzir lesão celular e alterações na função da barreira endotelial, agravando o processo inicial (52).

A citometria de fluxo, método frequentemente utilizado para mensuração do *burst* oxidativo celular, avalia, quantitativamente, a formação de peróxido de hidrogênio, através da marcação das células em suspensão da amostra desejada com reagentes fluorescentes específicos, como o 2,7 diacetato de diclorofluoresceína

(DCFH-DA). Pode-se ainda estimular a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos e neutrófilos com o uso do miristato-acetato de forbol (PMA) (53).

Além de fagocitose, os macrófagos estimulam a expressão de moléculas de adesão e citocinas, sendo um dos responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos circulantes para o local afetado (54).

A resposta inflamatória pulmonar foi considerada por Orfanos e colaboradores (2004) como um processo inflamatório auto-destrutivo, caracterizado pela ativação de células pulmonares e circulatórias, produção de diversas citocinas e influxo pulmonar de neutrófilos (28). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos no processo de lesão pulmonar aguda dependem do tipo de insulto inicial. Porém, sabe-se que as células do endotélio pulmonar, após exposição a um estímulo pró-inflamatório, tornam-se ativadas, passando a expressar moléculas de adesão para leucócitos, produção de citocinas e alterações no tônus e na integridade vascular (35).

Após a lesão química inicial, uma cascata de mediadores inflamatórios é responsável pelo processo de adesão e transmigração dos neutrófilos para as vias aéreas. Esta cascata é inicialmente desencadeada por macrófagos alveolares ativados e pelo endotélio vascular, através da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interleucina 1 (IL-1 β) (54). Estas citocinas possuem a capacidade de ativar neutrófilos e atuar sobre as próprias células endoteliais pulmonares, induzindo maior liberação de moléculas de superfície, aumentando a capacidade de adesão e transmigração dos neutrófilos circulantes nos capilares alveolares para o parênquima pulmonar (55, 56). Neutrófilos que são recrutados para os pulmões também aparentam ser uma grande fonte de produção de IL-1 β e demais citocinas (57).

O TNF- α e IL-1 β , além de promover maior interação entre neutrófilos e endotélio pulmonar, irão estimular a produção de outras citocinas, tais como a Interleucina 6 (IL-6), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanas (TxA₂), fator de agregação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (NO) (58). O TNF- α também induz a produção de Interleucina 8 (IL-8) pelas células endoteliais pulmonares (59).

Além disso, ambas citocinas continuam propagando a resposta inflamatória através da ativação do fator transcricional nuclear (NF- κ B) em células endoteliais e

epiteliais pulmonares, aumentando assim a produção de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (60).

A IL-6, comumente mensurada nos modelos de lesão pulmonar aguda, atua como importante parâmetro de avaliação da resposta inflamatória, uma vez que seus níveis se elevam rapidamente durante o processo inflamatório (26). É produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, IL-1 β e TNF- α . Está relacionada com processos agudos, e estimula a síntese de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa nos hepatócitos. A IL-6 também pode regular a liberação de IL-1 β e TNF- α , podendo, desta forma, ser considerada tanto inflamatória como antinflamatória (54).

A IL-8, considerada uma quimiocina fortemente atrativa para os leucócitos, é intensamente secretada pelo endotélio pulmonar ativado em resposta a um estímulo nocivo (50). Estudos relatam a presença desta citocina em níveis elevados tanto no lavado broncoalveolar quanto no plasma de pacientes no início do desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (61, 62).

No entanto, existe uma série de mediadores endógenos responsáveis pelo controle da ação pró-inflamatória, evitando a perpetuação do estímulo inflamatório. A Interleucina 10 (IL-10) é uma efetiva citocina anti-inflamatória e atua inibindo a produção de TNF- α (63) e ativação do NF- $\kappa\beta$ (54, 64). Estudos demonstram que a IL-10 tem a capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos alveolares nos casos de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (65).

Pode-se, portanto, observar que o endotélio pulmonar possui inúmeras enzimas, receptores e moléculas de transdução que são capazes de interagir com diversos constituintes celulares, perpetuando o processo de lesão pulmonar aguda.

3.3 Solução Salina Hipertônica

Soluções hiperosmolares, comumente utilizadas para ressuscitação volêmica, demonstraram possuir, em diversos estudos realizados, potencial efeito protetor pulmonar, uma vez que teriam a capacidade de fortalecer a adesão entre as células da barreira endotelial capilar e alveolar, reduzindo assim a permeabilidade vascular e atenuando a ativação de neutrófilos (13, 15, 17, 20-22, 37, 66-73).

Modelos experimentais de choque hemorrágico demonstraram que, com a utilização de solução salina hipertônica, os animais estudados apresentaram menor expressão de E-selectina, P-selectina e L-selectina no endotélio pulmonar e na superfície dos neutrófilos (67, 68), menor ativação de neutrófilos, menor estresse oxidativo (70) e menor permeabilidade vascular, culminando em menor lesão pulmonar (17, 19, 20, 22, 66, 71). Outros dois trabalhos em modelos experimentais descreveram que o uso da solução salina hipertônica promove menor lesão pulmonar e foi capaz de reduzir a translocação bacteriana nos animais estudados (68, 73). Estudos realizados em culturas celulares de células polimorfonucleares de pacientes humanos demonstram os mesmos resultados obtidos com os modelos experimentais, ou seja, atenuação da resposta citotóxica dos neutrófilos e redução da expressão de moléculas de adesão leucocitária (69, 72).

De acordo com estudos realizados em culturas celulares, a exposição dos neutrófilos à solução salina hipertônica pode reduzir sua capacidade bactericida (69), assim como a expressão de L-selectina (74) e demais moléculas de adesão de superfície (18, 51). Modelos de choque hemorrágico em animais demonstraram diminuição tanto da lesão pulmonar quanto do infiltrado de células PMN nos animais ressuscitados com solução salina hipertônica, quando comparados aos ressuscitados com solução de Ringer lactato (68).

O mecanismo pelo qual a solução salina hipertônica interfere com a ativação de neutrófilos não é totalmente compreendido. Porém, estudos realizados em 2002 e 2009 relatam que a solução salina hipertônica pode gerar um acúmulo intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), representante da família de mensageiros

secundários e regulador das funções celulares, principalmente dos macrófagos (75). No macrófago alveolar primário, a elevação dos níveis de cAMP é responsável pela ativação da proteína kinase-A (PKA) cAMP-dependente, um inibidor dos mecanismos que controlam as funções dos neutrófilos (24, 75), modulando a geração de mediadores como TNF- α e leucotrienos, aumentando as quantidades de IL-10 e IL-6 e reduzindo a liberação de radicais de oxigênio (76).

De acordo com estudos realizados por Inoue e colaboradores, em 2008, a solução salina hipertônica induz uma rápida liberação celular de adenosina trifosfato (ATP), cuja degradação em adenosina ativa receptores de adenosina A2a nas células polimorfonucleares. Estes receptores A2a suprimem a ação das células polimorfonucleares através de um mecanismo de feedback negativo, que envolve o aumento da produção de cAMP e PKA, bloqueando a ativação celular (14).

No entanto, estudos demonstraram que, dependendo da fase de ativação em que as células polimorfonucleares se encontram, a solução salina hipertônica poderia tanto suprimir (através dos receptores A2a) como estimular (através dos receptores A3) a degranulação das células polimorfonucleares (14, 77).

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Local de realização do trabalho

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM08 – Laboratório de Anestesiologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do processo auxílio pesquisa 08/56732-4 e 08/55376-7.

As mensurações das citocinas, assim como a realização do ensaio do *burst* oxidativo, foram efetuados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

A avaliação histopatológica das lâminas pulmonares foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor/HC-FMUSP.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de ética para análise de projeto de pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Animais

Para realização deste estudo, foram utilizados 32 suínos jovens, fêmeas, com peso aproximado de 30 Kg, provenientes de uma granja comercial de alto padrão sanitário. Os animais permaneceram em jejum alimentar por 12 horas, porém com livre acesso a água. Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica e hemogasométrica ao início do procedimento. Caso alguma alteração fosse verificada, o animal era descartado do estudo.

4.3 Protocolo anestésico

Todos os animais receberam como pré-anestésico a combinação de cetamina (5 mg/kg)¹ e midazolam (0,25 mg/kg)², pela via intramuscular. A veia marginal da orelha foi acessada com catéter 20G³ para administração de fármacos e fluidoterapia. A indução anestésica foi realizada com propofol (3-5 mg/kg)⁴, pela via intravenosa. Após intubação orotraqueal com sonda de diâmetro apropriado, a anestesia foi mantida com o uso de isoflurano⁵ na concentração de 1,5 V%, administrado por meio de vaporizador calibrado. O relaxamento muscular foi obtido com a administração de pancurônio (5 µg/kg/min)⁶, em infusão contínua⁷. Após intubação oro-traqueal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal (supino) e mecanicamente ventilados na modalidade de ventilação controlada por pressão. A temperatura corporal foi mantida entre 37°C a 38°C, por meio da utilização de colchão térmico⁸. Todos os animais, independente do grupo estabelecido, receberam fluidoterapia com 5ml/kg/h de Ringer lactato como solução de manutenção, com bomba de infusão⁹.

¹ Cetamina 50mg/ml - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda

² Dormonid 5mg/ml - ROCHE Químicos e Farmacêuticos S/A

³ Cateter intravenoso Nipro – Nipro Medical LTDA.

⁴ Propovan 10mg/ml - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda

⁵ Forane 100mg/ml – Abbott Laboratórios do Brasil

⁶ Pavulon 4mg/ml – Akzo Organon

⁷ Bomba de Infusão Volumétrica de Seringa ST 690 – Samtronic Infusion Systems

⁸ Medi-therm II, Gaymar Industries, Orchard Park, NY, USA

⁹ Anne

4.4 Divisão dos Grupos

Os grupos foram compostos da seguinte maneira:

- Grupo Sham (n = 8). Animais foram somente anestesiados e ventilados. Não houve lesão pulmonar aguda;
- Grupo HS (n = 8). Animais receberam infusão de solução salina hipertônica 7,5%, na dose de 4 ml/kg. Não houve lesão pulmonar aguda;
- Grupo ALI (n = 8). Animais foram submetidos à lesão pulmonar aguda induzida com HCl; Não houve tratamento;
- Grupo ALI-HS (n = 8). Animais foram submetidos à lesão pulmonar aguda induzida com HCl e tratados com solução salina hipertônica 7,5% na dose de 4 ml/kg.

4.5 Preparo dos animais

Uma vez que os animais se encontravam em plano anestésico, realizou-se infiltração de 5ml de solução de lidocaína sem vaso-constritor¹⁰ para dissecação da veia jugular direita, permitindo a introdução de um catéter de artéria pulmonar¹¹, acoplado ao monitor de débito cardíaco¹². O catéter foi posicionado no tronco da artéria pulmonar, sendo o transdutor de pressão posicionado ao nível da linha axilar média e zerado à pressão atmosférica. Após observação da curva característica do átrio direito, procedeu-se à insuflação do balão com 1,5 ml de ar, continuando a introdução do catéter no ventrículo direito e artéria pulmonar. Quando observado o “achatamento da curva” característico, a pressão de oclusão da artéria pulmonar foi considerada e o catéter foi fixado, permitindo a obtenção de valores de débito cardíaco (DC) e saturação venosa central mista de oxigênio (SvO₂), bem como

¹⁰ Lidoston sem vaso 20mg/ml – Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda

¹¹ Cateter de Artéria Pulmonar 7.5F, Baxter, Irvine, CA, USA

¹² Vigilance -Baxter, Irvine, CA, USA

demais índices hemodinâmicos associados, através de monitor específico¹².

A artéria femoral direita foi dissecada, permitindo a colocação de um 5-F *thermistor-tipped* cateter¹³ conectado ao monitor multiparamétrico¹⁴ para obtenção de pressão arterial e coleta de amostras de sangue arterial. O mesmo cateter foi utilizado para mensuração da água extra-vascular pulmonar (EVLW) e do volume de sangue intra-torácico (ITBV) através do método de termodiluição transpulmonar¹⁵.

Após posicionamento dos animais em decúbito dorsal (supino), realizou-se traqueostomia com fixação de um traqueotubo no local, permitindo que a administração do volume de ácido clorídrico fosse corretamente realizado na região da bifurcação traqueal (carina), facilitando o fluxo para ambos pulmões. Este mesmo traqueotubo foi utilizado como meio de acesso para broncoscopia e coleta do lavado broncoalveolar ao final do experimento.

Uma cinta composta por 16 eletrodos foi posicionada entre o quinto e o sexto espaços inter-costais, para mensuração da bioimpedância elétrica torácica (Figura 1A). As imagens obtidas através do equipamento de bioimpedância foram utilizadas para monitorar em tempo real a expansão pulmonar durante todo o período observacional.

4.6 Lesão pulmonar

Para a realização deste estudo, optou-se por realizar o protocolo de lesão pulmonar através da instilação traqueal de ácido clorídrico, proposto por Rosenthal e colaboradores, em 1998 (34), e já previamente utilizado em nosso laboratório em trabalhos anteriores (32). Para este modelo de lesão pulmonar proposto, foram instilados um volume de 4 ml/kg de peso corporal da solução de HCl 0,1N, com pH aproximado de 0,9.

¹³ Pulsicath PV2015L20A, Pulsion Medical Systems; Munich, Germany

¹⁴ IntelliVue MP50, Philips, Boeblingen, Germany

¹⁵ PiCCO – Pulse Contour Cardiac Output

4.7 Ventilação

O método de ventilação empregado teve como objetivo manter adequada troca gasosa e evitar a associação de uma possível lesão mecânica por ventilação ao processo de pneumonite aspirativa. Para tanto, optou-se pela utilização do método de ventilação controlada por pressão, ajustando-se um volume corrente limite de aproximadamente 8 ml/kg de peso corporal e fração inspirada de oxigênio de 50%¹⁶. A pressão expiratória final positiva (PEEP) foi estabelecida em 5 cmH₂O e mantida durante todo o período de estudo. A frequência respiratória foi ajustada, quando necessário, para manutenção da pressão parcial de dióxido de carbono no gás expirado (EtCO₂) entre 35 e 45 mm Hg.

Para padronização da história pulmonar, todos os animais foram submetidos à uma manobra de recrutamento alveolar (MRA) após o período de instrumentação e antes das mensurações basais, sendo esta realizada em três estágios, com duração de 30 segundos cada e pressão positiva contínua em vias aéreas de 30 cmH₂O.

A tomografia por impedância elétrica (TIE), uma técnica não-invasiva para obtenção de imagens através das alterações das propriedades elétricas dos tecidos corporais, foi empregada de forma a permitir a visualização da dispersão do ácido e as alterações ventilatórias ocasionadas pela administração traqueal do HCl.

A TIE do tórax (Figura 1A/B) é utilizada para captar imagens transversais e bi-dimensionais das regiões de interesse através de um conjunto de eletrodos posicionados ao redor do tórax. No pulmão, esta técnica pode ser empregada para avaliação da ventilação pulmonar, perfusão e alterações na impedância tecidual ocasionadas pela ação da gravidade, edema pulmonar, enfisema e lesão pulmonar aguda (78, 79). Neste estudo, foi empregado para acompanhamento e monitoração da expansão pulmonar um aparelho protótipo de Impedância Elétrica, cedido pela empresa Dräger/Germany.

¹⁶ Primus, Dräger, Lübeck, Alemanha

Figura 1. A: posicionamento dos eletrodos da tomografia por impedância elétrica (TIE) ao redor do tórax do animal, entre o quinto e sexto espaços intercostais. B: Detalhe da cinta.

4.8 Monitoração

4.8.1 Hemodinâmica

- Frequência e ritmo cardíacos

No decorrer da anestesia, frequência e ritmo cardíaco foram monitorados diretamente através do monitor cardíaco multiparamétrico¹⁴.

- Pressão arterial sistêmica

Durante todo o procedimento, a pressão arterial foi mensurada diretamente de forma invasiva, por meio do catéter de artéria femoral acoplado ao transdutor de pressão invasiva do monitor multiparamétrico¹⁴, obtendo-se, desta forma, as pressões

arteriais média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

- Débito cardíaco (DC) e índice cardíaco (IC)

O DC foi mensurado pelo método da termodiluição, por meio de catéter de Swan-Ganz, posicionado na artéria pulmonar e conectado ao monitor de débito cardíaco¹². As mensurações foram realizadas através da infusão de 10 ml de solução de glicose a 5% em temperatura ambiente, pela luz proximal do catéter. Foram realizadas três medidas consecutivas, sendo o valor adotado a média aritmética dos valores obtidos.

- Pressão venosa central (PVC), pressão de artéria pulmonar (PAP), e pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP)

Para a obtenção das pressões venosa central e pressões de artéria pulmonar, as vias proximal e distal do catéter de Swan-Ganz foram conectadas ao segundo transdutor de pressão do monitor multiparamétrico¹⁴. A pressão de oclusão da artéria pulmonar foi obtida insuflando-se o balão localizado em sua extremidade distal.

- Índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), índice de volume sistólico (IVS), índice de trabalho ventricular esquerdo (ITVE) índice do trabalho ventricular direito (ITVD)

Os índices foram calculados diretamente pelo monitor¹², por meio do uso de fórmulas padrão.

4.8.2 Oxigenação sangüínea e hematócrito

Amostras sangüíneas foram coletadas simultaneamente através dos catéteres pulmonar e arterial para análise de gases e mensuração do lactato sangüíneo, realizados no analisador de pH e gases sangüíneo¹⁷. As amostras foram coletadas em seringas heparinizadas, e a agulha vedada com tampa de borracha, evitando assim o contato do sangue com o ar ambiente.

O hematócrito arterial foi mensurado através de uma centrífuga de micro-hematócrito, e os valores contínuos da SvO₂ foram obtidos por meio do catéter de artéria pulmonar e dispostos no monitor de débito cardíaco¹².

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Pressão parcial de oxigênio (PvO₂) e saturação de oxigênio no sangue venoso misto (SvO₂)
- Saturação contínua de oxigênio no sangue venoso misto (SvO₂ contínuo)
- Pressão parcial de oxigênio (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂), pH, potássio (K), sódio (Na) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) do sangue arterial.

4.8.3 Ventilação e mecânica pulmonar

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Pressão de dióxido de carbono ao final da expiração (ETCO₂)

Avaliada através do capnógrafo¹⁶.

¹⁷ ABL555, Radiometer Medical, Denmark

- Frequência respiratória, volume minuto, volume corrente, pressão de pico, pressão platô, pressão média, pressão inspiratória das vias aéreas e complacência pulmonar estática

Avaliados através do monitor contido no ventilador¹⁶.

4.9 Estudo da Resposta Inflamatória

Lavado Broncoalveolar (BAL)

A coleta do BAL foi realizada através da lenta infusão e aspiração de um volume de 60 ml de solução de PBS (*phosphate-buffered saline*) no lobo pulmonar apical direito, utilizando-se para isto um broncoscópio¹⁸. O material coletado foi acondicionado em tubos de polipropileno e refrigerado até o momento da centrifugação.

Coleta do tecido Pulmonar

Ao término do período observacional, os animais foram eutanaziados com 10 ml de cloreto de potássio (KCl). Imediatamente após a administração da KCl, realizou-se clampeamento da traquéia ao final do último ciclo inspiratório, permitindo patência alveolar pulmonar. A cavidade torácica foi acessada por meio de toracotomia, e amostras de quatro regiões distintas das porções intermediárias (Zona West II) dos lobos pulmonares diafragmáticos direito e esquerdo, lobo médio esquerdo e apical esquerdo foram coletadas de forma estéril e fixadas de forma apropriada, para avaliação histopatológica.

