

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA – FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA RESPIRATÓRIA EXPERIMENTAL

REPERCUSSÕES DA HIPERTENSÃO PORTOPULMONAR NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE RATOS

RODRIGO STORCK CARVALHO

BRASÍLIA – 2013

Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina – FM

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Laboratório de Fisiologia Respiratória Experimental

REPERCUSSÕES DA HIPERTENSÃO PORTOPULMONAR NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE RATOS

Doutorando: Rodrigo Storck Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tavares

Co-Orientador: Prof. Dr. César Augusto Melo e Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília – UnB como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médicas.

BRASÍLIA – 2013

Epígrafe

$$f(x) = \frac{e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}}{\sigma\sqrt{2\pi}}$$

Abraham de Moivre

"A vida é aquilo que acontece enquanto
fazemos planos para o futuro"

John Lennon

Dedicatória

Aos meus pais, Bayard Garcia Carvalho (*in memoriam*) e Maria de Fátima Storck Carvalho, ao meu irmão Bruno Storck Carvalho, e à minha esposa Mônica Mendes Vieira Storck Carvalho.

Agradecimentos

Algumas pessoas contribuíram de forma significativa para a elaboração e realização dessa tese. A elas manifesto meu sincero agradecimento:

- Ao Prof. Dr. Paulo Tavares, meu orientador, mais uma vez pela oportunidade e incentivo dado desde o dia em que eu o vi entrar pela porta do laboratório. Todos os encontros sempre repletos de aprendizados. Muito grato por tudo Dr. Paulo;
- Ao Prof. Dr. César Augusto Melo e Silva por, incansavelmente, manter constante o estímulo a prática da boa pesquisa científica, independentemente do continente em que estivesse. Certamente todas as oportunidades proporcionadas nestes 14 anos de amizade e parceria de sucesso foram aproveitadas. Me sinto muito honrado por ter sido presenteado, divinamente, com a oportunidade de tê-lo conhecido. Muito grato grande Mestre!;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Gaio e Profa. Dra. Verônica Amado pela força e pela forma sempre alegre com que me recebem no laboratório e, insisto, por manter as portas do laboratório abertas a qualquer tempo. Muitíssimo grato!;
- À Profa. Dra. Verônica Amado por ter topado conduzir grande parte do trâmite burocrático junto à Secretaria da Pós-Graduação, fazendo, portanto, com que a minha vida acadêmica corresse de forma tranquila. Mais uma vez muito obrigado!

- Ao Ronaldo (*in memoriam*), pela presença e ajuda bem humorada em todos os momentos no laboratório, desde 2001. Fique em paz!;
- Aos meus amigos Prof. Dr. Sérgio Leite e Profa. MSc. Fernanda Ribeiro, pela força, apoio e companheirismo. Grato por conhecê-los!;
- À toda turma da Pneumologia do Hospital Universitário de Brasília, pelo apoio dispensado em meu favor desde o primeiro dia em que pisei naquele hospital;
- À Kelly Cristina Santiago Abreu Pereira, minha amiga, pela parceria de sucesso, pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos em que minha falta era justificada pela dedicação a execução desta Tese;
- Aos meus estudantes que, por vezes, também sofreram com a minha ausência, mas que compreenderam o motivo. A causa foi e é nobre;
- À Rebecca Melo Barbosa, minha estudante, pelo apoio;
- À Ana Flávia Gonçalves de Castro Nunes, meu braço direito, por todo o empenho na ajuda em, praticamente, todas as etapas da realização desse trabalho. A sua ajuda foi fundamental para a conclusão do trabalho. Mui-tíssimo grato pela força e ajuda!;
- Ao Dedé, que na ausência do Ronaldo tomou a frente nos cuidados com nossos animais no laboratório;

- Ao Thadeu e sua mãe Leoni, por todo o apoio, incentivo e força dispensada em meu favor desde o dia em que tive o prazer de conhecê-los. Vocês são demais!;
- Ao amigo Wagner Martins, pela parceria e pelas oportunidades viabilizadas. Valeu!!!
- Ao Bruno Storck Carvalho, meu irmão, pela amizade e amor. Amo você!;
- À minha mãe (e Pai) Maria de Fátima Storck Carvalho, por todo amor e sabedoria com que conduz nossa família, me possibilitando manter viva a ideia de que minha formação acadêmica é simplesmente um coadjuvante da minha formação humana. Amo você!;
- À Mônica Mendes Vieira Storck Carvalho, minha esposa, pelo amor, paciência, dedicação, tolerância e colaboração (obrigado pelos desenhos)... Amo você!;
- Ao meu pai, Bayard Garcia Carvalho (*in memoriam*), grande Maestro da minha vida que, em clave de amor com sabedoria, nunca deixou que eu perdesse o compasso, o ritmo e o tom na vida. Pai, muitos foram os aprendizados ao teu lado... não existem palavras para agradecer o que fizeste por nossa família... um dia nos encontraremos... Muito obrigado pela família que me deste... Amo você!!! Fique em paz!!!.

Resumo

Introdução: A associação entre doença hepática e alterações vasculares pulmonares é conhecida desde 1884 quando Fluckiger descreveu o caso de uma paciente. Uma das síndromes pulmonares causadas por alterações vasculares em doença hepática é a síndrome portopulmonar (SPP), caracterizada por vasoconstrição e aumento da resistência vascular pulmonar. Hipertensão portopulmonar (HPP) é uma complicação da hipertensão portal cirrótica ou não cirrótica e tem uma prevalência de 5 a 6% entre os pacientes com doença hepática descompensada. É verdade que os fatores hemodinâmicos, juntamente com a tensão de superfície da interface ar-líquido e da tensão dada pelo tecido elástico e fibras de colágeno que compõe o tecido pulmonar são responsáveis para a estabilidade mecânica do parênquima pulmonar. Então, será que as repercussões estruturais e hemodinâmicas causadas por HPP são capazes de alterar a impedância do sistema respiratório? **Métodos:** O estudo foi dividido em duas fases, onde foram utilizados dezesseis ratos Wistar machos em cada uma das fases, e divididos em dois grupos: CTRL (n = 8) e LVP (n = 8). O modelo de HPP foi induzido por ligadura da veia porta (LVP). As variáveis ventilatórias foram registradas em ventilação espontânea por 10 minutos, a mecânica da parede torácica, dos pulmões e do sistema respiratório foram medidas por meio do método de oclusão rápida das vias aéreas ao final inspiração e a proporção de fibras colágenas e elásticas no parênquima e artérias pulmonares foram medidas duas semanas após a indução HPP. Em ambos os grupos as variáveis ventilatórias volume corrente (V_T), tempo inspiratório (T_I), tempo expiratório (T_E), tempo total do ciclo ventilatório (T_{tot}), relação entre o tempo inspiratório e o tempo total do ciclo ventilatório (T_I/T_{tot}), o fluxo aéreo médio

(V_T/T_I), a frequência ventilatória e o volume minuto foram estudadas, bem como as variáveis mecânicas variação de pressão no componente resistivo ($\Delta P1$), variação de pressão no componente viscoelástico ($\Delta P2$), variação total de pressão (ΔP_{tot}), elastância dinâmica (E_{dyn}), elastância estática (E_{st}) e resistência (R). Os dados foram analisados por meio do teste t de *Student*. **Resultados:** Quando analisamos as variáveis ventilatórias observamos no grupo LVP em relação ao grupo controle: queda de 17% no V_T ($p = 0,003$); aumento de 47% do T_I ($p < 0,0001$); queda de 24% na frequência respiratória ($p < 0,0001$); queda de 37% no volume minuto ($p < 0,0001$); aumento de 30% no T_{tot} ($p < 0,0001$); queda de 44% no V_T/T_I ($p < 0,0001$); e aumento de 13% na T_I/T_{tot} ($p = 0,0005$). Já nas propriedades mecânicas do sistema respiratório observamos no grupo LVP em relação ao grupo controle: aumento de 9% no $\Delta P2$ ($p = 0,016$); aumento de 11% na E_{st} ($p = 0,0008$); e aumento de 10% na E_{dyn} ($p = 0,0001$). Nos pulmões observamos: aumento de 45% no $\Delta P2$ ($p = 0,04$); aumento de 24% na E_{st} ($p = 0,0001$); e aumento de 26% na E_{dyn} ($p < 0,0001$). E na parede torácica observamos: aumento de 53% no $\Delta P1$ ($p < 0,0001$); e aumento de 52% na R ($p < 0,0001$). Na análise morfométrica do parênquima pulmonar, observamos um incremento de 31,19% na proporção de fibras elásticas ($p < 0,0001$) no grupo LVP quando comparado ao grupo controle, no entanto não houve diferença entre os grupos quando analisada a proporção de fibras colágenas. Ao analisar morfometricamente, as artérias pulmonares, observamos um incremento de 23,36% e 25,66% na proporção de fibras elásticas ($p < 0,0001$) e colágenas ($p < 0,0001$), respectivamente, do grupo LVP em relação ao grupo controle. **Conclusão:** a sobrecarga hemodinâmica causada pela HPP foi capaz de provocar alterações nas propriedades resistivas da parede torácica, nas propriedades viscoelásticas e elásticas dos pulmões e do sistema respiratório.