¹⁸ Pentax FB-15H, Montvale, NJ, USA

Processamento das amostras

As amostras de sangue coletadas em tubo com gel ativador e uma alíquota de 10 ml do lavado broncoalveolar foram centrifugados em centrífuga refrigerada (4°C) a 2000 rpm durante 15 minutos. O soro e o sobrenadante obtidos foram distribuídos em microtubos tipo *ependorf*¹⁹ e, logo em seguida, armazenados em freezer - 80°C para posterior mensuração das citocinas.

Contagem celular em câmara de Neubauer

Uma alíquota de 0,2 ml da amostra de lavado broncoalveolar foi transferida para um microtubo *ependorf*, juntamente com 0,2 ml de corante azul de tripano 0,2%. O conteúdo foi homogenizado e uma alíquota de 0,5 ml foi analisada na câmara de Neubauer.

Burst oxidativo

Para análise do *burst* oxidativo, utilizou-se um citômetro de fluxo²⁰ conectado ao computador²¹. Foram analisados 10.000 eventos celulares utilizando-se o *software* Cell Quest²². As populações celulares contidas nas amostras de lavado broncoalveolar foram analisadas e reconhecidas por meio das propriedades fluorescentes FSC/SSC das mesmas. Foi analisada a presença de macrófagos e células polimorfonucleares pulmonares, excluindo-se as populações de monócitos, linfócitos e outras que pudessem estar presentes. A quantificação do *burst* oxidativo foi estimada pela intensidade média de fluorescência emitida por célula.

O método proposto por Hasui *et al.* (1989) foi utilizado para a análise do *burst* oxidativo. Para preparo do ensaio, foram adicionados aos tubos de polipropileno uma quantidade aproximada de 2×10^5 células/100µl de BAL (tubo A, B e E), 200 µl de DCFH-DA (0,3 mM) (tubo B), 200 µl de DCFH-DA (0,3 mM) mais 100 µl de PMA (tubo E), e PBS q.s.p. 1 ml. Após incubação em banho-maria

¹⁹ Eppendorf – Eppendorf do Brasil Ltda

²⁰ Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA

²¹ Macintosh Apple, CA, USA

²² Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA

sob agitação a 37°C por 20 minutos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm. O conteúdo sobrenadante foi então desprezado, e os botões celulares obtidos foram suspensos em 300 µl de PBS. A magnitude do *burst* oxidativo e a capacidade de fagocitose foram avaliadas por citometria de fluxo como descrito acima.

Citocinas

A quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-8 obtidas no lavado broncoalveolar foi realizada por meio de ensaio *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)²³, através de kits comerciais²⁴, seguindo-se o protocolo padrão descrito nos mesmos. Os resultados obtidos após a leitura foram expressos em densidade óptica (D.O.), sendo transformados em pg/ml, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

Os kits de interleucinas foram reconstituídos com anticorpo de captura, anticorpo de detecção e padrão para as dosagens. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, recobertas com os anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina a ser dosada. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 18 horas e depois lavadas três vezes com uma solução contendo PBS e Tween 20. Após esta etapa, as placas foram bloqueadas com PBS, contendo 1% ou 0,1% (dependente da citocina em questão) de albumina bovina (BSA) fração V. Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas novamente. Às duas primeiras fileiras de cada placa foram adicionados 100µl de citocina padrão recombinante, seguindo diluições seriadas com PBS, contendo 1% ou 0,1% de BSA, tomando-se como base as concentrações iniciais diluídas.

Os poços correspondentes ao branco da reação não receberam padrão diluído ou sobrenadante, apenas a solução contendo PBS e BSA. Às outras fileiras, foram adicionados 100µl/poço da amostra. Depois de duas horas e nova lavagem, foram adicionados 100 µl/poço do anticorpo de detecção marcado com soro de cabra apenas para o TNF- α e IL-10. As placas foram incubadas por duas horas à

²³ DuoSet® ELISA Development System – R&D Systems, Minneapolis, USA

²⁴ Duo-Set, R&D Systems

temperatura ambiente e depois, lavadas novamente três vezes com a solução de PBS + Tween 20. Em seguida, foram adicionados 100 µl/poço de estreptoavidina, diluída a 1:200 em PBS-BSA a 1% ou PBS-BSA a 0,1%. As placas foram incubadas por 20 minutos e lavadas três vezes, quando, então, foram adicionados 100µl/poço da mistura de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) + tetrametilbenzidina (1:1) (Figura 2A). Após 20 minutos, foram adicionados 50 µl/poço de ácido sulfúrico (2N H_2SO_4) (Figura 2B). Os resultados foram determinados pela absorbância obtida em 450 nm, medidas em um leitor automático de ELISA²⁵. Os resultados obtidos após a leitura foram expressos em densidade óptica (DO). A concentração de citocina no sobrenadante foi determinada pela comparação com as absorbâncias obtidas, em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante, realizada simultaneamente e expressa em pg/ml.

Figura 2. A: Placa de 96 poços para ELISA com os respectivos poços de Padrão, Branco e Amostra após a adição de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina. B: Placa de 96 poços para ELISA com os respectivos poços de Padrão, Branco e Amostra após adição de ácido sulfúrico.

²⁵ BIORAD 2550, EIA Microplate reader, Hercules, CA, USA

4.10 Análise histológica do tecido pulmonar

Imediatamente após administração de cloreto de potássio (KCl) para eutanásia dos animais estudados, os pulmões foram mantidos insuflados pelo clampeamento da traquéia ao final do último ciclo inspiratório. Foram coletadas amostras das regiões intermediárias (Zonas de West II) dos lobos pulmonares apical e diafragmático esquerdo, médio e diafragmático direito. As amostras foram fixadas em formol 10% por um período determinado. Posteriormente, foram coradas com hematoxilina-eosina e preparadas para análise em microscopia óptica, que foi realizada em conjunto por dois pesquisadores, sem conhecimento dos grupos de estudo. O objetivo desta avaliação foi constatar os danos pulmonares induzidos pelo modelo proposto de lesão pulmonar aguda, bem como observar possíveis diferenças induzidas pelo regime terapêutico empregado.

A avaliação foi composta por escores de 0 a 3, sendo 0 aquele isento de lesão, 1 o que apresentava pouca quantidade de alterações em pequenos pontos, 2 aquele com grande quantidade de alterações em diversos pontos, e 3 aquele com alterações generalizadas. As notas recebidas por cada lobo pulmonar foram somadas, obtendo-se uma nota final por animal, atingindo-se, posteriormente, uma média final para cada grupo em relação a cada um dos parâmetros avaliados, que foram: presença de edema intra-alveolar, hemorragia, infiltrado de células polimorfonucleares e infiltrado de células mononucleares.

4.11 Delineamento experimental

Todos os animais do experimento foram mantidos sob anestesia geral durante o decorrer do mesmo. O início das mensurações basais deu-se 10 minutos após a realização das manobras de recrutamento. Todos os animais receberam fluidoterapia de manutenção com solução de ringer lactato, na dose de 5ml/kg/hr. Nos grupos onde a lesão pulmonar aguda foi induzida, foram instilados um volume de 4ml/kg de HCl 0.1N na região da bifurcação traqueal. Decorridos 15 minutos após a instilação de HCl, os animais do grupo ALI-HS receberam uma dose intravenosa lenta de 4 ml/kg de solução salina hipertônica. Os animais pertencentes ao grupo Controle-HS receberam a mesma dose de solução salina hipertônica, 15 minutos após a mensuração basal. Após o período de observação, os animais foram prontamente eutanasiados (Figura 3).

A análise dos gases sanguíneos bem como a coleta das variáveis hemodinâmicas e ventilatórias, foi realizada em cada tempo proposto. Os tempos analisados estão abaixo relacionados:

Basal (TB): 15 minutos após o final da instrumentação, logo após o recrutamento pulmonar. Após coleta e mensuração dos dados propostos, administrou-se HCl nos grupos ALI e ALI+HS.

ALI (T30): 30 minutos após a mensuração de TB. Após coleta e mensuração dos dados propostos, iniciou-se a infusão de solução salina hipertônica 7,5% nos grupos ALI+HS e HS.

Tempo 0 (T90): 90 minutos após a mensuração basal.

Tempo 1 (T150): 150 minutos após a mensuração basal.

Tempo 2 (T210): 210 minutos após a mensuração basal.

Tempo 3 (T270): 270 minutos após mensuração basal. Os animais são eutanasiados para coleta do tecido pulmonar.

Figura 3 – Diagrama representando o delineamento experimental proposto pelo estudo.

4.12 Destino dos animais

Os animais foram destinados ao Setor de Coleta de Material Infectante da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.13 Análise estatística

Peso corporal, parâmetros hemodinâmicos, ventilatórios e demais valores paramétricos foram confrontados estatisticamente por meio de provas paramétricas, empregando-se o método de comparações múltiplas para análise de variância (ANOVA) para mensurações repetidas²⁶. O teste de Tukey-Kramer, quando apropriado, foi empregado para a comparação dos diferentes tempos de observação de um mesmo grupo e entre grupos. Na análise histopatológica, foram realizadas as somas das pontuações obtidas nas quatro regiões pulmonares estudadas, utilizando-se o teste ANOVA de uma via.

²⁶ InStat 3.01, GraphPad, San Diego, USA

O grau de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0.05$).

O número (n) de animais empregados neste estudo, de 8 por grupo, foi pré-determinado utilizando-se como base estudos experimentais previamente realizados envolvendo animais da espécie suína, uma vez que, para projetos experimentais envolvendo animais desta espécie, os fatores ético e financeiro podem justificar a não utilização de uma grande amostra.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Não houve óbitos de animais durante o período de estudo. Todos os valores apresentados a seguir, com exceção da análise das citocinas do lavado broncoalveolar, referem-se à média e ao desvio padrão dos grupos compostos por um total de 8 animais cada.

5.1 Animais:

Dos 32 animais estudados, pode-se verificar na tabela 1 a média de peso, assim como o volume de HCl e NaCl 7,5% (HS) instilado nos grupos ALI, ALI+HS e HS. Não houve diferenças entre grupos.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão de peso, volume de HCl instilado e volume de HS infundido dos grupos estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Grupo	Peso dos animais (Kg)	Volume HCl instilado (ml)	Volume HS infundido (ml)
Sham	29,6 $\pm$ 2,57	--	--
HS	29,23 $\pm$ 4,09	--	117,1 $\pm$ 15,99
ALI	29,44 $\pm$ 2,75	118,8 $\pm$ 11,53	--
ALI+HS	27,98 $\pm$ 2,73	112,3 $\pm$ 10,58	112,3 $\pm$ 10,58

ALI: lesão pulmonar aguda; HS: solução salina hipertônica; HCl: ácido clorídrico

5.2 Variáveis hemodinâmicas:

5.2.1 Frequência cardíaca e pressões

A tabela 2 relacionada abaixo demonstra os valores de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica, média e diastólica dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS). Pode-se perceber que não houve diferenças estatísticas entre grupos nos dados apresentados a seguir.

Tabela 2 – Frequência cardíaca e pressão arterial sistêmica dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
FC (bpm)	Sham	93,62 $\pm$ 8,3	97 $\pm$ 10,6a	101,3 $\pm$ 19,4b	104,12 $\pm$ 15,4c	107 $\pm$ 21c	108,62 $\pm$ 28,1c
	HS	104,2 $\pm$ 14,8	105 $\pm$ 11,1a	114,6 $\pm$ 15,3b	129,5 $\pm$ 18,2c	122,6 $\pm$ 17,6c	117,2 $\pm$ 10,5c
	ALI	106 $\pm$ 12,6	124,1 $\pm$ 15a	111,5 $\pm$ 18,7b	122,25 $\pm$ 31,4c	119 $\pm$ 30,4c	119,12 $\pm$ 21,3c
	ALI+HS	91,8 $\pm$ 12	114,2 $\pm$ 13,3a	120,3 $\pm$ 21,3b	121,5 $\pm$ 12,2c	124,5 $\pm$ 17,3c	120,7 $\pm$ 18,7c
PAS (mmHg)	Sham	104,2 $\pm$ 14,8	105 $\pm$ 11,14c	114,6 $\pm$ 15,3c	129,5 $\pm$ 18,2c	122,6 $\pm$ 17,6c	117,2 $\pm$ 10,5c
	HS	86,6 $\pm$ 4,4	93,9 $\pm$ 9,8c	106,7 $\pm$ 11,7c	103,9 $\pm$ 14c	98,9 $\pm$ 10,5c	99,5 $\pm$ 8,6c
	ALI	91,2 $\pm$ 9,22	106 $\pm$ 22,9c	102,6 $\pm$ 9,8c	106,5 $\pm$ 9,4c	104,2 $\pm$ 10,2c	104,5 $\pm$ 4,8c
	ALI+HS	89,8 $\pm$ 4,8	110,3 $\pm$ 26c	106,5 $\pm$ 12,5c	109,7 $\pm$ 13c	109,8 $\pm$ 13,7c	104,1 $\pm$ 5,5c
PAD (mmHg)	Sham	54,3 $\pm$ 7,78	53 $\pm$ 3,89a	62,7 $\pm$ 6,9c	63,3 $\pm$ 7,67c	67,3 $\pm$ 11,3c	64,6 $\pm$ 9c
	HS	54,37 $\pm$ 2,13	59 $\pm$ 6,45a	69,62 $\pm$ 10,9c	66,7 $\pm$ 12,2c	60,9 $\pm$ 9c	61,9 $\pm$ 8,37c
	ALI	56,9 $\pm$ 7	65,2 $\pm$ 13,7a	65,2 $\pm$ 7,5c	70,3 $\pm$ 9,7c	67,9 $\pm$ 8,8c	66,1 $\pm$ 6,57c
	ALI+HS	53,2 $\pm$ 3,3	65,3 $\pm$ 13,2a	68,7 $\pm$ 11,5c	71,12 $\pm$ 10,27c	70,5 $\pm$ 10,66c	66,37 $\pm$ 7,2c
PAM (mmHg)	Sham	54,3 $\pm$ 2,13	59 $\pm$ 6,45c	69,62 $\pm$ 10,1c	66,75 $\pm$ 12,2c	60,87 $\pm$ 9,1c	61,87 $\pm$ 8,3c
	HS	66,87 $\pm$ 2,9	72,37 $\pm$ 7,8c	83,9 $\pm$ 10,37c	81 $\pm$ 12c	76 $\pm$ 9,2c	77,12 $\pm$ 7,45c
	ALI	70,25 $\pm$ 7,8	80,62 $\pm$ 16,3c	80,12 $\pm$ 7,8c	84,5 $\pm$ 9c	82,37 $\pm$ 8,6c	81 $\pm$ 4,7c
	ALI+HS	66,87 $\pm$ 3	83 $\pm$ 17,6c	83,5 $\pm$ 11,1c	85,5 $\pm$ 10,8c	85,5 $\pm$ 11,9c	82,2 $\pm$ 84c

FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média (a: $P < 0,05$ vs. TB; b: $P < 0,01$ vs. TB; c: $P < 0,001$ vs. TB)

A tabela 3 relaciona os valores de pressão venosa central, pressão sistólica, média e diastólica da artéria pulmonar e a pressão de artéria pulmonar ocluída dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

Houve diferença estatística entre grupos nas variáveis correspondentes à pressão de artéria pulmonar sistólica, média e diastólica logo após a instalação da lesão pulmonar (T30), persistindo até o final do período de observação. Também houve diferença estatística no grupo HS, na variável referente à pressão média da artéria pulmonar, nos momentos T90, T150, T210 e T270, quando comparados ao seu valor basal. Porém, não houve diferença estatística deste grupo em relação ao grupo Sham.

Nos gráficos dispostos a seguir, pode-se ainda observar o aumento das pressões sistólica (PAPS) – gráfico 1 – e média (PAPM) – gráfico 2 – da artéria pulmonar nos grupos ALI e ALI+HS após administração de HCl (T30). Estas pressões mantiveram-se elevadas em ambos grupos até o final do período de observação.

Tabela 3 - Pressão venosa central e pressões de artéria pulmonar dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
PVC (mmHg)	Sham	9,35 $\pm$ 2,9	11 $\pm$ 2,44	10 $\pm$ 3,02	10,3 $\pm$ 3,2a	10,25 $\pm$ 2,6a	10,37 $\pm$ 2,5
	HS	10,62 $\pm$ 2	10,87 $\pm$ 1,6	11,25 $\pm$ 1,5	10,75 $\pm$ 1,5a	11,12 $\pm$ 1,3a	10,75 $\pm$ 2
	ALI	10 $\pm$ 1,51	9,75 $\pm$ 1,16	10,25 $\pm$ 1,3	10,6 $\pm$ 1,4a	10,5 $\pm$ 1,41a	10,25 $\pm$ 1,5
	ALI+HS	9,3 $\pm$ 1,2	9,25 $\pm$ 1,4	9,62 $\pm$ 1,4	10 $\pm$ 1,4a	10 $\pm$ 1,5a	10,12 $\pm$ 1,72
PAPS (mmHg)	Sham	22,75 $\pm$ 3,8	23 $\pm$ 2,5	23 $\pm$ 2,39	22,75 $\pm$ 4,83	24,62 $\pm$ 3,46	24,75 $\pm$ 3,2
	HS	23,25 $\pm$ 2,12	24,12 $\pm$ 1,72	26,25 $\pm$ 2	26,25 $\pm$ 3	26,5 $\pm$ 2,5a	26,37 $\pm$ 2,4a
	ALI	24,75 $\pm$ 1,3	35,75 $\pm$ 4c###++	30,25 $\pm$ 2,5c##	32,25 $\pm$ 2,3c###+	32,37 $\pm$ 3c###+	34 $\pm$ 2,4c###++
	ALI+HS	23,9 $\pm$ 2,41	37,87 $\pm$ 5,8c###++	30,12 $\pm$ 2,7c##	33,37 $\pm$ 4,4c###++	34,37 $\pm$ 4c###++	33,37 $\pm$ 4c###++
PAPD (mmHg)	Sham	14,9 $\pm$ 1,8	16 $\pm$ 2,1	15,5 $\pm$ 3,16	15,62 $\pm$ 3,42	16,12 $\pm$ 3,5	15,75 $\pm$ 3
	HS	16,5 $\pm$ 2	16,6 $\pm$ 1,3	19,75 $\pm$ 1,7a	16,5 $\pm$ 6,2	18,5 $\pm$ 2,26	19,12 $\pm$ 2,4
	ALI	16,25 $\pm$ 2,1	25,7 $\pm$ 3,2c###++	19,75 $\pm$ 3,4a	22,25 $\pm$ 3,2c###+	21,75 $\pm$ 2,7c#	22,5 $\pm$ 3,9c##
	ALI+HS	14,75 $\pm$ 2,9	26,1 $\pm$ 5,2c###++	21,75 $\pm$ 3,3c#	24 $\pm$ 3,1c###++	24,12 $\pm$ 4,2c###+	23,5 $\pm$ 3,2c###+
PAPM (mmHg)	Sham	14,85 $\pm$ 1,8	16 $\pm$ 2,13	15,5 $\pm$ 3,1	15,62 $\pm$ 3,4	16,12 $\pm$ 3,5	15,75 $\pm$ 2,3
	HS	16,5 $\pm$ 2	16,62 $\pm$ 1,3	19,75 $\pm$ 1,6b	16,5 $\pm$ 6,2b	18,5 $\pm$ 2,2b	19,12 $\pm$ 2,4b
	ALI	16,25 $\pm$ 2,1	25,75 $\pm$ 3,2c###++	19,75 $\pm$ 3,4c##	22,25 $\pm$ 3,2c###+	21,75 $\pm$ 2,7c###+	22,5 $\pm$ 3,9c###+
	ALI+HS	14,75 $\pm$ 2,8	26,12 $\pm$ 5,2c###++	21,75 $\pm$ 3,3c##	24 $\pm$ 3,2c###++	24,12 $\pm$ 4,2c###++	23,5 $\pm$ 19,1c###+
PAPO (mmHg)	Sham	11,9 $\pm$ 2,4	12,5 $\pm$ 2,3	12,12 $\pm$ 2,1	12,62 $\pm$ 2,1	13 $\pm$ 2,2	12,9 $\pm$ 2,3
	HS	12,75 $\pm$ 1	13,5 $\pm$ 1,2	14 $\pm$ 1,4	13,75 $\pm$ 1	14,12 $\pm$ 1,6a	13,75 $\pm$ 1,5
	ALI	12,5 $\pm$ 2	13,37 $\pm$ 2,3	13,62 $\pm$ 2,5	13,25 $\pm$ 3,3	13,87 $\pm$ 1,7a	13,25 $\pm$ 2
	ALI+HS	13 $\pm$ 1,3	12,37 $\pm$ 1	12,9 $\pm$ 1,2	11,9 $\pm$ 0,83	12,37 $\pm$ 0,74a	12,62 $\pm$ 0,9

PVC: pressão venosa central; PAPS: pressão sistólica da artéria pulmonar; PAPD: pressão diastólica da artéria pulmonar; PAPM: pressão média da artéria pulmonar; PAPO: pressão da artéria pulmonar ocluída (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham; ###: P<0,001 vs. Sham; +: P<0,05 vs. HS; ++: P<0,001 vs. HS)

Gráfico 1. Variação da pressão sistólica da artéria pulmonar (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: $P < 0,001$ vs TB; ##: $P < 0,001$ vs Grupo Sham; ++: $P < 0,001$ vs Grupo HS)

Gráfico 2. Variação da pressão média da artéria pulmonar (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (b: $0,01 < p$ vs TB; c: $P < 0,001$ vs TB; ##: $P < 0,001$ vs Grupo Sham; +: $P < 0,05$; ++: $P < 0,001$ vs Grupo HS)

5.2.2 Hematócrito:

Os valores de hematócrito (Hto) analisados por meio de micro-centrífuga encontram-se relacionados na tabela 4. Percebe-se que os animais do grupo ALI e ALI+HS apresentaram aumento significativo do hematócrito logo após a instilação de HCl. No grupo ALI, o hematócrito manteve-se aumentado durante todo período de observação, quando comparado ao grupo Sham, enquanto que o grupo ALI+HS retornou aos valores próximos aos valores basais após T90.