Palavras-chave: síndrome portopulmonar; hipertensão portopulmonar; mecânica respiratória; morfometria.

Abstract

Rationale: The association between liver disease and pulmonary vascular changes is known since 1884 when Fluckiger described the case of a patient. One of the syndromes caused by pulmonary vascular disorders in liver disease is Portopulmonary Syndrome (PPS), characterized by vasoconstriction and increased pulmonary vascular resistance. Portopulmonary hypertension (PPH) is a complication of cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension and has a prevalence of 5-6% among patients with decompensated liver disease. It is true that hemodynamic factors with the surface tension of the air-liquid interface and the elastic recoil given by elastic tissue and collagen fibers that compose the lung tissue are responsible for the mechanical stability of the lung parenchyma. So, will the structural and hemodynamic effects caused by PPH be able to alter the impedance of the respiratory system? **Methods:** The study was divided into two stages, which were used sixteen male Wistar rats in each of the stages and divided into two groups: CTRL (n = 8) and LVP (n = 8). The PPH model was induced by ligation of the portal vein. The ventilatory variables were recorded in spontaneous breathing for 10 minutes, the mechanics of the chest, lungs and respiratory system were measured by the end-inflation occlusion method and the proportion of collagen and elastic fibers in the parenchyma and lungs arteries were measured two weeks after PPH induced. In both groups the ventilatory variables tidal volume (V_T), inspiratory time (T_I), expiratory time (T_E), duty cycle (T_{tot}), inspiratory time and duty cycle ratio (T_I/T_{tot}), mean airway flow (V_T/T_I), respiratory rate and minute volume were studied, as well as mechanical variables resistive component pressure variation ($\Delta P1$), viscoelastic component pressure variation ($\Delta P2$), total pressure variation (ΔP_{tot}), dy-

dynamic elastance (E_{dyn}), static elastance (E_{st}) and resistance (R). Data were analyzed using the student t test. **Results:** Ventilatory variables observed in the LVP group compared to the control group: 17% reduction in V_{T} ($p = 0.003$), increase of 47% of T_{I} ($p < 0,0001$), 24% decrease in respiratory rate ($p < 0,0001$) 37% decrease in minute volume ($p < 0,0001$), a 30% increase in T_{tot} ($p < 0,0001$) 44% decrease in $V_{\text{T}}/T_{\text{I}}$ ($p < 0,0001$) and a 13% increase in the $T_{\text{I}}/T_{\text{tot}}$ ($p = 0,0005$). The mechanical properties of the respiratory system observed in the LVP group compared to the control group: 9% increase in $\Delta P2$ ($p = 0,016$), 11% increase in E_{st} ($p = 0,0008$) and 10% increase in E_{dyn} ($p = 0,0001$). In the lungs observed: 45% increase in $\Delta P2$ ($p = 0,04$) 24% increase in E_{st} ($p = 0,0001$) and 26% increase in E_{dyn} ($p < 0,0001$). The chest observed: 53% increase in $\Delta P1$ ($p < 0,0001$) and 52% increase in R ($p < 0,0001$). Morphometric analysis of the pulmonary parenchyma showed an increase of 31,19% in the proportion of elastic fibers ($p < 0,0001$) in LVP compared to the control group, however there was no difference between the groups when analyzing the proportion of collagen fibers. By analyzing morphometrically the pulmonary arteries, we observed an increase of 23,36% and 25,66% at a proportion of elastic fibers ($p < 0,0001$) and collagen fibers ($p < 0,0001$), respectively, in LVP to the control group. **Conclusion:** The hemodynamic overload caused by PPH was able to cause changes in the chest resistance, elastic and viscoelastic properties of the lungs and respiratory system.

Keywords: portopulmonary syndrome; portopulmonary hypertension; respiratory mechanics; morphometry.