Tabela 4 - Valores de hematócrito dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
Hto	Sham	27 $\pm$ 3,66	27,12 $\pm$ 2,7	26 $\pm$ 4,14	26,5 $\pm$ 3,66	26,25 $\pm$ 3,65	26 $\pm$ 3,3
(%)	HS	30,37 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1,92	28,25 $\pm$ 1,91 b	28,37 $\pm$ 1,5a	28,5 $\pm$ 1,85a	28,37 $\pm$ 1,6a
	ALI	29,75 $\pm$ 2,65	31,5 $\pm$ 4,5#	30,12 $\pm$ 2,64#	30,25 $\pm$ 2,2#	30,87 $\pm$ 2,53#	31,25 $\pm$ 2,25#
	ALI+HS	29,87 $\pm$ 2,1	31,25 $\pm$ 3#	27,75 $\pm$ 2 b	28,37 $\pm$ 2	28,87 $\pm$ 2	29,12 $\pm$ 1,95

Hto: hematócrito (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham)

5.2.3 Índices de resistência vascular:

Na tabela 5 estão relacionados os índices de resistência vascular sistêmica (IRVS) e pulmonar (IRVP) dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

Tabela 5 - Índice de resistência vascular sistêmica e índice de resistência vascular pulmonar dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
IRVS (dinas.s.cm ⁻⁵ .m ²)	Sham	1317,7 $\pm$ 188,6	1249,6 $\pm$ 138,4	1348 $\pm$ 158,4	1302,1 $\pm$ 236,5	1362,1 $\pm$ 202	1274,3 $\pm$ 111
	HS	1185,9 $\pm$ 124,3	1178,2 $\pm$ 140	1157,7 $\pm$ 202	1115,9 $\pm$ 200	1116,5 $\pm$ 228,1	1172,4 $\pm$ 272
	ALI	1228,5 $\pm$ 152,4	1343,1 $\pm$ 335,3	1317,6 $\pm$ 354,3	1372,2 $\pm$ 320,5	1419,9 $\pm$ 352,4	1375,5 $\pm$ 187
	ALI+HS	1266,4 $\pm$ 175,1	1349,3 $\pm$ 291,2	1222,7 $\pm$ 254,2	1247,6 $\pm$ 280,5	1251,6 $\pm$ 274,1	1241,7 $\pm$ 269
IRVP (dinas.s.cm ⁻⁵ .m ²)	Sham	131 $\pm$ 20,8	129 $\pm$ 18	121,1 $\pm$ 16,3	131,6 $\pm$ 29,5	132,5 $\pm$ 28	131 $\pm$ 30,4
	HS	128,1 $\pm$ 15	119,4 $\pm$ 30	130 $\pm$ 40	130,3 $\pm$ 27,2	132 $\pm$ 31,4	149 $\pm$ 28b
	ALI	152,25 $\pm$ 31,3	331,75 $\pm$ 114c###+	224,9 $\pm$ 51b####	266,2 $\pm$ 77c####	230 $\pm$ 57b####	290 $\pm$ 51c####
	ALI+HS	137,5 $\pm$ 35,5	364,4 $\pm$ 127c####	207,1 $\pm$ 57b###	266,2 $\pm$ 52c####	266,5 $\pm$ 66c####	263,3 $\pm$ 58c####

IRVS: índice de resistência vascular sistêmica; IRVP: índice de resistência vascular pulmonar (IRVP). (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham; ##: P<0,001 vs. Sham; +: P<0,05 vs. HS; ++: P<0,001 vs. HS)

Os dados mostram um aumento significativo do índice de resistência vascular pulmonar logo após T30 nos grupos ALI e ALI+HS, que permanece durante todo o período de observação. Não houve diferença estatística quanto ao índice de resistência vascular sistêmica.

5.2.4 Débito e índices cardíacos:

Abaixo encontram-se relacionados os valores de débito cardíaco e índices cardíacos dos animais estudados. Pode-se perceber que tanto o débito cardíaco quanto o índice cardíaco e o índice de volume sistólico mantiveram-se estáveis durante o período observado em todos os grupos. O índice de trabalho sistólico ventricular direito (ITSVD) apresentou aumento significativo após T30 nos grupos ALI e ALI+HS, mantendo-se esta diferença até o final do estudo. Também houve diferença estatística quanto ao ITSVD no grupo HS no momento T90, quando comparado ao grupo Sham. O índice de trabalho sistólico ventricular esquerdo manteve-se sem alterações entre os grupos.

Os gráficos 3 e 4 a seguir representam os valores médios e desvio padrão do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) e o índice de trabalho sistólico ventricular direito (ITSVD), onde pode-se observar o aumento significativo apresentado por estas variáveis após o tempo T30 nos grupos ALI e ALI+HS, apresentando correlação com um quadro de hipertensão pulmonar.

Tabela 6 - Valores de débito cardíaco, índice cardíaco, índice de volume sistólico, índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo e direito (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
DC (L/min)	Sham	3,03 $\pm$ 0,55	3,15 $\pm$ 0,5a	3,45 $\pm$ 0,55c	3,62 $\pm$ 0,5c	3,63 $\pm$ 0,61c	3,73 $\pm$ 0,74c
	HS	3,16 $\pm$ 0,46	3,47 $\pm$ 0,5a	4,16 $\pm$ 0,32c	4,2 $\pm$ 0,6c	3,9 $\pm$ 0,61c	3,83 $\pm$ 0,66c
	ALI	3,43 $\pm$ 0,71	3,63 $\pm$ 0,9a	3,85 $\pm$ 0,97c	3,82 $\pm$ 0,8c	3,62 $\pm$ 0,77c	3,61 $\pm$ 0,63c
	ALI+HS	2,95 $\pm$ 0,2	3,55 $\pm$ 0,4a	3,93 $\pm$ 0,44c	3,96 $\pm$ 0,3c	3,92 $\pm$ 0,2c	3,81 $\pm$ 0,37c
IC (L/min/m ²)	Sham	3,57 $\pm$ 0,63	3,71 $\pm$ 0,51	4,03 $\pm$ 0,5	4,26 $\pm$ 0,5	4,27 $\pm$ 0,7	4,38 $\pm$ 0,75b
	HS	3,72 $\pm$ 0,32	4,06 $\pm$ 0,35	4,91 $\pm$ 0,43c#	4,92 $\pm$ 0,6c	4,61 $\pm$ 0,71c	4,52 $\pm$ 0,75b
	ALI	3,9 $\pm$ 0,65	4,2 $\pm$ 0,9	4,42 $\pm$ 0,95	4,4 $\pm$ 0,84	4,2 $\pm$ 0,76	4,17 $\pm$ 0,55
	ALI+HS	3,47 $\pm$ 0,27	4,27 $\pm$ 0,4c	4,75 $\pm$ 0,5c	4,77 $\pm$ 0,4c	4,75 $\pm$ 0,4c	4,6 $\pm$ 0,45c
IVS (ml/m ²)	Sham	38,25 $\pm$ 5,9	38,6 $\pm$ 3,99	40,5 $\pm$ 5,47a	41,25 $\pm$ 4,6	40,62 $\pm$ 5,2	41,12 $\pm$ 4,8
	HS	36,12 $\pm$ 4,4	39,12 $\pm$ 4	43,5 $\pm$ 5,55a	38,37 $\pm$ 4,1	37,62 $\pm$ 3,6	38,5 $\pm$ 5,31
	ALI	37,37 $\pm$ 5,2	34,87 $\pm$ 7	40,12 $\pm$ 7,2a	37,75 $\pm$ 9,2	36,75 $\pm$ 8,5	35,9 $\pm$ 6,37
	ALI+HS	39,5 $\pm$ 4,6	37,75 $\pm$ 5	40,25 $\pm$ 6a	39,62 $\pm$ 3,9	38,62 $\pm$ 6,5	38,37 $\pm$ 4,9
ITSVE (g-m/m2/b)	Sham	29,62 $\pm$ 9,4	31 $\pm$ 8,33a	35,87 $\pm$ 5,6c	37,25 $\pm$ 5,4c	38 $\pm$ 6,25c	37 $\pm$ 5,12c
	HS	26,37 $\pm$ 3,2	31,37 $\pm$ 5,3a	40,62 $\pm$ 5,4c	35,12 $\pm$ 8,2c	31,87 $\pm$ 7c	33,25 $\pm$ 5,7c
	ALI	29,87 $\pm$ 8,4	31,6 $\pm$ 12,3a	36 $\pm$ 5,9c	36,25 $\pm$ 10,8c	34 $\pm$ 8,15c	33 $\pm$ 6c
	ALI+HS	28,5 $\pm$ 4	36,5 $\pm$ 11,2a	38,25 $\pm$ 5,1c	39,37 $\pm$ 4,43c	38,12 $\pm$ 6,1c	36,37 $\pm$ 4,3c
ITSVD (g-m/m2/b)	Sham	4,25 $\pm$ 1,5	4,37 $\pm$ 1,5	4,6 $\pm$ 1,7	4,9 $\pm$ 1,7	5,25 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,7
	HS	4,12 $\pm$ 1,24	4,75 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,75a##	6 $\pm$ 1,5	5,75 $\pm$ 1,5	5,87 $\pm$ 1,45
	ALI	5 $\pm$ 1,41	10,12 $\pm$ 3,9c####	8,62 $\pm$ 2,13c##	8,5 $\pm$ 2,32c##+	7,75 $\pm$ 2,43b#	8,8 $\pm$ 1,64c##+
	ALI+HS	5,25 $\pm$ 1,16	11,62 $\pm$ 4,3c####	8,37 $\pm$ 0,74c##	9,62 $\pm$ 1,4c##+	9,5 $\pm$ 1,7c####	9,35 $\pm$ 1,4c#+

DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; IVS: índice de volume sistólico; ITSVE: índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo; ITSVD: índice de trabalho sistólico do ventrículo direito (a: P<0,05; b: P<0,01; c: P<0,001 vs TB; #: P<0,05; ##: P<0,001 vs Grupo Sham; +: P<0,05; ++: P<0,001 vs Grupo HS)

Gráfico 3. Variação do índice de resistência vascular pulmonar (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (b: $P < 0,01$ vs. TB; c: $P < 0,001$ vs. TB; ##: $P < 0,001$ vs. Sham; +: $P < 0,05$ vs. HS; ++: $P < 0,001$ vs. HS)

Gráfico 4. Variação do índice de trabalho sistólico do ventrículo direito (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (a: $P < 0,05$ vs. TB; b: $P < 0,01$ vs. TB; c: $P < 0,001$ vs. TB; #: $P < 0,05$ vs. Sham; ##: $P < 0,001$ vs. Sham; +: $P < 0,05$ vs. HS; ++: $P < 0,001$ vs. HS)

5.3 Ventilação

5.3.1 Frequência respiratória e volume corrente

Estão relacionados na tabela 7 abaixo os dados referentes à frequência respiratória e volume corrente dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

No que diz respeito à frequência respiratória, o grupo ALI apresentou diferença significativa no momento T30, quando comparado ao seu valor basal. O grupo ALI+HS, além de diferença significativa em relação ao seu valor basal, apresentou também diferença estatística em relação ao grupo Sham no momento T30, devido aos ajustes necessários na ventilação para que se mantivesse a concentração de dióxido de carbono no ar expirado entre 35-45 mm Hg.

Tabela 7 - Frequência respiratória e volume corrente dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
FR (mpm)	Sham	20,62 $\pm$ 1,2	20,62 $\pm$ 1,2	20,12 $\pm$ 1,1	20,12 $\pm$ 1,1	20,12 $\pm$ 1,1	20,12 $\pm$ 1,1
	HS	21,5 $\pm$ 2,56	21,5 $\pm$ 2,56	21,12 $\pm$ 2,1	21,12 $\pm$ 2,1	21,37 $\pm$ 2,3	21,37 $\pm$ 2,3
	ALI	21,62 $\pm$ 1,9	23,12 $\pm$ 3,2b	21,62 $\pm$ 2,2	21,37 $\pm$ 2,2	21,62 $\pm$ 2,3	21,62 $\pm$ 2,3
	ALI+HS	20,75 $\pm$ 1,7	23,5 $\pm$ 2,67b#	21,25 $\pm$ 1,7	21,25 $\pm$ 1,7	21,5 $\pm$ 1,7	21,87 $\pm$ 1,6
VC (ml)	Sham	245,6 $\pm$ 33,4	260,3 $\pm$ 31,6	256,2 $\pm$ 30,6	257,6 $\pm$ 29,5	248,7 $\pm$ 29,5	250,6 $\pm$ 27
	HS	256,7 $\pm$ 27,8	247,6 $\pm$ 20,6	252,5 $\pm$ 24,5	252 $\pm$ 22,3	248,9 $\pm$ 21,9	240 $\pm$ 23,7a
	ALI	254,3 $\pm$ 21,5	245,2 $\pm$ 24,8	251,2 $\pm$ 23	248,2 $\pm$ 18,6	246,6 $\pm$ 22,2	243,2 $\pm$ 27,8
	ALI+HS	248,6 $\pm$ 17,4	231,5 $\pm$ 25,2a	232,7 $\pm$ 22,4a	233,1 $\pm$ 24a	240 $\pm$ 24	234,2 $\pm$ 28,4

FR: frequência respiratória; VC: volume corrente. (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham; ##: P<0,01 vs. Sham)

5.3.2 Pressões de vias aéreas

Estão relacionados abaixo os dados referentes às pressões de pico, platô, pressão média e pressão inspiratória das vias aéreas.

Houve diferença significativa dos grupos ALI e ALI+HS em relação aos grupos Sham e HS, a partir do momento T30, mantendo-se durante todo o período observacional, em todos os parâmetros avaliados (pressão de pico, platô, pressão média e pressão inspiratória de vias aéreas).

Tabela 8 - Pressão de pico, platô, pressão média e pressão inspiratória das vias aéreas dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
PPico (cmH ₂ O)	Sham	13,25 $\pm$ 1,8	14,32 $\pm$ 1,8a	14,37 $\pm$ 1,8b	14,5 $\pm$ 1,7b	14,5 $\pm$ 1,7b	14,87 $\pm$ 1,8c
	HS	14,37 $\pm$ 1,6	14,75 $\pm$ 2b	15,62 $\pm$ 1,7b	15,87 $\pm$ 1,9c	16 $\pm$ 2c	16,12 $\pm$ 2,2c
	ALI	14,75 $\pm$ 1,8	25,37 $\pm$ 2,4c###++	23,37 $\pm$ 2,4c###++	23,5 $\pm$ 2,7c###++	23,37 $\pm$ 2,8c###++	23,62 $\pm$ 2,7c###++
	ALI+HS	14,25 $\pm$ 1,5	25,25 $\pm$ 2,3c###++	23,9 $\pm$ 2,5c###++	24,12 $\pm$ 2,3c###++	24,25 $\pm$ 1,8c###++	24,12 $\pm$ 1,5c###++
PPlat (cmH ₂ O)	Sham	13,12 $\pm$ 1,4	14 $\pm$ 1,06b	14 $\pm$ 1,7b	14 $\pm$ 1,6b	14,12 $\pm$ 1,6c	14,25 $\pm$ 1,6c
	HS	14 $\pm$ 1,5	14,25 $\pm$ 1,8	14,87 $\pm$ 1,8b	15,12 $\pm$ 1,6c	15,37 $\pm$ 1,9c	15,5 $\pm$ 2c
	ALI	14,25 $\pm$ 1,4	22,87 $\pm$ 1,3c###++	21 $\pm$ 1,5c###++	21 $\pm$ 1,7c###++	20,87 $\pm$ 1,8c###++	21 $\pm$ 1,7c###++
	ALI+HS	14 $\pm$ 1,2	22,75 $\pm$ 1,6c###++	21,25 $\pm$ 1,7c###++	21,37 $\pm$ 1,6c###++	21,37 $\pm$ 1,2c###++	21,37 $\pm$ 1,2c###++
PM (cmH ₂ O)	Sham	7,5 $\pm$ 0,53	7,87 $\pm$ 0,64	8,12 $\pm$ 0,7	8 $\pm$ 0,53	8 $\pm$ 0,53	8 $\pm$ 0,53
	HS	7,87 $\pm$ 0,64	7,87 $\pm$ 0,83	8,12 $\pm$ 0,64	8,25 $\pm$ 0,7	8 $\pm$ 1	8,5 $\pm$ 0,53
	ALI	8 $\pm$ 0,53	10 $\pm$ 2,13c###++	10,37 $\pm$ 0,74c###++	10,25 $\pm$ 0,7c###++	10,25 $\pm$ 0,7c###++	10,5 $\pm$ 0,53c###++
	ALI+HS	7,87 $\pm$ 0,64	10,5 $\pm$ 0,75c###++	10,12 $\pm$ 0,35c###++	10,37 $\pm$ 0,5c###++	10,25 $\pm$ 0,4c###++	10,25 $\pm$ 0,4c###++
PI (cmH ₂ O)	Sham	13,66 $\pm$ 1,6	14,16 $\pm$ 1,3	14,16 $\pm$ 1,6	14,33 $\pm$ 1,6	14,33 $\pm$ 1,6	14,5 $\pm$ 1,5b#
	HS	13,71 $\pm$ 1,2	13,72 $\pm$ 1,2	14,28 $\pm$ 1,2	14,57 $\pm$ 1,2b	15,14 $\pm$ 1,8c	15,14 $\pm$ 1,8c
	ALI	14,3 $\pm$ 1,4	21,85 $\pm$ 1,5c###++	20,85 $\pm$ 1,7c###++	20,85 $\pm$ 1,7c###++	20,85 $\pm$ 1,7c###++	21 $\pm$ 1,63c###++
	ALI+HS	14 $\pm$ 1,2	22,42 $\pm$ 1,5c###++	20,83 $\pm$ 1,3c###++	21 $\pm$ 1,2c###++	21 $\pm$ 1,2c###++	20,83 $\pm$ 1,1c###++

PPico: pressão de pico; PPlat: pressão platô; PM: pressão média; PI: pressão inspiratória. (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; ###: P<0,001 vs. Sham; ++: P<0,001 vs. HS)

5.3.3 Complacência pulmonar estática

O gráfico 5 abaixo refere-se aos valores de complacência pulmonar estática dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS). Houve redução da complacência pulmonar com diferença estatística nos grupos ALI e ALI+HS ($13,93 \pm 1,4$ e $13,5 \pm 2$, respectivamente) em relação aos grupos Sham e HS ($30,73 \pm 4,5$ e $28 \pm 4,6$, respectivamente), imediatamente após administração de HCl (T30). A complacência permaneceu reduzida nestes grupos em todos os períodos observados após instauração da lesão pulmonar aguda, até o final do período de observação.

Gráfico 5. Variação da complacência pulmonar estática (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: $P < 0,001$ vs. TB; ##: $P < 0,001$ vs. Sham; ++: $P < 0,001$ vs. HS)

5.3.4 Índice do volume de sangue intra-torácico e do conteúdo extravascular de água pulmonar

Os índices de volume de sangue intra-torácico e do conteúdo extravascular de água pulmonar dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) estão demonstrados na tabela 9 a seguir. Pode-se perceber que não houve diferenças entre grupos, somente em relação ao iCEVAP no grupo ALI, durante o momento T30, quando comparado ao Sham.

Tabela 9 - Índice de volume de sangue intra-torácico e índice do conteúdo extravascular de água pulmonar (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
iVSIT (ml/m ²)	Sham	594 $\pm$ 88,6	627,3 $\pm$ 71	631,5 $\pm$ 43,8c	605,6 $\pm$ 52	641,2 $\pm$ 50	611,8 $\pm$ 26,7
	HS	662 $\pm$ 148	655,3 $\pm$ 77	715,6 $\pm$ 81c	681 $\pm$ 113	667 $\pm$ 86	648 $\pm$ 76
	ALI	589 $\pm$ 64,8	647 $\pm$ 83	665 $\pm$ 111c	646,2 $\pm$ 48	634,8 $\pm$ 71	588 $\pm$ 44
	ALI+HS	592,7 $\pm$ 42	580,6 $\pm$ 64	651,6 $\pm$ 38c	622 $\pm$ 42	601 $\pm$ 33,7	594,3 $\pm$ 38,5
iCEVAP (ml/Kg)	Sham	10,6 $\pm$ 1,7	10,8 $\pm$ 1,7	10,6 $\pm$ 1	11,6 $\pm$ 2,3c	11,5 $\pm$ 2,5c	12 $\pm$ 2,6c
	HS	9,65 $\pm$ 1,8	11,6 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2,3c	12 $\pm$ 1,65c	11,75 $\pm$ 1,9c	12,5 $\pm$ 2,2c
	ALI	10,4 $\pm$ 1,11	12 $\pm$ 1,6c#	11,2 $\pm$ 1,6	11 $\pm$ 1,5	11,3 $\pm$ 1,6	11 $\pm$ 0,9
	ALI+HS	10,2 $\pm$ 1,4	10,7 $\pm$ 0,8	11,4 $\pm$ 1	11,3 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 1,1	11 $\pm$ 0,1

iVSIT: índice de volume de sangue intra-torácico; iCEVAP: índice do conteúdo extravascular de água pulmonar. (c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham)

5.4 Hemogasometria:

5.4.1 Arterial

A seguir encontram-se relacionados os valores do conteúdo arteriolar de oxigênio, dióxido de carbono, saturação de oxigênio, hemoglobina, lactato e pH obtidos na análise hemogasométrica do sangue arterial dos animais estudados.

Houve redução do conteúdo arteriolar de oxigênio nos grupos ALI e ALI+HS após instauração da lesão pulmonar aguda (T30), apresentando diferença estatística em relação aos grupos Sham e HS em todos os momentos analisados após instilação do ácido clorídrico. Já o PaCO_2 somente demonstrou diferença estatística nos grupos ALI e ALI+HS no momento T30, retornando a valores próximos aos valores basais nos momentos seguintes. O mesmo ocorreu com a SO_2 e com o pH. No entanto, o grupo ALI+HS, apesar de apresentar valores de pH próximos aos valores basais nos momentos T150, T210 e T270, seus valores diferiram estatisticamente dos valores obtidos no grupo Sham. Nos gráficos 6, 7 e 8, podemos observar as alterações da PaO_2 , da PaCO_2 e do pH dos animais ao longo do tempo.

Tabela 10 - Valores dos gases do sangue arterial, pH e lactato dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
PaO ₂ (mmHg)	Sham	239 $\pm$ 17	233,4 $\pm$ 20	228,3 $\pm$ 17	230 $\pm$ 16,4	230,3 $\pm$ 8,3	232,4 $\pm$ 11,1
	HS	208,7 $\pm$ 42	226,2 $\pm$ 26,7	213,6 $\pm$ 16	210,32 $\pm$ 20,4	205,85 $\pm$ 22,9	203,1 $\pm$ 23,13
	ALI	223,9 $\pm$ 15,2	117,1 $\pm$ 21,5c###++	147,6 $\pm$ 29c###++	160 $\pm$ 34,8c###++	165,8 $\pm$ 29,7c###+	174,12 $\pm$ 24,5c##
	ALI+HS	233,11 $\pm$ 20,3	120,4 $\pm$ 26,2c###++	136,2 $\pm$ 30,7c###++	155,8 $\pm$ 32,2c###++	157 $\pm$ 22,9c###++	164,54 $\pm$ 25,3c##+
PaCO ₂ (mmHg)	Sham	40,28 $\pm$ 4,24	38,3 $\pm$ 5,3	39,2 $\pm$ 5,1	38,8 $\pm$ 4,7	38,4 $\pm$ 4,6	38,4 $\pm$ 4,6
	HS	39,31 $\pm$ 2,6	39 $\pm$ 3	41,3 $\pm$ 3,3	40,9 $\pm$ 2,64	41 $\pm$ 2	41,2 $\pm$ 1,75
	ALI	42,42 $\pm$ 2,9	58 $\pm$ 15,1c###++	41,18 $\pm$ 6	42,66 $\pm$ 5,6	43 $\pm$ 5,6	43,6 $\pm$ 3,7
	ALI+HS	41,11 $\pm$ 3,22	52,9 $\pm$ 6,5c###++	41,75 $\pm$ 2,3	42,5 $\pm$ 2	42,84 $\pm$ 4,5	43,91 $\pm$ 4,39
SO ₂ (%)	Sham	99,67 $\pm$ 0,07	99,76 $\pm$ 0,10	99,75 $\pm$ 0,69	99,71 $\pm$ 0,135	99,7 $\pm$ 0,13	99,73 $\pm$ 0,11
	HS	99,65 $\pm$ 0,053	99,66 $\pm$ 0,09	99,6 $\pm$ 0,07	99,56 $\pm$ 0,09	99,55 $\pm$ 0,14	99,45 $\pm$ 0,23
	ALI	99,62 $\pm$ 0,07	97,12 $\pm$ 2,35c###++	98,92 $\pm$ 0,57	99,05 $\pm$ 0,67	99,16 $\pm$ 0,51	99,4 $\pm$ 0,16
	ALI+HS	99,71 $\pm$ 0,13	97,23 $\pm$ 2,2c###++	98,61 $\pm$ 0,81b#+	98,96 $\pm$ 0,5	99,1 $\pm$ 0,3	99,12 $\pm$ 0,4
Hb (%)	Sham	8,12 $\pm$ 1,6	8,18 $\pm$ 0,69	7,56 $\pm$ 1,65	7,86 $\pm$ 1,7	7,61 $\pm$ 1,6	7,55 $\pm$ 1,5
	HS	8,86 $\pm$ 0,8	8,23 $\pm$ 0,86	8,07 $\pm$ 0,77	8,2 $\pm$ 0,62	8,22 $\pm$ 0,73	8,2 $\pm$ 0,61
	ALI	8,95 $\pm$ 0,96	10,25 $\pm$ 1,3b###+	8,93 $\pm$ 0,8	9,11 $\pm$ 0,85	9,21 $\pm$ 0,89#	9,21 $\pm$ 0,98#
	ALI+HS	8,58 $\pm$ 0,92	9,41 $\pm$ 1,03	9,07 $\pm$ 2,82	8,12 $\pm$ 0,73	8,26 $\pm$ 0,58	8,38 $\pm$ 0,55
Lactato (mmol/L)	Sham	1,9 $\pm$ 0,73	1,58 $\pm$ 0,44	1,63 $\pm$ 0,3	1,52 $\pm$ 0,3c	1,43 $\pm$ 0,4c	1,36 $\pm$ 0,35c
	HS	1,52 $\pm$ 0,4	1,63 $\pm$ 0,6	1,31 $\pm$ 0,31	1,15 $\pm$ 0,23c	1,1 $\pm$ 0,27c	1,1 $\pm$ 0,26c
	ALI	1,6 $\pm$ 0,47	1,6 $\pm$ 0,32	1,38 $\pm$ 0,3	1,22 $\pm$ 0,3c	1,21 $\pm$ 0,3c	1,11 $\pm$ 0,27c
	ALI+HS	1,72 $\pm$ 0,46	1,82 $\pm$ 0,75	1,7 $\pm$ 0,6	1,42 $\pm$ 0,4c	1,4 $\pm$ 0,22c	1,31 $\pm$ 0,2c
pH arterial	Sham	7,44 $\pm$ 0,04	7,46 $\pm$ 0,05	7,47 $\pm$ 0,05	7,48 $\pm$ 0,05	7,48 $\pm$ 0,04	7,49 $\pm$ 0,04a
	HS	7,45 $\pm$ 0,03	7,45 $\pm$ 0,03	7,43 $\pm$ 0,03	7,45 $\pm$ 0,03	7,45 $\pm$ 0,03	7,45 $\pm$ 0,02
	ALI	7,44 $\pm$ 0,03	7,3 $\pm$ 0,09c###++	7,44 $\pm$ 0,05	7,44 $\pm$ 0,05	7,44 $\pm$ 0,05	7,44 $\pm$ 0,03
	ALI+HS	7,44 $\pm$ 0,03	7,32 $\pm$ 0,04c###++	7,43 $\pm$ 0,03	7,43 $\pm$ 0,02#	7,43 $\pm$ 0,03#	7,44 $\pm$ 0,03#

PaO₂: conteúdo arteriolar de oxigênio; PaCO₂: dióxido de carbono; SO₂: saturação de oxigênio; Hb: hemoglobina. (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,05 vs. Sham; ##: P<0,001 vs. Sham; +: P<0,05 vs. HS; ++: P<0,001 vs. HS)

Gráfico 6. Variação dos valores de PaO₂ (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: P<0,001 vs. TB; ##: P<0,001 vs. Sham; ++: P<0,001 vs. HS)

Gráfico 7. Variação dos valores de PaCO₂ (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: P<0,001 vs. TB; ##: P<0,001 vs. Sham; ++: P<0,001 vs. HS)

Na tabela 11 encontram-se relacionados os valores dos eletrólitos obtidos na análise hemogasométrica arterial dos animais estudados. No gráfico 6 a seguir, estão representados os valores médios e desvio padrão de sódio plasmático. Nota-se que os valores de sódio plasmático diferiram estatisticamente nos grupos HS e ALI+HS nos momentos T90, T150, T210 e T270, quando comparados aos grupos Sham e ALI. O equilíbrio ácido-base diferiu estatisticamente nos grupos ALI e ALI+HS logo após a instilação de HCl, retornando aos valores basais nos demais períodos.

Tabela 11 - Valores dos eletrólitos cloreto de sódio, potássio, bicarbonato e equilíbrio ácido-base dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
Na (mmol/L)	Sham	138 $\pm$ 2,2	139 $\pm$ 2,16	136,5 $\pm$ 4,2	136,7 $\pm$ 4	136,6 $\pm$ 3,3	134,6 $\pm$ 2,6c
	HS	138,7 $\pm$ 1,7	140,2 $\pm$ 3,2	143,3 $\pm$ 2,4c#	143,2 $\pm$ 1,6c# π	142,6 $\pm$ 1,7c# π	142,2 $\pm$ 1,6c# π
	ALI	139 $\pm$ 1,77	138 $\pm$ 2	137,3 $\pm$ 2+	137 $\pm$ 1,9+	136 $\pm$ 2,1b+	136 $\pm$ 1,9b+
	ALI+HS	137,7 $\pm$ 1,8	137,1 $\pm$ 1,5	143,3 $\pm$ 1,6c# π	142,4 $\pm$ 1,9c# π	141,7 $\pm$ 1,5c# π	141,1 $\pm$ 1,8b# π
K (mmol/L)	Sham	3,95 $\pm$ 0,23	3,96 $\pm$ 0,27	4,175 $\pm$ 0,13c	4,28 $\pm$ 0,29c	4,23 $\pm$ 0,277c	4,275 $\pm$ 0,25c
	HS	3,86 $\pm$ 0,24	3,7 $\pm$ 0,23	4,03 $\pm$ 0,35c	4,21 $\pm$ 0,27c	4,23 $\pm$ 0,31c	4,3 $\pm$ 0,23c
	ALI	3,95 $\pm$ 0,11	3,96 $\pm$ 0,21	4,13 $\pm$ 0,2c	4,15 $\pm$ 0,17c	4,36 $\pm$ 0,2c	4,35 $\pm$ 0,3c
	ALI+HS	3,75 $\pm$ 0,12	3,86 $\pm$ 0,23	3,95 $\pm$ 0,25c	4,15 $\pm$ 0,31c	4,25 $\pm$ 0,24c	4,41 $\pm$ 0,25c
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	Sham	27 $\pm$ 0,23	27 $\pm$ 0,3	28 $\pm$ 0,13	28,5 $\pm$ 0,3b	28,2 $\pm$ 0,3a	28,52 $\pm$ 0,2b
	HS	27 $\pm$ 0,24	26,76 $\pm$ 0,23	27,2 $\pm$ 0,35	27,6 $\pm$ 0,27	28 $\pm$ 0,3	28 $\pm$ 0,23a
	ALI	28 $\pm$ 0,11	27 $\pm$ 0,22	27,7 $\pm$ 0,2	28,2 $\pm$ 0,17	28,9 $\pm$ 0,2	29 $\pm$ 0,3
	ALI+HS	27,3 $\pm$ 0,12	26,27 $\pm$ 0,25a	27,2 $\pm$ 0,26	28 $\pm$ 0,3	28 $\pm$ 0,25	29 $\pm$ 0,25c
EAB	Sham	3,56 $\pm$ 2,2	3,65 $\pm$ 2,09	4,92 $\pm$ 2,33b	5,48 $\pm$ 2,64c	5,31 $\pm$ 2,37c	5,61 $\pm$ 2,51c
	HS	3,57 $\pm$ 1,61	3,37 $\pm$ 1,6	3,51 $\pm$ 1,93	4,15 $\pm$ 1,56	4,53 $\pm$ 1,7	4,66 $\pm$ 1,45
	ALI	4,25 $\pm$ 0,92	-0,025 $\pm$ 1,59c#+	4,05 $\pm$ 0,98	4,26 $\pm$ 1,51	5,07 $\pm$ 0,95	4,96 $\pm$ 0,73
	ALI+HS	3,2 $\pm$ 2,17	-0,5 $\pm$ 1,76c#+	2,5 $\pm$ 2,21	3,51 $\pm$ 2,05	3,66 $\pm$ 1,91	4,7 $\pm$ 1,63c

Na: sódio; K: potássio; HCO₃⁻: bicarbonato; EAB: equilíbrio ácido-base. (a: P<0,05 vs. TB; b: P<0,01 vs. TB; c: P<0,001 vs. TB; #: P<0,001 vs. Sham; +: P<0,001 vs. Grupo HS; π : P<0,001 vs. ALI)

Gráfico 8. Variação dos níveis de sódio plasmático (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: $P < 0,001$ vs. TB; #: $P < 0,001$ vs. Sham; π : $P < 0,001$ vs. ALI)

5.4.2 Relação da pressão arterial de oxigênio / fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$):

Pode-se verificar queda acentuada da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ nos grupos ALI e ALI+HS, logo após a indução da lesão pulmonar aguda, atingindo-se valores abaixo de 300 mm Hg no momento T30. Verificou-se ainda que não houve diferença estatística entre o grupo lesão (ALI) e o grupo tratamento (ALI+HS) no que diz respeito aos valores de oxigenação, sendo que ambos grupos mantiveram-se diferentes estatisticamente dos grupos controle (Sham e HS) até o término do período de observação.

Tabela 12 - Fração inspirada de oxigênio e a relação relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
FiO_2 (%)	Sham	49,5 $\pm$ 2,77	50 $\pm$ 2,26	49,5 $\pm$ 3,29	49,5 $\pm$ 3,3	49,3 $\pm$ 3,37	49,25 $\pm$ 3,32
	HS	50,37 $\pm$ 2	50,87 $\pm$ 1,45	50,5 $\pm$ 1,5	50,25 $\pm$ 1,5	49,75 $\pm$ 2	49,87 $\pm$ 1,7
	ALI	49,37 $\pm$ 3,24	48,5 $\pm$ 3,5	48,87 $\pm$ 3,4	48,25 $\pm$ 3,65	48,12 $\pm$ 3,8a	47,87 $\pm$ 3,27c
	ALI+HS	49 $\pm$ 2,13	48,6 $\pm$ 1,5	48,5 $\pm$ 1,6	47,75 $\pm$ 2,25	48,25 $\pm$ 1,67a	47,25 $\pm$ 2,3c
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (mm Hg)	Sham	480,33 $\pm$ 31,4	467,12 $\pm$ 37	462,9 $\pm$ 42,6	464,9 $\pm$ 37,5	468 $\pm$ 25,6	473,2 $\pm$ 30
	HS	437,1 $\pm$ 23,5	445,2 $\pm$ 57	424,5 $\pm$ 34,7	416,9 $\pm$ 50	414,7 $\pm$ 55	406,4 $\pm$ 48#
	ALI	454 $\pm$ 21,7	240 $\pm$ 40,2c####	303,9 $\pm$ 65c####	332,45 $\pm$ 76,3c####	344 $\pm$ 61,5c####	363,3 $\pm$ 43,7c##
	ALI+HS	470 $\pm$ 41,5	244 $\pm$ 51,18c####	279 $\pm$ 60c####	321,1 $\pm$ 65c####	325,3 $\pm$ 44c####	344,2 $\pm$ 52,7c##

FiO_2 : fração inspirada de oxigênio; PaO_2 : pressão arterial de oxigênio (a: $P<0,05$ vs. TB; b: $P<0,01$ vs. TB; c: $P<0,001$ vs. TB; #: $P<0,01$ vs. Sham, ##: $P<0,001$ vs. Sham; +: $P<0,05$ vs. HS; ++ $P<0,01$ vs. HS; +++ $P<0,001$ vs. HS)

No gráfico 9, pode-se observar a representação dos valores médios e desvio padrão da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ dos animais estudados.