Sumário

Epígrafe	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	x
Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xviii
1 Introdução	1
2 Objetivo	7
3 Materiais e Métodos	8
3.1 Animais utilizados	8
3.2 Local da Pesquisa	8
3.3 Fase 1	8
3.3.1 Caracterização dos grupos	8
3.3.2 Protocolo experimental	10
3.3.3 Técnica de extração do bloco coração-pulmões	10

3.3.4	Medida da pressão arterial pulmonar	12
3.3.5	Aquisição do sinais	14
3.3.6	Fixação do tecido hepático e preparo das lâminas	15
3.3.7	Proporção de volume de fibras colágenas no tecido hepático . .	15
3.4	Fase 2	16
3.4.1	Caracterização dos grupos	16
3.4.2	Protocolo experimental	16
3.4.3	Variáveis ventilatórias	17
3.4.4	Análise das propriedades mecânicas passivas do sistema res- piratório	18
3.4.5	Aquisição do sinais	21
3.4.6	Fixação dos pulmões e do tecido hepático e preparo das lâminas	22
3.4.7	Proporção de volume de fibras colágenas e elásticas no parên- quima pulmonar, artérias pulmonares e tecido hepático	23
3.5	Análise estatística	23
4	Resultados	25
4.1	Fase 1	25
4.2	Fase 2	25
4.2.1	Medidas das variáveis ventilatórias	25
4.2.2	Medida das propriedades mecânicas passivas do sistema res- piratório	26

4.2.3	Análise morfométrica do parênquima pulmonar e artéria pulmonar	27
5	Discussão	30
5.1	Fase 1	30
5.2	Fase 2	31
6	Limitações do Estudo	37
7	Conclusões	39
	Referências Bibliográficas	40

Lista de Abreviaturas

SPP Síndrome portopulmonar;

SHP Síndrome hepatopulmonar;

HPP Hipertensão portopulmonar;

CTRL Grupo controle;

LVP Grupo ligadura parcial da veia porta;

\dot{Q}_P Fluxo sanguíneo pulmonar;

V_T Volume corrente;

T_I Tempo inspiratório;

T_E Tempo expiratório;

T_{tot} Tempo total do ciclo ventilatório;

T_I/T_{tot} Relação entre o tempo inspiratório e o tempo total do ciclo ventilatório;

V_T/T_I Fluxo aéreo médio;

f Frequência respiratória;

PEEP Pressão positiva ao final da expiração;

NaHCO_3^- Bicarbonato de sódio;

T Temperatura;

P_{max} Pressão máxima;

P_i Pressão no ponto de inflexão;

P_{el} Pressão elástica;

ΔP_1 Dissipação de energia no componente resistivo (cmH₂O);

ΔP_2 Dissipação de energia no componente viscoelástico (cmH₂O);

ΔP_{tot} Dissipação total de energia (cmH₂O);

E_{st} Elastância estática (cmH₂O.mL⁻¹);

E_{dyn} Elastância dinâmica (cmH₂O.mL⁻¹);

R Resistência (cmH₂O.mL.s⁻¹);

Lista de Figuras

1	Modelo linear bicompartimental	5
2	Esquematização do delineamento do estudo.	9
3	Ligadura parcial da veia porta.	11
4	Adaptação do modelo de reperfusão pulmão-para-pulmão <i>ex-vivo</i> descrito por DeCampos e colaboradores em 1996.	13
5	Exemplo de traçado dos sinais de fluxo aéreo, pressão traqueal e pressão esofageana durante a ventilação espontânea.	17
6	Exemplo de traçado dos sinais de fluxo aéreo, pressão traqueal e pressão esofageana durante a manobra de oclusão rápida das vias aéreas ao final de inspiração.	22
7	Fotomicrografias do parênquima e artérias pulmonares.	29

Lista de Tabelas

- 1 Medidas das variáveis ventilatórias durante ventilação espontânea. . . 26
- 2 Medidas das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório, pulmões e parede torácica. 27
- 3 Análise morfométrica dos tecidos pulmonar e artéria pulmonar. . . . 28

1 Introdução

A associação entre doença hepática e alterações vasculares pulmonares foi reconhecida em 1884 por Fluckiger,¹ entretanto, foi somente a partir da década de 1970 que os estudos relacionados aos distúrbios específicos da circulação pulmonar, doença do fígado e hipertensão portal começaram a ser conduzidos.²

As alterações vasculares pulmonares causadas por doença hepática incluem duas síndromes distintas: (i) a hepatopulmonar (SHP), caracterizada por dilatação da microcirculação pulmonar, bem como remodelamento vascular pulmonar e de vias aéreas³ e (ii) a hipertensão portopulmonar (HPP), caracterizada por vasoconstrição além de remodelamento vascular e aumento da resistência vascular pulmonar.^{4,5}