Gráfico 9. Variação da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (valores médios e desvio padrão) dos animais dos grupos ALI, ALI+HS, HS e Sham (c: $P<0,001$ vs. TB; #: $P<0,01$ vs. Sham, ##: $P<0,001$ vs. Sham; ++ $P<0,01$ vs. HS; +++ $P<0,001$ vs. HS)

5.4.3 Hemogasometria – sangue venoso-misto

Estão relacionados na tabela 13 os valores obtidos na análise hemogasométrica do sangue venoso-misto dos animais estudados. Não houve diferenças entre grupos, com exceção do aumento de $PvCO_2$ nos grupos ALI e ALI+HS no momento T30.

Tabela 13 – Variáveis avaliadas no sangue venoso-misto dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS). (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetro	Grupo	Tempo					
		TB	T30	T90	T150	T210	T270
PvO_2 (mmHg)	Sham	44,42 $\pm$ 5	44,5 $\pm$ 4,9	47,15 $\pm$ 5,3	48,9 $\pm$ 4	46,6 $\pm$ 3,22	49,6 $\pm$ 7,7
	HS	45,86 $\pm$ 3,4	49,25 $\pm$ 6	53,46 $\pm$ 3,8	51,9 $\pm$ 3,9	50,93 $\pm$ 4,3	49,16 $\pm$ 3,54
	ALI	48,3 $\pm$ 5,7	54,8 $\pm$ 16a	46,42 $\pm$ 4,5	48,25 $\pm$ 5,74	47,2 $\pm$ 3,5	47,45 $\pm$ 4,6
	ALI+HS	46,93 $\pm$ 4,24	52,13 $\pm$ 58	49,35 $\pm$ 4,96	50,85 $\pm$ 3,8	49,26 $\pm$ 4,4	48,9 $\pm$ 6
$PvCO_2$ (mmHg)	Sham	49,77 $\pm$ 5,9	47,62 $\pm$ 6,9	46,16 $\pm$ 4,9	47,85 $\pm$ 3,23	46,51 $\pm$ 4	45,9 $\pm$ 3,7
	HS	48,4 $\pm$ 4,1	46,76 $\pm$ 3,82	47,28 $\pm$ 3,9c	47,25 $\pm$ 3,34	47,42 $\pm$ 2,15	47,5 $\pm$ 2,94
	ALI	51,66 $\pm$ 3,93	60,92 $\pm$ 12c#	47,98 $\pm$ 6,45	50,11 $\pm$ 6,63	49,71 $\pm$ 7,73	50,41 $\pm$ 5,14
	ALI+HS	50,15 $\pm$ 3,34	58,2 $\pm$ 8,1#	48,9 $\pm$ 3,63	50,25 $\pm$ 5,75	50,3 $\pm$ 4,93	51,1 $\pm$ 5,49
SvO_2	Sham	76,5 $\pm$ 5,92	76,6 $\pm$ 6,63	79 $\pm$ 4,5	81,6 $\pm$ 3,94b	79,5 $\pm$ 3,7	82,11 $\pm$ 4,41
	HS	78,76 $\pm$ 4,93	82,45 $\pm$ 4,8	85,25 $\pm$ 1,7	85 $\pm$ 5,7b	83 $\pm$ 2,34	81,7 $\pm$ 2,9
	ALI	79,33 $\pm$ 6,19	79,26 $\pm$ 11,3	80,23 $\pm$ 3,37	80,72 $\pm$ 5,2b	79,85 $\pm$ 4,8	79,68 $\pm$ 5
	ALI+HS	79,35 $\pm$ 3,82	79,33 $\pm$ 8,31	80,97 $\pm$ 8,4	83 $\pm$ 3,6b	81,1 $\pm$ 3,35	80 $\pm$ 4,55

PvO_2 : pressão parcial de oxigênio no sangue venoso; $PvCO_2$: pressão parcial de Dióxido de carbono; SvO_2 : saturação de oxigênio no sangue venoso (a: $P<0,05$ vs. TB; b: $P<0,01$ vs. TB; c: $P<0,001$ vs. TB; #: $P<0,01$ vs. Sham)

5.5 Resposta inflamatória

5.5.1 Contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar

Os grupos ALI e ALI+HS apresentaram um número mais elevado de neutrófilos no lavado broncoalveolar do que os grupos controles, sendo que houve diferença estatística entre o grupo ALI e os grupos Sham e HS. Os valores médios da contagem celular realizada em câmara de Neubauer encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 – Contagem de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Grupo	Número de células ($\times 10^3$)
Sham	$34,5 \pm 2,5$
HS	$35 \pm 1,3$
ALI	$80 \pm 12,3\#+$
ALI+HS	59 ± 5
(#: $P < 0,05$ vs. Sham; +: $P < 0,05$ vs. HS)	

5.5.2 *Burst* oxidativo

Os dados apresentados a seguir são referentes ao *burst* oxidativo de neutrófilos e macrófagos pulmonares do lavado broncoalveolar dos suínos estudados, marcados com 2,7 diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) e estimulados pelo acetato de forbol miristato (PMA).

As figuras a seguir representam exemplos de citogramas e seus respectivos histogramas de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar dos animais estudados, que foram utilizadas para análise individual das populações celulares.

A tabela 15 representa os valores médios e desvio padrão do *burst* oxidativo dos animais estudados, onde a letra A representa a avaliação isenta de estímulo, a letra B representa a avaliação com a marcação de DCFH, e a letra E representa a avaliação com a marcação de DCFH e o estímulo PMA.

Durante análise do lavado broncoalveolar na citometria de fluxo, foram observadas populações distintas no citograma. A análise do *burst* oxidativo foi realizada considerando-se somente a população de macrófagos e neutrófilos, localizados na região central e deslocados à direita do citograma. Um grupo de células menos ativadas, que se localizavam na região inferior do citograma, foram classificados como monócitos, e não foram incluídos na avaliação.

Observa-se que há uma maior ativação dos macrófagos e neutrófilos pulmonares quando o estímulo PMA é utilizado (E), em todos os grupos, porém com maior intensidade nos grupos ALI e ALI+HS, havendo diferença estatística entre estes dois grupos e os controles. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS). Quando observado somente o *burst* espontâneo, não se verificam alterações significativas entre os grupos. O gráfico 10 representa a análise do *burst* oxidativo dos neutrófilos e macrófagos pulmonares do lavado broncoalveolar dos suínos.

Tabela 15 - Valores representativos do *burst* oxidativo de macrófagos e neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar dos animais estudados (média $\pm$ desvio padrão)

Grupo	A	B	E
Sham	1 $\pm$ 0,005	23,5 $\pm$ 5,39	51,67 $\pm$ 22,06
HS	1,01 $\pm$ 0,045	24,09 $\pm$ 3,76	57 $\pm$ 20,23
ALI	1 $\pm$ 0,011	28,26 $\pm$ 2,17	244,82 $\pm$ 130##+
ALI+HS	1,06 $\pm$ 0,16	28,07 $\pm$ 3,66	232,65 $\pm$ 122##+

A: Padrão; B: DCFH; E: DCFH+PMA (#: P<0,01 vs. Sham; ##: P<0,001 vs. Grupo Sham; +: P<0,01 vs. HS).

Gráfico 10. Valores médios e desvio padrão do *burst* oxidativo de neutrófilos e macrófagos pulmonares de todos os animais estudados, utilizando-se a marcação com DCFH (B) e o estímulo PMA (E) (#: $P < 0,01$ vs. Sham; ##: $P < 0,001$ vs. Sham; +: $P < 0,01$ vs. HS)

A figura 4 a seguir demonstra populações de macrófagos e neutrófilos ativados (círculo vermelho) no lavado broncoalveolar, na indução do *burst* oxidativo com DCFH+PMA, de um animal do grupo ALI (lesão). O histograma (à direita) demonstra o *burst* oxidativo desta população selecionada.

A figura 5 demonstra populações de macrófagos e neutrófilos ativados (círculo vermelho) no lavado broncoalveolar, na indução do *burst* oxidativo com DCFH+PMA, de um animal do grupo Sham (controle). O histograma (à direita) demonstra o *burst* oxidativo desta população selecionada. Pode-se perceber uma menor ativação das células pulmonares.

Figura 4. Citograma demonstrando as populações de macrófagos e neutrófilos (círculo vermelho) na representação do *burst* oxidativo do lavado broncoalveolar de animal do grupo ALI (lesão), utilizando-se como estímulo DCFH+PMA. O histograma demonstra que a intensidade do *burst* oxidativo localizou-se entre 10^2 e 10^3 , demonstrando maior liberação de radicais livres

Figura 5. Citograma demonstrando as populações de macrófagos e neutrófilos (vermelho) na representação do *burst* oxidativo do lavado broncoalveolar de animal do grupo Sham (controle), utilizando-se como estímulo DCFH+PMA. O histograma demonstra que a intensidade do *burst* localizou-se em 10^2 , demonstrando menor liberação de radicais livres quando comparado ao exemplo anterior do grupo ALI

5.5.2 Citocinas do lavado broncoalveolar

A análise das citocinas do lavado broncoalveolar foi realizada em um total de 5 animais por grupo, escolhidos de forma aleatória. Os valores obtidos em absorbância (densidade óptica) foram transformados para pg/ml por meio de uma curva de regressão não-linear, utilizando-se a curva padrão (densidade óptica) e o valor correspondente da concentração.

Na tabela 16 abaixo encontram-se descritos os valores em pg/ml das citocinas e quimiocinas avaliadas no lavado broncoalveolar dos animais estudados.

Nos gráficos a seguir encontram-se representados os valores médios obtidos em pg/ml da análise das citocinas e quimiocinas do lavado broncoalveolar dos animais estudados.

Tabela 16 - Valores em pg/ml das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 do lavado broncoalveolar dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ desvio padrão)

Citocina	Grupo	Média $\pm$ Desvio-Padrão
TNF- α (pg/ml)	SHAM	15 $\pm$ 7
	HS	27,8 $\pm$ 13
	ALI	37 $\pm$ 12##
	ALI+HS	25,2 $\pm$ 5,7
IL-1 β (pg/ml)	SHAM	28,13 $\pm$ 12
	HS	26,78 $\pm$ 17
	ALI	38,44 $\pm$ 16,4
	ALI+HS	54,27 $\pm$ 28,7
IL-6 (pg/ml)	SHAM	40,34 $\pm$ 7,9
	HS	54,3 $\pm$ 21,3
	ALI	133,8 $\pm$ 83
	ALI+HS	1233 $\pm$ 119#+
IL-10 (pg/ml)	SHAM	60 $\pm$ 30
	HS	99 $\pm$ 48
	ALI	113,5 $\pm$ 28
	ALI+HS	29,3 $\pm$ 11,2+ π
IL-8 (pg/ml)	SHAM	153 $\pm$ 54
	HS	122 $\pm$ 34,9
	ALI	239,3 $\pm$ 171
	ALI+HS	183,2 $\pm$ 100

TNF, fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucina; #: P<0,05 vs. Sham; ##: P<0,01 vs. Sham; +: P<0,05 vs. HS; π : P<0,001 vs. ALI.

Gráfico 11. Valores de TNF- α e IL-1 β (valores médios e desvio padrão) analisados no lavado broncoalveolar dos animais estudados dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

##: $P < 0,01$ vs. Sham

Gráfico 12. Valores de IL-6 (valores médios e desvio padrão) analisados no lavado broncoalveolar dos animais estudados dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS). Pode-se ver melhor os valores de Sham, HS e ALI no detalhe.

#: $P < 0,05$ vs. Sham; +: $P < 0,05$ vs. HS

Gráfico 13. Valores de IL-8 (valores médios e desvio padrão) analisados no lavado broncoalveolar dos animais estudados dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

Gráfico 14. Valores de IL-10 (valores médios e desvio padrão) analisados no lavado broncoalveolar dos animais estudados dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS).

+ : $P < 0,05$ vs. HS; π : $P < 0,001$ vs. ALI

Com relação às citocinas inflamatórias coletadas no lavado broncoalveolar, pode-se observar um aumento significativo na produção de $\text{TNF-}\alpha$ no grupo ALI, em comparação com o grupo Sham. Já a $\text{IL-1}\beta$ apresenta-se ligeiramente elevada nos grupos ALI e ALI+HS, porém não houve diferença estatística entre grupos. Na mensuração da IL-8, apesar do grupo ALI apresentar valores mais elevados, seguido pelo grupo ALI+HS, que apresentou discreto aumento em comparação com os

demais grupos, não houve diferença estatística entre grupos. A IL-6, no entanto, apresentou-se aumentada no grupo ALI, porém seu aumento foi mais expressivo no grupo ALI+HS, havendo diferença estatística entre esse grupo e os grupos Sham e HS.

A expressão da citocina antiinflamatória IL-10 mostrou-se inferior no grupo ALI+HS, apresentando diferença estatística em relação aos grupos HS e ALI.

5.5.3 Citocinas séricas

Na tabela 17 encontram-se descritos os valores em pg/ml de TNF- α sérico dos animais estudados.

Tabela 17 - Análise quantitativa de TNF- α (fator de necrose tumoral α) no soro dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ desvio padrão)

	Grupo	Tempos			
		TB	T90	T150	T270
TNF- α (pg/ml)	Sham	17,8 $\pm$ 4	19 $\pm$ 11	30 $\pm$ 12	24,6 $\pm$ 8
	HS	32,2 $\pm$ 14	27,8 $\pm$ 11	16,3 $\pm$ 13	23,3 $\pm$ 17
	ALI	28,7 $\pm$ 10	23,4 $\pm$ 10	23 $\pm$ 7,8	30,7 $\pm$ 8,7
	ALI+HS	24,3 $\pm$ 6,7	34 $\pm$ 16,1	35 $\pm$ 27	21,1 $\pm$ 14

Os resultados obtidos demonstram que os níveis plasmáticos de TNF- α não apresentaram diferença estatística entre grupos e tempos em nenhum dos momentos avaliados. Não foram mensurados os níveis plasmáticos de TNF- α nos momentos T30 e T210, sendo a última mensuração realizada em T270.

5.6 Análise histopatológica

Na tabela 18 encontram-se descritos os escores dos parâmetros avaliados nas lâminas de tecido pulmonar dos animais estudados.

Tabela 18 - Escores avaliados na análise histológica das amostras coletadas dos animais dos grupos controle (Sham e HS), lesão (ALI) e lesão e tratamento (ALI+HS) (média $\pm$ erro padrão)

	Grupo	Média $\pm$ Desvio Padrão	Anova	Múltiplas comparações Tukey
Edema	SHAM	0,6 $\pm$ 0,9	P<0,0001	Sham X ALI p<0,001
	HS	1,1 $\pm$ 1,3		Sham X ALI-HS p<0,001
	ALI	7,0 $\pm$ 1,4		HS X ALI p<0,001
	ALI+HS	6,5 $\pm$ 2,6		HS X ALI-HS p<0,001
Infiltrado Polimorfonuclear	SHAM	3,4 $\pm$ 2,1	P<0,0001	Sham X ALI p<0,01
	HS	2,4 $\pm$ 1,6		Sham X ALI-HS p<0,05
	ALI	8,8 $\pm$ 1,6		HS X ALI p<0,001
	ALI+HS	7,7 $\pm$ 2,7		HS X ALI-HS p<0,01
Infiltrado Mononuclear	SHAM	5,2 $\pm$ 2,4	P=0,1113	NS
	HS	3,3 $\pm$ 1,9		
	ALI	6,0 $\pm$ 1,8		
	ALI+HS	5,5 $\pm$ 1,7		
Hemorragia	SHAM	1,6 $\pm$ 1,3	P<0,001	Sham X ALI p<0,001
	HS	1,6 $\pm$ 1,1		Sham X ALI-HS p<0,01
	ALI	6,5 $\pm$ 2,2		HS X ALI p<0,001
	ALI+HS	5,7 $\pm$ 1,9		HS X ALI-HS p<0,01

O exame microscópico dos grupos Sham e HS demonstrou parênquima pulmonar contendo bronquíolos e alvéolos com arquitetura típica, como pode-se observar na figura 6 A e B. Não foram evidenciados edema, congestão ou colapso importante nos lobos estudados, apenas infiltrado mononuclear leve a moderado em alguns campos avaliados.

Pudemos observar nos grupos ALI e ALI+HS, submetidos a lesão pulmonar aguda, presença generalizada de edema e áreas de hemorragia nas lâminas analisadas, porém, sem diferença estatística entre os grupos lesão e lesão – tratamento (Figura 7 A e B). Em relação ao infiltrado inflamatório, além da presença de infiltrado mononuclear, os grupos submetidos a lesão por HCl apresentaram grandes quantidades de células polimorfonucleares. Foram observadas ainda áreas

heterogêneas de colapso e ruptura alveolar nestes dois grupos, demonstrando importante lesão pulmonar de caráter heterogêneo das áreas sob ação do HCl.

Figura 6 A. Corte histológico da região intermediária (Zona West II) do lobo pulmonar dorsal direito de animal do grupo Sham (x20). Pode-se observar arquitetura alveolar preservada e discreta presença de células monocíticas.

Figura 6 B. Corte histológico da região intermediária (Zona West II) do lobo pulmonar dorsal direito de animal do grupo HS (x20). Pode-se observar arquitetura alveolar preservada e moderada presença de células monocíticas, principalmente ao redor do bronquíolo.

Figura 7 A. Corte histológico da região intermediária (Zona West II) do lobo pulmonar dorsal direito de animal do grupo ALI (x20). Pode-se observar destruição da arquitetura alveolar, edema, fibrina, hemorragia e infiltrado de células polimorfonucleares.

Figura 7 B. Corte histológico da região intermediária (Zona West II) do lobo pulmonar dorsal direito de animal do grupo ALI+HS (x20). Pode-se observar destruição da arquitetura alveolar, edema, fibrina, alguns pontos de hemorragia e infiltrado de células polimorfonucleares.

O painel abaixo (Figura 8) faz um comparativo entre os cortes histológicos das áreas pulmonares avaliadas, dentro dos grupos determinados. Nota-se que as regiões apicais (AE) mantiveram-se preservadas, inclusive nos grupos onde houve instilação de HCl (ALI e ALI+HS). Nesta região pulmonar, os alvéolos apresentam sua arquitetura típica e não há presença de infiltrado inflamatório ou edema. No entanto, as áreas pertencentes ao lobo pulmonar médio direito (MD) e aos lobos diafragmático direito e esquerdo, apresentam infiltrado de células polimorfonucleares, edema e perda da arquitetura alveolar típica.

Figura 8. Cortes histológicos da região intermediária (Zona West II) dos lobos pulmonares avaliados em cada grupo. AE: apical esquerdo; MD: médio direito; DD: dorsal direito; DE: dorsal esquerdo

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo demonstram alterações fisiológicas e histopatológicas consistentes a um processo de lesão pulmonar aguda em suínos, corroborando com trabalhos recentes que relatam que, um modelo de lesão pulmonar aguda apropriado deve evidenciar a resposta inflamatória pulmonar, aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar alveolar e recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar. Todas essas alterações devem ser acompanhadas por hipoxemia aguda e queda da complacência pulmonar (25, 26).

Existem diferentes modelos de lesão pulmonar aguda citados em literatura, que podem atuar tanto de forma direta como indireta. Recentemente, a American Thoracic Society, por meio de um comitê, publicou um guia dos principais fatores que deveriam ser considerados em qualquer modelo de lesão pulmonar aguda (31). Para tanto, propôs uma relação de quatro fatores primordiais que devem ser obtidos, tais como evidência histológica de lesão tecidual, alterações na barreira alvéolo-capilar, presença de resposta inflamatória e evidência de disfunção fisiológica. Composto estes itens principais, outros fatores, tais como acúmulo de neutrófilos no espaço alveolar, aumento na presença de água extra-vascular pulmonar, presença de hipoxemia e áreas de atelectasia foram classificados como “muito relevantes” ou somente “relevantes”. O comitê enfatiza que nem sempre todas as mensurações consideradas “muito relevantes” poderão ser obtidas dentro de um mesmo modelo, tendo este guia como objetivo facilitar os pesquisadores a levar em consideração os aspectos únicos de cada modelo experimental, escolhendo os parâmetros que melhor se adequem ao modelo escolhido. O presente estudo, portanto, apresentou-se composto dos quatro fatores primordiais supracitados, uma vez que foram demonstradas evidências histológicas de lesão tecidual, alterações na barreira alvéolo-capilar, disfunção fisiológica e sinais de inflamação.

A aspiração de conteúdo gástrico é a segunda maior causa de lesões pulmonares agudas diretas (80), correspondendo a aproximadamente 10% de todos os casos de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (81), fato que

suscitou o interesse pelo presente estudo. A aspiração pode levar ao desenvolvimento de algumas síndromes pulmonares, dependente do tipo, quantidade e material inalado, sendo que a inalação de conteúdo gástrico não contaminado pode ser classificada como pneumonite por aspiração (82). Além de fator de risco para o desenvolvimento de SDRA (83), a aspiração acaba sendo um grande fator de exclusão para transplante em possíveis doadores com morte cerebral, sendo que, de todos os pulmões rejeitados para transplante, aproximadamente 14% deve-se a aspiração de conteúdo gástrico (84).

O pulmão é o órgão com menores taxas de transplante, variando entre 15 % a 25 % (85), sendo o principal motivo a lista numerosa de pré-requisitos exigidos para que o enxerto seja implantado, o que reduz ainda mais o já escasso número de doadores. Uma vez que a aspiração gástrica é um fator que poderia contra-indicar o transplante deste órgão (86), o modelo de aspiração gástrica toma importância no estudo de métodos de otimização da função pulmonar de um potencial doador e se implantar critérios menos restritivos (84).

O tratamento da pneumonite após aspiração ainda não está totalmente definido, sendo que a terapia de suporte ventilatório é utilizada para minimizar os danos ocasionados pelo contato do ácido com os brônquios e alvéolos, e otimizar a função pulmonar, uma vez que a ruptura da barreira alvéolo-capilar promove edema alveolar, infiltração de células e liberação de mediadores inflamatórios (82).

Embora o modelo de instilação de HCl tente mimetizar a aspiração de conteúdo gástrico, existem algumas diferenças importantes entre estas duas situações, dentre elas, o fato do conteúdo gástrico ser composto por uma suspensão de particulados e pH geralmente acima de 1,5, e não somente conteúdo líquido. Apesar do estudo de Kennedy e colaboradores (46) relatar que a gravidade da lesão pulmonar depende do pH da solução utilizada, sendo esta lesão mais grave com o uso de soluções mais ácidas, Raghavendran e colaboradores (87) demonstraram, em um estudo com camundongos, que a instilação isolada de ácido clorídrico não foi capaz de produzir lesões tão intensas quanto a instilação de uma associação de HCl com substâncias particuladas, baseando-se nos níveis de albumina, leucócitos e citocinas encontradas no lavado broncoalveolar.

No entanto, estudo mais recente de um grupo europeu demonstra que o suco gástrico coletado de pacientes na unidade de tratamento intensivo, mesmo tendo o pH ajustado posteriormente para 7.4, foi capaz de estimular células pulmonares *in vitro* para a produção de moléculas de adesão de neutrófilos e IL-8, concluindo que o conteúdo gástrico de doentes graves possui mediadores pró-inflamatórios que estimulam maior reação pulmonar, independente do pH ou presença de particulados (88).

A solução de HCl utilizada em nosso estudo apresentava pH entre 0,8 e 0,9, abaixo do utilizado na maioria dos trabalhos recentes com HCl, nos quais os valores de pH encontram-se ao redor de 1,4 (32, 41, 42, 89, 90). Inicialmente, o baixo valor de pH escolhido teve como intuito garantir o desenvolvimento de uma lesão pulmonar grave, pois acreditávamos que quanto mais baixo o pH maior seria o grau de lesão. No entanto, da mesma forma como os trabalhos citados anteriormente, não haviam substâncias particuladas em nossa solução, o que pode ter diminuído o impacto desta solução frente ao sistema inflamatório.

O volume de 4ml/kg de HCl administrado foi escolhido tomando-se como base estudos prévios que utilizaram este mesmo valor (32, 34, 84). No entanto, outras doses podem ser encontradas, variando de 1 a 5 ml/kg, dependendo do modelo experimental utilizado (26, 88, 91).

No estudo apresentado, optou-se por estudar os possíveis efeitos antiinflamatórios da solução salina hipertônica sobre a resposta pulmonar no modelo proposto. Devido a suas conhecidas propriedades hemodinâmicas, a solução salina hipertônica foi amplamente estudada como solução de reposição volêmica. No entanto, alguns trabalhos passaram a demonstrar seu potencial efeito na modulação da resposta inflamatória, principalmente sobre os neutrófilos (68, 92). Hoje sabe-se que a solução hipertônica pode controlar a ativação de células polimorfonucleares por meio de um mecanismo autócrino, que envolve a liberação de ATP e a ativação de receptores de adenosina denominados de A2a e A3 nas células polimorfonucleares. Estes receptores, no entanto, agem de forma antagônica. Enquanto o receptor A2a bloqueia a ação das células polimorfonucleares, o receptor A3 estimula a resposta celular (93).

Os efeitos da solução hipertônica sobre o sistema imune, portanto, podem depender do momento no qual ela é utilizada. A disponibilidade e a distribuição relativa dos receptores de adenosina A2a e A3 na superfície celular é o fator chave que determina quando o tratamento com solução salina hipertônica irá suprimir ou estimular as respostas das células polimorfonucleares (93). De acordo com alguns trabalhos (14, 74, 93), o efeito supressor sobre os neutrófilos somente é verificado quando a hipertônica é utilizada precocemente após a injúria. Quando já existe ativação das células polimorfonucleares seus efeitos podem tanto ser insignificantes, como também podem estimular a ação dos PMN, através da maior ativação dos receptores A3, exacerbando a reação inflamatória no tecido afetado. No entanto, ainda não se sabe ao certo qual o melhor momento para sua utilização, dificultando seu uso clínico quando se visa somente seus efeitos antiinflamatórios (93).

O momento escolhido para administração da solução salina hipertônica em nosso estudo foi de 15 minutos após a instilação de HCl. O trabalho de Oliveira-Junior e colaboradores (94) demonstrou a efetividade do uso profilático de pentoxifilina, também inibidor da cAMP, em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda por instilação de HCl em ratos, melhorando a oxigenação dos animais e diminuindo as concentrações de TNF- α do lavado broncoalveolar. Porém, quando utilizada 30 minutos após a lesão, esta solução apresentou-se relativamente inefetiva. Em um modelo de lesão pulmonar semelhante ao empregado em nosso estudo, porém utilizando ratos, Rabinovici e colaboradores (22) administraram a solução salina hipertônica na dose de 5 ml/kg pela via intravenosa, 20 minutos após a lesão pulmonar com HCl, obtendo como resposta redução de edema pulmonar.

Efeitos no Sistema Respiratório

Trabalhos similares (84, 88, 90) descrevem aumento significativo das pressões de pico e plateau após inalação de conteúdo gástrico, mesmo resultado obtido neste estudo, onde ambos os grupos lesão pulmonar aguda (ALI e ALI+HS) apresentaram aumento das pressões respiratórias após aspiração do HCl, diferindo significativamente dos grupos controle (Sham e HS). O mesmo ocorreu com a

complacência pulmonar, onde os grupos afetados pelo HCl demonstraram valores significativamente menores quando comparados aos grupos controle. Porém, em ambos os casos, não houve qualquer diferença estatística entre o grupo tratado com solução salina hipertônica (ALI+HS) e o não tratado (ALI). Matute-Bello e colaboradores (41) citam o aumento da pressão de pico e da resistência em vias aéreas, queda na complacência e queda da capacidade residual funcional como principais alterações na fisiologia respiratória neste modelo de lesão pulmonar aguda. Uma vez que a lesão provocada pela instilação de HCl é capaz de ocasionar grandes repercussões pulmonares decorrentes da destruição da barreira alvéolo-capilar, considerou-se que a ausência de resposta do grupo ALI+HS no que diz respeito aos parâmetros ventilatórios deveu-se à gravidade da lesão.

A pressão inspiratória foi ajustada logo após instauração da lesão pulmonar aguda, para que o volume corrente fosse mantido em aproximadamente 8 ml/kg. Desta forma, não obtivemos alterações significativas no volume corrente no decorrer do experimento, em nenhum grupo, de forma similar ao descrito no trabalho de Varelmann e colaboradores, onde ajustes na pressão de vias aéreas e frequência respiratória tiveram que ser realizados para manutenção do volume minuto (90).

Com relação aos parâmetros de oxigenação, apesar de alguns trabalhos citarem apenas uma discreta redução da pressão arteriolar de oxigênio (PaO_2) neste modelo de lesão pulmonar (32, 45, 95), verificamos uma queda de aproximadamente 50% da PaO_2 nos grupos ALI e ALI+HS logo após a administração de HCl. Estes valores mantiveram-se abaixo dos valores basais e diferiram significativamente dos grupos controles (Sham e HS) durante todo o período de observação. No entanto, verificou-se uma tentativa de recuperação destes valores em ambos os grupos onde houve lesão pulmonar aguda, porém não houve diferença entre o grupo que recebeu solução salina hipertônica e o que não recebeu.

Diversos trabalhos demonstram resultados semelhantes ao nosso, onde a queda acentuada da relação PaO_2/FiO_2 ocorreu na primeira hora de observação após aspiração de HCl (84, 88, 89, 91), levando os valores de PaO_2/FiO_2 a situarem-se entre 200 e 300 mm Hg. Em nosso estudo, a maior queda deu-se em T30, ou seja, 30 minutos após a instilação de HCl. A média dos animais dos grupos ALI e ALI+HS

também apresentou valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 200 e 300 mm Hg. Somente dois animais do grupo ALI e um animal do grupo ALI+HS apresentaram valores abaixo de 200 mm Hg em T30.

De acordo com a recente definição de Berlin (96), publicada com o objetivo de tornar os critérios diagnósticos mais simples e evitar que quadros mais brandos da afecção passassem despercebidos, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) passou a ser classificada como leve ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ mm Hg), moderada ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mm Hg) ou severa ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mm Hg), retirando o termo lesão pulmonar aguda (LPA). Podemos, desta forma, concluir que a maioria dos animais estudados neste trabalho apresentou quadro de SDRA leve. No entanto, esta classificação deve ser cuidadosamente interpretada, uma vez que a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ pode variar dependendo dos critérios de ventilação, PEEP e FiO_2 empregados (97).

Assim como nos estudos citados anteriormente (84, 88, 89, 91), após acentuada queda inicial os valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ mantiveram-se estáveis durante o período de observação. Em nosso estudo, estes valores apresentaram um aumento progressivo ao longo do tempo de observação, refletindo a melhora da oxigenação e corroborando com o aumento da PaO_2 , uma vez que a FiO_2 não foi modificada durante o estudo. No entanto, sabe-se que a relação entre a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e a FiO_2 não é linear e depende de diversos outros fatores, como método de ventilação empregado (83), débito cardíaco, fração de shunt pulmonar e diferença artério-venosa do conteúdo de oxigênio (98).

Outro trabalho cita situação semelhante, uma vez que os valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ do grupo com lesão pulmonar aguda por HCl apresentaram-se próximos aos valores basais após 240 minutos de observação (89). No entanto, apesar da recuperação progressiva da $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, a avaliação realizada por tomografia computadorizada neste estudo demonstrou opacificação progressiva e aumento das áreas pouco ventiladas durante os 240 minutos do estudo, principalmente nas regiões pulmonares diafragmáticas dorsais. Resultados semelhantes a estes também foram observados em outro estudo, demonstrando recuperação da oxigenação em ratos após lesão por HCl, apesar do exame tomográfico ainda apresentar áreas pulmonares densas e com sinais de fibrose duas semanas após lesão pulmonar (45).

A hipótese sugerida para tais fatos seria que, em um primeiro momento, a destruição local desencadeada pelo HCl poderia promover, além da ruptura da membrana alvéolo-capilar, oclusão do leito vascular pulmonar pela formação de trombos intravasculares e aumento do espaço morto, resultando na queda da PaO_2 e aumento do dióxido de carbono arterial (83), assim como mostram os resultados deste estudo, uma vez que a PaO_2 reduziu e a pressão arteriolar de dióxido de carbono (PaCO_2) apresentou-se aumentada nos grupos ALI e ALI+HS logo após a administração do HCl, diferindo estatisticamente dos grupos controle. Entretanto, o suíno possui uma grande capacidade de disparar o mecanismo de vasoconstrição pulmonar hipóxica (VPH), que possui o intuito de desviar a perfusão sanguínea das áreas pulmonares pouco ventiladas, tentando otimizar a relação ventilação / perfusão (99). Como o maior fator determinante da VPH é a hipóxia (100), acreditamos que a queda na PaO_2 tenha estimulado o desencadeamento deste mecanismo, o que auxiliou a retomada progressiva da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ao longo do período de estudo. No entanto, o uso de anestésicos inalatórios pode reduzir este mecanismo de contração dos vasos pulmonares (101).

Neste estudo, o equipamento de tomografia por impedância elétrica (TIE) foi utilizado para observação da dispersão do HCl durante sua instilação, sendo evidenciado um imediato colapso pulmonar, principalmente das regiões dorsais. Com o ajuste ventilatório da pressão, pode-se verificar, por meio das imagens obtidas, uma melhora na distribuição do fluxo ventilatório pulmonar, havendo pouca hiperdistensão das áreas pulmonares ventrais. A TIE é uma técnica altamente promissora para monitoração ventilatória a beira do leito, permitindo que a função pulmonar dos pacientes críticos seja otimizada, reduzindo os riscos de traumas associados à ventilação mecânica, sendo que uma de suas maiores vantagens é permitir o monitoramento pulmonar constante do paciente (83).

Efeitos Hemodinâmicos

Com relação ao estudo das variáveis hemodinâmicas deste trabalho, pode-se perceber alterações que refletem um quadro de hipertensão pulmonar, logo após

instauração da lesão pulmonar aguda. Este quadro é descrito como característico do modelo de lesão pulmonar aguda por HCl (95), corroborando como achados clínicos em pacientes com SDRA, que mostram uma incidência de hipertensão pulmonar e falência do miocárdio direito em aproximadamente 25% dos pacientes (102).

Decorrente deste quadro de hipertensão pulmonar, os grupos ALI e ALI+HS mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos controles, apresentando aumento do índice de resistência vascular pulmonar, índice de trabalho sistólico do ventrículo direito e pressões sistólica, média e diastólica da artéria pulmonar. Resultado semelhante foi obtido em estudo com porco, onde obteve-se aumentos da pressão média da artéria pulmonar e da fração de ejeção do ventrículo direito (89). Estudos realizados por Rosenthal e colaboradores (1998) em suínos, e Folkesson e colaboradores (1995) em coelhos, relatam que a instilação de HCl promove aumento na pressão de artéria pulmonar (6, 34) e aumento da resistência vascular pulmonar (34). No entanto, nestes trabalhos, não foi mensurado o índice de trabalho sistólico.

Após administração da solução hipertônica, pode-se verificar o aumento da pressão média da artéria pulmonar também no grupo HS, em comparação aos valores basais deste mesmo grupo. Porém, não houve diferença estatística quando comparou-se o grupo HS com o grupo Sham. Um estudo realizado com o uso da solução salina hipertônica associado ao dextran demonstrou aumento da magnitude da vasoconstrição pulmonar hipóxica em suínos jovens (103). Portanto, associamos o aumento dos valores de pressão de artéria pulmonar no grupo HS ao uso da solução salina hipertônica.

Com relação ao índice cardíaco, podemos observar que o grupo ALI+HS apresentou aumento ao longo do tempo em relação aos seus valores basais após T30. O mesmo comportamento foi demonstrado pelo grupo HS após administração de salina hipertônica (T90), diferindo significativamente de Sham neste momento. Ambos grupos mantiveram seus valores elevados até o término do experimento, porém não houve diferença estatística entre grupos. Também creditamos este aumento à administração de solução salina hipertônica, uma vez que o grupo ALI não demonstrou elevação do índice cardíaco.

As demais variáveis hemodinâmicas estudadas, como a frequência cardíaca, o débito cardíaco, o índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo e as pressões arteriais sistêmicas apresentaram comportamento similar, elevando-se em relação aos seus respectivos valores basais ao longo do período de observação em todos os grupos. No entanto, não houve diferenças entre os grupos. Trabalho realizado por Heuer e colaboradores (89) também relata não ter observado aumento de débito cardíaco ou pressão arterial sistêmica dos animais submetidos a lesão pulmonar por HCl.

A estabilidade hemodinâmica deste modelo experimental de lesão pulmonar aguda é enfatizada em trabalhos anteriores realizados em porcos (32, 34, 89). Entretanto, estudos envolvendo animais de pequeno porte, como ratos e coelhos, demonstram que esses animais parecem ser mais sensíveis à lesão provocada pelo HCl, uma vez que um trabalho envolvendo coelhos e lesão pulmonar por aspiração de suco gástrico relata morte de 50% dos animais estudados durante o período de observação de 6 horas do estudo, por choque hemodinâmico (88). Pawlik e colaboradores (95) relatam diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca de ratos mecanicamente ventilados em um modelo de lesão pulmonar aguda por aspiração de HCl. Já Schreiber e colaboradores (104) observaram queda da frequência cardíaca dos ratos mecanicamente ventilados submetidos a lesão pulmonar por HCl.

Alguns autores sugerem a liberação de mediadores inflamatórios como fator responsável pela queda da pressão arterial sistêmica nos animais estudados (91). Em nosso trabalho, assim como o apresentado por alguns autores em modelo experimental com suínos, os animais estudados não apresentaram alterações na pressão arterial e na resistência vascular sistêmica (34, 89). O grupo de estudo “CT Scan ARDS Study Group” sugere a hipoxemia, hipertensão pulmonar e acidemia como possíveis causas de falência circulatória nos pacientes com SDRA (105).

Resposta inflamatória e avaliação histológica

O aumento da permeabilidade das células pulmonares após a lesão pulmonar aguda causada pelo HCl é o fator responsável pelo desenvolvimento das alterações posteriormente encontradas (49). Diversos trabalhos apontam a infiltração de neutrófilos para o tecido pulmonar como fator primordial do desenvolvimento da pneumonite por aspiração de ácido clorídrico (26, 48, 106).

A infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar após lesão pulmonar aguda por aspiração de ácido apresenta um pico inicial de aproximadamente 3 a 4 horas após a lesão, de acordo com estudos realizados neste modelo de lesão pulmonar em ratos, por Kennedy e colaboradores, em 1989 (46). O estudo de Amigoni e colaboradores (45), também realizado em ratos, observou aumento da infiltração de neutrófilos em 6 horas após a lesão, persistindo por mais 6 horas, reduzindo somente decorridas 24 horas após a lesão. O estudo recente de um grupo Belga já observou aumento na quantidade de células totais e neutrófilos no lavado broncoalveolar de suínos submetidos a lesão pulmonar aguda por aspiração de suco gástrico 120 minutos após a lesão (84).

Neste estudo, o lavado broncoalveolar para contagem celular, mensuração do *burst* oxidativo e das citocinas foi coletado 270 minutos (4 1/2 horas) após a instilação de HCl. Pudemos observar que, quando avaliou-se o *burst* oxidativo do lavado broncoalveolar com o estímulo PMA, houve aumento significativo da atividade de neutrófilos e macrófagos dos animais de ambos grupos submetidos à lesão pulmonar aguda, apresentando diferença estatística quando estes foram comparados aos grupos controle. Houve também maior presença de neutrófilos no lavado broncoalveolar dos animais submetidos à aspiração de HCl, havendo diferença estatística entre o grupo ALI e os grupos Sham e HS. Apesar do grupo ALI+HS ter apresentado menores quantidades de neutrófilos no lavado broncoalveolar do que o grupo ALI, não houve diferença estatística entre estes grupos. Podemos correlacionar nossos resultados à outros dois trabalhos em modelos experimentais, que demonstram aumento da contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar de coelhos após aspiração de conteúdo gástrico de pacientes internados em unidade de terapia intensiva (88) e após lesão pulmonar aguda com aspiração de suco gástrico em suínos (84, 107).

Com relação às citocinas avaliadas no lavado broncoalveolar, houve aumento significativo das concentrações de TNF- α no grupo ALI, quando comparado ao grupo Sham. As concentrações de IL-1 β nos grupos ALI e ALI+HS também apresentaram-se ligeiramente mais elevadas do que as encontradas nos grupos controle, porém não houve diferença estatística entre grupos. Estes resultados corroboram com outros estudos (44, 108) que citam que IL-1 β e TNF- α podem ser encontrados no lavado broncoalveolar de pacientes com risco elevado para desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). No entanto, Martin e Matute-Bello (25) citam que o TNF- α não é encontrado de forma abundante no lavado broncoalveolar de pacientes com lesão pulmonar aguda, pois sugerem que sua atividade, que normalmente induz a morte celular, seja exercida no tecido pulmonar propriamente dito.

Em nosso estudo, apesar do aumento significativo do TNF- α no grupo ALI em relação ao Sham, número não foi expressivo em sua contagem absoluta, em concordância com o estudo de Martin e Matute-Belo (25). Estudo realizado com aspiração de suco gástrico em coelhos só demonstrou presença de TNF- α no lavado broncoalveolar de 2 dos 15 animais estudados (88). Entretanto, é relatado que estas citocinas possuem ação fugaz e vida útil curta, sendo liberadas entre 30 a 90 minutos após estímulo (50), podendo já se encontrar em declínio no momento em que realizou-se a coleta do lavado broncoalveolar (109).

A síntese de IL-6 é estimulada principalmente pelas citocinas IL-1 β e TNF- α , sendo esta citocina considerada um rápido marcador da resposta inflamatória (26). Houve aumento significativo da expressão de IL-6 no lavado broncoalveolar do grupo ALI+HS, quando comparado aos grupos Sham e HS. O grupo ALI também apresentou valores mais elevados de IL-6 do que os grupos controles, porém sem diferença estatística. As altas concentrações de IL-6 encontradas em nosso trabalho nos grupos ALI e ALI+HS refletem o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . No estudo de Park e colaboradores (44), os níveis alveolares de IL-6 de pacientes em risco para desenvolvimento da SDRA encontravam-se 50 vezes mais elevados do que dos controles. Trabalhos em ratos detectaram uma concentração cinco vezes maior de IL-6 no lavado broncoalveolar do pulmão que foi submetido a

lesão com ácido clorídrico (104), e um aumento 10 vezes maior no pulmão dos animais que foram submetidos ao modelo de embolismo pulmonar e expostos ao calor (110), quando comparados aos controles.

Ainda que seja considerada uma citocina pró-inflamatória, podendo ainda estimular o *burst* oxidativo de neutrófilos, o aumento da IL-6 também exerce efeito antiinflamatório, regulando a produção de TNF- α e IL-1 β (54), o que poderia estar correlacionado com o aumento pouco expressivo destas citocinas no momento da coleta.

A IL-8 é considerada um importante quimiotático para células polimorfonucleares (61), sendo considerada, juntamente com a IL-6, um preditor do grau de severidade para desenvolvimento da SDRA (50, 109). Neste trabalho, os níveis alveolares de IL-8 foram maiores nos grupos onde houve lesão por HCl. Porém, não houve diferença estatística entre grupos.

Corroborando com nosso resultado, estudos com lesão pulmonar aguda induzida por aspiração de suco gátrico demonstraram aumento na produção de IL-8 no tecido pulmonar de coelhos (88) e no lavado broncoalveolar de porcos (84). Altas concentrações alveolares desta quimiocina tem correlacionado positivamente com disfunção respiratória tanto em modelos experimentais de lesão pulmonar por ácido clorídrico quanto na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em humanos (61, 84, 88, 109, 111). No entanto, nos trabalhos anteriormente citados, os valores de IL-8 obtidos foram muito maiores do que os obtidos em nosso trabalho, sendo de 5.500 pg/ml no tecido pulmonar de coelhos, 6 horas após a lesão (88), e de 1.046 pg/ml no lavado broncoalveolar dos porcos, 2 horas após a lesão (84).

Estudo similar ao apresentado envolvendo suínos demonstrou aumentos de IL-6 e IL-8 no lavado broncoalveolar após lesão pulmonar por HCl, sendo que ambas citocinas atingiram valores médios de aproximadamente 360 pg/ml após 120 minutos, correspondente à 3,5 vezes os valores basais de IL-6 e quatro vezes os valores basais de IL-8 encontrados (107). Em nosso estudo, os valores médios de IL-6 foram de 134 pg/ml no grupo ALI e 1233 pg/ml no grupo ALI+HS, representando, respectivamente, um aumento de aproximadamente duas e 20 vezes os encontrados no grupo controle (Sham). Com relação à IL-8, encontramos valores médios de 240

no grupo ALI e 183 no grupo ALI+HS, o que representa um aumento aproximado de 1,5 vez os níveis basais.

Estudo recente de Raymonds e colaboradores (109) descreve que pacientes com concentração alveolar de IL-8 acima de 200 pg/ml logo após algum episódio de trauma poderiam apresentar maior risco de desenvolvimento de SDRA. As médias das concentrações de IL-8 obtidas nos grupos ALI e ALI+HS em nosso estudo ficaram próximas a estes valores.

Neste trabalho, pode-se observar uma relação entre as concentrações de IL-1 β , IL-6 e IL-8, assim como descrito em estudos prévios (107, 109), refletindo a ação pró-inflamatória relatada no início do desenvolvimento do processo de lesão pulmonar aguda. Um modelo experimental envolvendo lesão pulmonar aguda por ácido oleico em ratos também demonstrou níveis elevados de IL-6, TNF- α , IL-1 β e MIP-2 (equivalente à IL-8) no tecido pulmonar dos animais estudados (110). Isto pode ser explicado pelo efeito indutor da IL-1 β sobre a IL-6 e a IL-8.

A IL-10, única citocina antiinflamatória avaliada, é considerada um antagonista inespecífico, inibindo a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, entre outras. A presença da IL-10 no pulmão é responsável por limitar a intensidade da resposta inflamatória pulmonar, tanto na fase aguda como durante o curso da SDRA. Estudos sugerem que a produção de IL-10 nos casos de SDRA seja realizada pelos macrófagos pulmonares, uma vez que esta citocina é encontrada em níveis mais elevados no lavado broncoalveolar do que no plasma destes pacientes (44, 65).

Neste estudo, foram encontradas quantidades de IL-10 no grupo ALI+HS inferiores as encontradas nos demais grupos, havendo diferença estatística com relação aos grupos ALI e HS. No estudo de Park e colaboradores (44), a IL-10 foi encontrada em concentrações abaixo de 20 pg/ml no lavado broncoalveolar dos pacientes em risco para desenvolvimento de SDRA, não sendo detectada no lavado de indivíduos saudáveis.

O fato da coleta do lavado ter sido realizada ainda na fase inicial do processo inflamatório pode ter contribuído para este resultado, uma vez que é descrito em alguns trabalhos que a produção de IL-10 é estimulada após o aumento das concentrações de TNF- α e IL-6 serem detectadas e o pico de sua produção é cerca de

12 horas após o início do processo de lesão. Estes estudos sugerem uma relação próxima entre os níveis de TNF- α e IL-10 na fase inicial de desenvolvimento da SDRA, o que pode ser visualizado em nosso trabalho (44, 108, 109).

Em relação às concentrações de TNF- α plasmática, não houve alterações significativas durante o período estudado. Rosenthal e colaboradores (1998), em seu trabalho com suínos, também não observaram aumento de TNF- α plasmático em nenhum dos quatro diferentes modelos experimentais de lesão pulmonar aguda estudados, durante um período de observação de 165 minutos. Estes autores, porém, sugerem que o tempo de observação relativamente curto pode ter sido um fator limitante, uma vez que, o modelo de administração de endotoxinas, conhecido por estimular a produção de TNF- α pelos macrófagos pulmonares, também não apresentou aumento de TNF- α plasmático (34). No entanto, apesar de termos avaliado esta citocina ao longo do estudo, durante um período de observação de 270 minutos após administração de HCl, também não encontramos aumentos nos níveis plasmáticos de TNF- α , demonstrando que, como sugerido por Martin e Matute-Bello (25), sua atividade, neste modelo experimental, seja exercida no próprio tecido pulmonar.

As demais citocinas plasmáticas não foram mensuradas por ter-se considerado que, devido a natureza da lesão, os maiores aumentos na expressão de citocinas seriam localizados no lavado broncoalveolar. Um trabalho realizado em modelo de isquemia e reperfusão pulmonar em suínos, analisou os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , observando somente um discreto aumento nos níveis séricos de IL-6. Os níveis séricos de IL-1 β e IL-8 apresentaram-se abaixo da quantidade mínima detectável, e o TNF- α não demonstrou alterações após a isquemia-reperfusão (23). Entretanto, o estudo de aspiração de suco gástrico em coelhos foi capaz de demonstrar aumento da IL-8 plasmática nos animais estudados (88). Também obteve-se aumento de IL-6 e IL-8 no plasma de pacientes com elevado risco de desenvolvimento de SDRA (109). No entanto, apesar da concentração destas citocinas ter sido maior no lavado broncoalveolar do que no plasma, sugerindo uma origem pulmonar, todos os pacientes avaliados haviam sofrido algum tipo de trauma antes da mensuração das citocinas.

O único estudo encontrado na literatura que avalia os efeitos da solução salina hipertônica no modelo de aspiração de ácido clorídrico relata redução significativa do edema pulmonar em comparação com o grupo controle, sugerindo que a hipertônica tenha proporcionado a translocação de fluído do interstício pulmonar para o compartimento intravascular (22). Porém, este mesmo estudo não demonstra redução dos níveis plasmáticos de TNF- α .

Na avaliação *post-mortem* do tecido pulmonar, foram coletadas amostras para análise histológica das regiões intermediárias (Zonas de West II) de quatro lobos pulmonares, excluindo-se somente o lobo apical direito, uma vez que este havia sido utilizado para coleta do lavado broncoalveolar. Diferentemente de trabalhos envolvendo ratos (2, 45) e coelhos (88, 91), onde o pulmão pode ser coletado por inteiro e fixado, em nosso trabalho padronizamos a região intermediária de cada lobo pulmonar para coleta dos fragmentos, assim como citado em outros trabalhos com suínos (84, 89).

Varelmann e colaboradores (90) descrevem, na análise em tomografia computadorizada de suínos submetidos a lesão pulmonar aguda tanto com HCl quanto com ácido oleico, que a distribuição do tecido não aerado é dependente da força de gravidade, sendo observado nas regiões pulmonares dorsais. Estes pesquisadores citam ainda que este efeito é mais pronunciado na região juxtadiafragmática, sendo que as regiões pulmonares ventrais, independente do tipo de lesão, mantinham-se mais aeradas. Em nosso estudo, macroscopicamente, foram observadas áreas de hemorragia e consolidação envolvendo aproximadamente 60% do volume pulmonar nos grupos ALI e ALI+HS, principalmente nas regiões dorsais e diafragmáticas.

Na análise histológica dos animais dos grupos ALI e ALI+HS, pudemos observar presença de infiltrado celular inflamatório, edema e hemorragia de grau moderado a intenso, principalmente nos lobos dorsais, sendo que o direito, de maneira geral, encontrava-se com alterações mais pronunciadas do que o esquerdo. Os animais dos grupos Sham e HS apresentaram arquitetura pulmonar típica. No entanto, quando avaliou-se os lobos apicais dos animais dos grupos ALI e ALI+HS, estes apresentavam-se com poucas alterações, sendo que a área alveolar estava

preservada e não apresentavam edema ou infiltrado celular. Corroborando com nossos resultados, o estudo realizado em coelhos relata presença de áreas de hemorragia, necrose, infiltrado inflamatório e edema nos lobos pulmonares diafragmáticos e médio, sendo que os lobos craniais encontravam-se com sua arquitetura próxima ao normal (91).

Áreas de hemorragia, edema e infiltrado de neutrófilos são frequentemente encontradas na análise histopatológica da região média dos lobos pulmonares dorsais neste tipo de lesão pulmonar em suínos (32, 84), correlacionando com a imagem de consolidação alveolar encontrada nas regiões pulmonares dependentes em estudo tomográfico (84). Um outro estudo observou as mesmas alterações, além de espessamento do septo alveolar e trombose 240 minutos pós lesão (89).

Um estudo mais prolongado, realizado em ratos, relata que, 6 horas após lesão por HCl, as alterações inflamatórias ainda são moderadas e confinadas às áreas perinecroticas ao redor dos lobos diafragmáticos, sendo que, mais tardiamente (12 e 24 horas após instilação de HCl), a exudação alveolar e hemorragia progridem gradualmente em extensão e severidade, atingindo também os lobos médio e apicais (45), o que justifica a ausência de lesão nesses lobos no presente estudo.

Em nosso estudo, os demais órgãos não passaram por análise histológica. No entanto, um estudo recente relata presença de necrose celular e infiltrado de leucócitos nos tecidos cardíaco e renal de suínos submetidos a lesão pulmonar por HCl, sugerindo que este tipo de lesão encontrada seja ocasionada pela ativação sistêmica dos neutrófilos desencadeada pelo HCl (89), corroborando com os estudos que citam elevação dos níveis de IL-8 sistêmicos após lesão por HCL (88, 109). No entanto, deve-se considerar o quadro de hipóxia e hipertensão pulmonar ao qual os animais estudados são expostos durante este tipo de lesão.

Os resultados encontrados em nossa avaliação histopatológica corroboram com as demais alterações hemodinâmicas e ventilatórias desenvolvidas após a aspiração de HCl. Tanto o quadro de hipertensão pulmonar quanto a diminuição da complacência estão correlacionados com a formação de edema, hemorragia e consolidação pulmonar. As quantidades elevadas de IL-6 e IL-8 encontradas no lavado broncoalveolar também correlacionam positivamente com o desenvolvimento

de um quadro de lesão pulmonar aguda, assim como verificado em pacientes com SDRA (50, 109).

Embora a literatura cite, em modelos de lesão pulmonar diferentes ao empregado em nosso estudo, que a administração de solução hipertônica promove diminuição do infiltrado inflamatório e edema pulmonar (13, 20, 71), os resultados deste estudo não são capazes de comprovar tais efeitos, uma vez que não houve diferença significativa entre o grupo tratado com hipertônica e o não tratado. No entanto, ao observar-se os escores de lesão histopatológicos, pode-se perceber que o grupo ALI+HS demonstra menores escores de lesão do que o grupo ALI em todos os parâmetros avaliados. O mesmo ocorre com a contagem de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar, que foi ligeiramente menor no grupo ALI+HS. Porém, nenhum destes resultados mostrou-se estatisticamente significativo.

Um importante fator limitante de nosso estudo, no entanto, foi o fato da coleta do lavado broncoalveolar ter sido realizada somente no lobo pulmonar apical direito, subestimando a presença tanto de células inflamatórias quanto citocinas presentes no lavado, uma vez que os animais permaneceram em posição supina durante todo o experimento. A posição supina, além de favorecer o deslocamento do HCl administrado para as regiões pulmonares dorsais, contribui com maior colapso alveolar das regiões diafragmáticas nos casos de lesão pulmonar, prejudicando as trocas gasosas e demandando uso de pressões mais altas para impedir hipoxemia (112).

A análise histopatológica de nosso trabalho demonstra a presença de grandes áreas de edema, hemorragia e infiltrado celular localizada principalmente nos lobos diafragmáticos direito e esquerdo, e parte do lobo médio direito, sendo que os demais lobos apresentavam-se com aparência próxima do normal. Além disso, o fato da circulação pulmonar ser menos favorecida nas regiões apicais do pulmão (113) pode ter prejudicado o aporte de células inflamatórias no local, reforçando a idéia de que o lobo escolhido para coleta do lavado não representou de forma homogênea a condição pulmonar em que os animais se encontravam.

Quando animais de menor porte são utilizados para este tipo de procedimento, normalmente procede-se a lavagem pulmonar completa para coleta do

lavado broncoalveolar, o que permite a formação de uma amostra mais homogênea, como demonstrado em alguns trabalhos envolvendo ratos e coelhos (88, 104, 110). Dois estudos realizados em suínos citam a realização da coleta do lavado broncoalveolar no brônquio segmental dorsal direito (107) e no lobo médio direito e acessório esquerdo (84), diferentemente do realizado em nosso estudo. No entanto, apesar do trabalho de Meers e colaboradores (84) ter apresentado níveis de IL-8 muito mais elevados que os nossos, o trabalho de Inci e colaboradores (107) obteve valores de IL-6 e IL-8 próximos aos obtidos em nosso estudo.

Apesar destes fatos, pudemos demonstrar aumento das concentrações alveolares de citocinas inflamatórias no lavado broncoalveolar e aumento do *burst* oxidativo celular após estímulo com PMA dos animais submetidos a aspiração de HCl. Também encontramos neutrófilos em maiores quantidades no lavado broncoalveolar dos animais após a lesão pulmonar, corroborando com o relatado em outros estudos (108, 109). Com relação à solução salina hipertônica, a gravidade da lesão pulmonar inferida pelo baixo pH das soluções de HCl utilizadas neste estudo foi de tamanha magnitude que acreditamos que a dose de salina hipertônica empregada, que foi baseada no volume utilizado para efeitos hemodinâmicos, tenha sido pouco efetiva para que algum tipo de melhora na condição pulmonar destes animais fosse verificada.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A aspiração de 4 ml/kg de HCl demonstrou ser efetiva no desenvolvimento de um modelo de lesão pulmonar por pneumonite aspirativa, sendo capaz de promover danos à barreira alvéolo-capilar, estimulando a resposta inflamatória. Verificou-se ainda redução da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ em valores abaixo de 300 mm Hg, redução da complacência pulmonar estática, aumento das pressões de vias aéreas e hipertensão pulmonar, características compatíveis com um quadro de síndrome do desconforto respiratório agudo.

A análise das citocinas, em conjunto com os resultados obtidos com o *burst* oxidativo e a análise histopatológica do tecido pulmonar demonstraram que as técnicas empregadas para avaliação da resposta inflamatória pulmonar foram efetivas, apesar da presença moderada de citocinas e células polimorfonucleares no lavado broncoalveolar dos animais avaliados.

Por meio da avaliação dos resultados obtidos, pode-se inferir que o uso da solução salina hipertônica a 7,5% não apresentou efeitos benéficos neste modelo experimental de lesão pulmonar aguda.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Ng A, Smith G. Gastroesophageal reflux and aspiration of gastric contents in anesthetic practice. *Anesth Analg*. 2001 Aug;93(2):494-513.
2. Beck-Schimmer B, Rosenberger DS, Neff SB, Jamnicki M, Suter D, Fuhrer T, et al. Pulmonary aspiration: new therapeutic approaches in the experimental model. *Anesthesiology*. 2005 Sep;103(3):556-66.
3. Huang TK, Uyehara CF, Balaraman V, Miyasato CY, Person D, Egan E, et al. Surfactant lavage with lidocaine improves pulmonary function in piglets after HCl-induced acute lung injury. *Lung*. 2004;182(1):15-25.
4. Gattinoni L, Vagginelli F, Chiumello D, Taccone P, Carlesso E. Physiologic rationale for ventilator setting in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S300-4.
5. Azoulay E, Attalah H, Yang K, Herigault S, Jouault H, Brun-Buisson C, et al. Exacerbation with granulocyte colony-stimulating factor of prior acute lung injury during neutropenia recovery in rats. *Crit Care Med*. 2003 Jan;31(1):157-65.
6. Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):107-16.
7. Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, et al. Leukocytes mediate acid aspiration-induced multiorgan edema. *Surgery*. 1993 Jul;114(1):13-20.
8. Laffon M, Lu LN, Modelska K, Matthay MA, Pittet JF. alpha-adrenergic blockade restores normal fluid transport capacity of alveolar epithelium after hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1999 Oct;277(4 Pt 1):L760-8.
9. McAuley DF, Frank JA, Fang X, Matthay MA. Clinically relevant concentrations of beta2-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2004 Jul;32(7):1470-6.
10. Kudoh I, Miyazaki H, Ohara M, Fukushima J, Tazawa T, Yamada H. Activation of alveolar macrophages in acid-injured lung in rats: different effects of pentoxifylline on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production. *Crit Care Med*. 2001 Aug;29(8):1621-5.

11. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1450-6.
12. Nagase T, Ohga E, Sudo E, Katayama H, Uejima Y, Matsuse T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 mediates acid aspiration-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):504-10.
13. Pascual JL, Khwaja KA, Ferri LE, Giannias B, Evans DC, Razek T, et al. Hypertonic saline resuscitation attenuates neutrophil lung sequestration and transmigration by diminishing leukocyte-endothelial interactions in a two-hit model of hemorrhagic shock and infection. *J Trauma*. 2003 Jan;54(1):121-30; discussion 30-2.
14. Inoue Y, Chen Y, Pauzenberger R, Hirsh MI, Junger WG. Hypertonic saline up-regulates A3 adenosine receptor expression of activated neutrophils and increases acute lung injury after sepsis. *Crit Care Med*. 2008 Sep;36(9):2569-75.
15. Safdar Z, Wang P, Ichimura H, Issekutz AC, Quadri S, Bhattacharya J. Hyperosmolarity enhances the lung capillary barrier. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1541-9.
16. Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2003 Jul;20(1):29-34.
17. Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *J Trauma*. 1997 Apr;42(4):602-6; discussion 6-7.
18. Rizoli SB, Kapus A, Parodo J, Rotstein OD. Hypertonicity prevents lipopolysaccharide-stimulated CD11b/CD18 expression in human neutrophils in vitro: role for p38 inhibition. *J Trauma*. 1999 May;46(5):794-8; discussion 8-9.
19. Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 2000 Oct;87(10):1336-40.
20. Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline infusion for pulmonary injury due to ischemia-reperfusion. *Arch Surg*. 2003 Jan;138(1):9-14.
21. Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, Curtin WA, Laffey JG. Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury. *BMC Pulm Med*. 2008;8:9.

22. Rabinovici R, Vernick J, Hillegas L, Neville LF. Hypertonic saline treatment of acid aspiration-induced lung injury. *J Surg Res.* 1996 Jan;60(1):176-80.
23. Roch A, Castanier M, Mardelle V, Trouse D, Marin V, Avaro JP, et al. Effect of hypertonic saline pre-treatment on ischemia-reperfusion lung injury in pig. *J Heart Lung Transplant.* 2008 Sep;27(9):1023-30.
24. Orlic T, Loomis WH, Shreve A, Namiki S, Junger WG. Hypertonicity increases cAMP in PMN and blocks oxidative burst by PKA-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jun;282(6):C1261-9.
25. Martin TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. *Crit Care Clin.* 2011 Jul;27(3):735-52.
26. Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol.* 2012 Jan 25.
27. 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 Mar;149(3 Pt 1):818-24.
28. Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med.* 2004 Sep;30(9):1702-14.
29. Rocco PR, Zin WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? *Curr Opin Crit Care.* 2005 Feb;11(1):10-7.
30. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Apr;155(4):1187-205.
31. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 May;44(5):725-38.
32. Marumo CK, Otsuki DA, Fantoni DT, Margarido CB, Ambrosio AM, Pelosi P, et al. Hemodynamic effects of PEEP in a porcine model of HCl-induced mild acute lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009 Feb;53(2):190-202.
33. Roch A, Michelet P, Lambert D, Delliaux S, Saby C, Perrin G, et al. Accuracy of the double indicator method for measurement of extravascular lung water depends on the type of acute lung injury. *Crit Care Med.* 2004 Mar;32(3):811-7.

34. Rosenthal C, Caronia C, Quinn C, Lugo N, Sagy M. A comparison among animal models of acute lung injury. *Crit Care Med*. 1998 May;26(5):912-6.
35. Wort SJ, Evans TW. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull*. 1999;55(1):30-48.
36. Lee KH, Rico P, Billiar TR, Pinsky MR. Nitric oxide production after acute, unilateral hydrochloric acid-induced lung injury in a canine model. *Crit Care Med*. 1998 Dec;26(12):2042-7.
37. Safdar Z, Yiming M, Grunig G, Bhattacharya J. Inhibition of acid-induced lung injury by hyperosmolar sucrose in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Oct 15;172(8):1002-7.
38. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology*. 1998 May;88(5):1300-9.
39. Strohmaier W, Redl H, Schlag G. Studies of the potential role of a semisynthetic surfactant preparation in an experimental aspiration trauma in rabbits. *Exp Lung Res*. 1990 Mar-Apr;16(2):101-10.
40. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1685-93.
41. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379-99.
42. Wrigge H, Zinserling J, Muders T, Varelmann D, Gunther U, von der Groeben C, et al. Electrical impedance tomography compared with thoracic computed tomography during a slow inflation maneuver in experimental models of lung injury. *Crit Care Med*. 2008 Mar;36(3):903-9.
43. Richard JC, Pouzot C, Gros A, Tourevieille C, Lebars D, Lavenne F, et al. Electrical impedance tomography compared to positron emission tomography for the measurement of regional lung ventilation: an experimental study. *Crit Care*. 2009;13(3):R82.
44. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1896-903.
45. Amigoni M, Bellani G, Scanziani M, Masson S, Bertoli E, Radaelli E, et al. Lung injury and recovery in a murine model of unilateral acid aspiration: functional, biochemical, and morphologic characterization. *Anesthesiology*.

2008 Jun;108(6):1037-46.

46. Kennedy TP, Johnson KJ, Kunkel RG, Ward PA, Knight PR, Finch JS. Acute acid aspiration lung injury in the rat: biphasic pathogenesis. *Anesth Analg*. 1989 Jul;69(1):87-92.
47. Pelosi P, Caironi P, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary forms of acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;22(3):259-68.
48. Knight PR, Druskovich G, Tait AR, Johnson KJ. The role of neutrophils, oxidants, and proteases in the pathogenesis of acid pulmonary injury. *Anesthesiology*. 1992 Oct;77(4):772-8.
49. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:463-93.
50. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004 Feb;202(2):145-56.
51. Rhee P, Wang D, Ruff P, Austin B, DeBaux S, Wolcott K, et al. Human neutrophil activation and increased adhesion by various resuscitation fluids. *Crit Care Med*. 2000 Jan;28(1):74-8.
52. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*. 2006 Feb;10(1):208.
53. Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J Immunol Methods*. 1989 Feb 8;117(1):53-8.
54. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1037-50.
55. Ward PA. Recruitment of inflammatory cells into lung: roles of cytokines, adhesion molecules, and complement. *J Lab Clin Med*. 1997 Apr;129(4):400-4.
56. Kuebler WM, Parthasarathi K, Wang PM, Bhattacharya J. A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(7):905-13.
57. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Mar;141(3):765-88.

58. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*. 1997 May;18(5):231-40.
59. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol*. 1993 Apr;264(4 Pt 1):L413-8.
60. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):343-8.
61. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993 Mar 13;341(8846):643-7.
62. Swanson JM, Mueller EW, Croce MA, Wood GC, Boucher BA, Magnotti LJ, et al. Changes in pulmonary cytokines during antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010 Apr;11(2):161-7.
63. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
64. Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest*. 1997 Nov 15;100(10):2443-8.
65. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1995 Apr;25(4):1129-32.
66. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJ, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, et al. Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. *Ann Surg*. 2002 Nov;236(5):634-42.
67. Alam HB, Sun L, Ruff P, Austin B, Burris D, Rhee P. E- and P-selectin expression depends on the resuscitation fluid used in hemorrhaged rats. *J Surg Res*. 2000 Dec;94(2):145-52.
68. Angle N, Hoyt DB, Coimbra R, Liu F, Herdon-Remelius C, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock. *Shock*. 1998 Mar;9(3):164-70.
69. Ciesla DJ, Moore EE, Biffl WL, Gonzalez RJ, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of the neutrophil cytotoxic response is reversed upon restoration of normotonicity and reestablished by repeated hypertonic challenge. *Surgery*. 2001 May;129(5):567-75.

70. Deree J, Martins JO, Leedom A, Lamon B, Putnam J, de Campos T, et al. Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock resuscitation-induced pulmonary inflammation through attenuation of neutrophil degranulation and proinflammatory mediator synthesis. *J Trauma*. 2007 Jan;62(1):104-11.
71. Gryth D, Rocksen D, Drobin D, Druid H, Weitzberg E, Bursell J, et al. Effects of fluid resuscitation with hypertonic saline dextrane or Ringer's acetate after nonhemorrhagic shock caused by pulmonary contusion. *J Trauma*. 2010 Oct;69(4):741-8.
72. Nydam TL, Moore EE, McIntyre RC, Jr., Wright FL, Gamboni-Robertson F, Eckels PC, et al. Hypertonic saline attenuates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation in pulmonary epithelial cells. *Shock*. 2009 May;31(5):466-72.
73. Shi HP, Deitch EA, Da Xu Z, Lu Q, Hauser CJ. Hypertonic saline improves intestinal mucosa barrier function and lung injury after trauma-hemorrhagic shock. *Shock*. 2002 Jun;17(6):496-501.
74. Murao Y, Hoyt DB, Loomis W, Namiki S, Patel N, Wolf P, et al. Does the timing of hypertonic saline resuscitation affect its potential to prevent lung damage? *Shock*. 2000 Jul;14(1):18-23.
75. Peters-Golden M. Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function. *Sci Signal*. 2009;2(75):pe37.
76. Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, Luo M, Peters-Golden M. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):595-9.
77. Chen Y, Hashiguchi N, Yip L, Junger WG. Hypertonic saline enhances neutrophil elastase release through activation of P2 and A3 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Apr;290(4):C1051-9.
78. Tingay DG, Copnell B, Grant CA, Dargaville PA, Dunster KR, Schibler A. The effect of endotracheal suction on regional tidal ventilation and end-expiratory lung volume. *Intensive Care Med*. 2010 May;36(5):888-96.
79. Lindgren S, Odenstedt H, Olegard C, Sondergaard S, Lundin S, Stenqvist O. Regional lung derecruitment after endotracheal suction during volume- or pressure-controlled ventilation: a study using electric impedance tomography. *Intensive Care Med*. 2007 Jan;33(1):172-80.
80. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 2007 May 5;369(9572):1553-64.

81. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Saenz G, Moseinco M, et al. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002 Nov;30(11):2450-6.
82. Marik PE. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med*. 2001 Mar 1;344(9):665-71.
83. Barbas CS, Matos GF, Amato MB, Carvalho CR. Goal-oriented respiratory management for critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:952168.
84. Meers CM, De Wever W, Verbeken E, Mertens V, Wauters S, De Vleeschauwer SI, et al. A porcine model of acute lung injury by instillation of gastric fluid. *J Surg Res*. 2011 Apr;166(2):e195-204.
85. Kotloff RM, Thabut G. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 15;184(2):159-71.
86. Paries M, Boccheciampe N, Raux M, Riou B, Langeron O, Nicolas-Robin A. Benefit of a single recruitment maneuver after an apnea test for the diagnosis of brain death. *Crit Care*. 2012 Jul 3;16(4):R116.
87. Raghavendran K, Davidson BA, Mullan BA, Hutson AD, Russo TA, Manderscheid PA, et al. Acid and particulate-induced aspiration lung injury in mice: importance of MCP-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Jul;289(1):L134-43.
88. Bregeon F, Papazian L, Delpierre S, Kajikawa O, Payan MJ, Martin TR, et al. Role of proinflammatory activity contained in gastric juice from intensive care unit patients to induce lung injury in a rabbit aspiration model. *Crit Care Med*. 2008 Dec;36(12):3205-12.
89. Heuer JF, Sauter P, Pelosi P, Herrmann P, Bruck W, Perske C, et al. Effects of pulmonary acid aspiration on the lungs and extra-pulmonary organs: a randomized study in pigs. *Crit Care*. 2012 Mar 1;16(2):R35.
90. Varelmann D, Muders T, Zinserling J, Guenther U, Magnusson A, Hedenstierna G, et al. Cardiorespiratory effects of spontaneous breathing in two different models of experimental lung injury: a randomized controlled trial. *Crit Care*. 2008;12(6):R135.
91. Fraisse A, Bregeon F, Delpierre S, Gaudart J, Payan MJ, Pugin J, et al. Hemodynamics in experimental gastric juice induced aspiration pneumonitis. *Intensive Care Med*. 2007 Feb;33(2):300-7.
92. Angle N, Hoyt DB, Cabello-Passini R, Herdon-Remelius C, Loomis W, Junger WG. Hypertonic saline resuscitation reduces neutrophil margination by suppressing neutrophil L selectin expression. *J Trauma*. 1998 Jul;45(1):7-12; discussion -3.

93. Inoue Y, Tanaka H, Sumi Y, Woehrle T, Chen Y, Hirsh MI, et al. A3 adenosine receptor inhibition improves the efficacy of hypertonic saline resuscitation. *Shock*. 2011 Feb;35(2):178-83.
94. Oliveira-Junior IS, Maganhin CC, Carbonel AA, Monteiro CM, Cavassani SS, Oliveira-Filho RM. Effects of pentoxifylline on TNF-alpha and lung histopathology in HCL-induced lung injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008 Feb;63(1):77-84.
95. Pawlik MT, Schreyer AG, Ittner KP, Selig C, Gruber M, Feuerbach S, et al. Early treatment with pentoxifylline reduces lung injury induced by acid aspiration in rats. *Chest*. 2005 Feb;127(2):613-21.
96. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.
97. Camporota L, Ranieri VM. What's new in the 'Berlin' definition of Acute Respiratory Distress Syndrome? *Minerva Anesthesiol*. 2012 Aug 3.
98. Aboab J, Jonson B, Kouatchet A, Taille S, Niklason L, Brochard L. Effect of inspired oxygen fraction on alveolar derecruitment in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2006 Dec;32(12):1979-86.
99. Hlastala MP, Lamm WJ, Karp A, Polissar NL, Starr IR, Glenny RW. Spatial distribution of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the supine pig. *J Appl Physiol*. 2004 May;96(5):1589-99.
100. Hughes JD, Rubin LJ. Relation between mixed venous oxygen tension and pulmonary vascular tone during normoxic, hyperoxic and hypoxic ventilation in dogs. *Am J Cardiol*. 1984 Nov 1;54(8):1118-23.
101. Benumof JL. One-lung ventilation and hypoxic pulmonary vasoconstriction: implications for anesthetic management. *Anesth Analg*. 1985 Aug;64(8):821-33.
102. Vieillard-Baron A, Prin S, Chergui K, Dubourg O, Jardin F. Echo-Doppler demonstration of acute cor pulmonale at the bedside in the medical intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Nov 15;166(10):1310-9.
103. Bellezza M, Kerbaul F, Roussel L, Imbert M, Guidon C. The effect of hypertonic saline dextran solutions on hypoxic pulmonary vasoconstriction in anaesthetised piglets. *Eur Respir J*. 2002 Oct;20(4):965-71.
104. Schreiber T, Hueter L, Gaser E, Schmidt B, Schwarzkopf K, Karzai W. Effects of a catecholamine-induced increase in cardiac output on lung injury after experimental unilateral pulmonary acid instillation. *Crit Care Med*. 2007 Jul;35(7):1741-8.

105. Malbouisson LM, Busch CJ, Puybasset L, Lu Q, Cluzel P, Rouby JJ. Role of the heart in the loss of aeration characterizing lower lobes in acute respiratory distress syndrome. CT Scan ARDS Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jun;161(6):2005-12.
106. Kantrow SP, Shen Z, Jagneaux T, Zhang P, Nelson S. Neutrophil-mediated lung permeability and host defense proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Oct;297(4):L738-45.
107. Inci I, Ampollini L, Arni S, Jungraithmayr W, Inci D, Hillinger S, et al. Ex vivo reconditioning of marginal donor lungs injured by acid aspiration. *J Heart Lung Transplant*. 2008 Nov;27(11):1229-36.
108. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med*. 1996 Aug 1;125(3):191-6.
109. Raymondos K, Martin MU, Schmudlach T, Baus S, Weilbach C, Welte T, et al. Early alveolar and systemic mediator release in patients at different risks for ARDS after multiple trauma. *Injury*. 2012 Feb;43(2):189-95.
110. Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Usugi E, Nata M. Molecular-biological analysis of acute lung injury (ALI) induced by heat exposure and/or intravenous administration of oleic acid. *Leg Med (Tokyo)*. 2012 Jul 20.
111. Matthay MA, Rosen GD. Acid aspiration induced lung injury. New insights and therapeutic options. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):277-8.
112. Lee HJ, Im JG, Goo JM, Kim YI, Lee MW, Ryu HG, et al. Acute lung injury: effects of prone positioning on cephalocaudal distribution of lung inflation--CT assessment in dogs. *Radiology*. 2005 Jan;234(1):151-61.
113. Wiener CM, Kirk W, Albert RK. Prone position reverses gravitational distribution of perfusion in dog lungs with oleic acid-induced injury. *J Appl Physiol*. 1990 Apr;68(4):1386-92.