A HPP é uma complicação da hipertensão portal de origem cirrótica ou não cirrótica. Predomina a vasoconstrição e o aumento da resistência vascular pulmonar, com proliferação e espessamento da íntima e hipertrofia e fibrose da camada íntima muscular nas arteríolas pulmonares. A HPP tem uma prevalência de, aproximadamente, 5 a 6% entre os pacientes candidatos ao transplante hepático, e pode evoluir com melhora, piora ou estabilidade, após o transplante hepático. Não guarda relação com a gravidade da doença, mas tem associação ao sexo feminino e doença hepática auto-imune.⁶

Atualmente sabemos que as doenças hepáticas são potenciais causadoras de complicações pulmonares,⁷ haja vista nas doenças hepáticas observarmos uma produção bastante acentuada de fator de crescimento endotelial vascular e óxido

nítrico.^{8,9} Esses mediadores estão intimamente relacionados à fisiopatologia das complicações pulmonares causadas por doenças hepáticas, especialmente a HPP.¹⁰

Muito embora o mecanismo fisiopatológico da HPP continue pouco claro, a gênese da HPP tem sido explorada sob três pontos: (i) circulação hiperdinâmica; (ii) circulação de mediadores vasoativos; e (iii) fatores genéticos.^{11,12} Bem como na hipertensão arterial pulmonar, alguns achados histopatológicos estão presentes, como: hipertrofia medial, proliferação intimal e lesões plexiformes das arteríolas pulmonares.¹³

Foi descrito, há muitas décadas, que pacientes com cirrose hepática poderiam apresentar um estado em que um alto débito cardíaco estaria presente junto a uma baixa resistência vascular sistêmica, o que na presença de um aumento da resistência vascular pulmonar implicaria em importante aumento da pressão arterial pulmonar.¹⁴

A desregulação no sistema de produção de óxido nítrico no endotélio também tem sido atribuído à gênese da HPP. Recentemente, Millatt e colaboradores¹⁵ e Kielstein e colaboradores¹⁶ mostraram que a inibição da síntese de óxido nítrico pela dimetilarginina assimétrica (ADMA) tem ligação com a gênese da HPP.

Ainda que desempenhando um papel de menor impacto, os fatores genéticos podem participar da gênese da HPP, haja vista existir uma pré-disposição genética para a hipertensão arterial pulmonar em indivíduos com mutação no receptor tipo 2 da proteína morfogenética óssea.¹⁷

É fato que os fatores hemodinâmicos, juntamente com a tensão superficial

da interface ar-líquido e a tensão tecidual dada pelas fibras elásticas e colágenas que compõem o tecido pulmonar, são responsáveis pela estabilidade mecânica do parênquima pulmonar.¹⁸ As pressões arterial e venosa¹⁹ e o fluxo sanguíneo pulmonar (\dot{Q}_P)^{20,21} influenciam, de forma significativa, a estabilidade e as propriedades mecânicas dos pulmões.

Datam da década de 1960 observações feitas por Borst e colaboradores²² acerca o impacto do sangue nas propriedades mecânicas dos pulmões, quando verificaram que o aumento da pressão atrial esquerda diminuía a complacência pulmonar. Da mesma forma, em 1978, Gray e colaboradores²³ mostraram em cães que o aumento da pressão arterial pulmonar (decorrente de aumento do volume sanguíneo pulmonar provocado por oclusão parcial da válvula mitral) também cursava com diminuição da complacência pulmonar. Outrossim, a diminuição do volume sanguíneo no leito vascular pulmonar repercute com diminuição da superfície alveolar.²⁴ Outra evidência da influência do volume sanguíneo pulmonar nas propriedades mecânicas pulmonares foi mostrada por Simon e colaboradores²⁵ em 1997 quando ocluíram um ramo da artéria pulmonar de cachorros e verificaram aumento da elastância pulmonar ipsilateral a oclusão, e aumento do volume ventilatório no pulmão contralateral a oclusão, o que os fizeram concluir que o volume pulmonar também depende do volume sanguíneo no leito vascular pulmonar.

Os resultados dos estudos de Peták e colaboradores¹⁹ e Freezer e colaboradores²⁰ mostram claramente a associação entre resistência total do sistema respiratório e a pressão do capilar pulmonar. Os autores sugerem que a congestão

vascular pulmonar aumenta a força necessária para movimentar o sistema respiratório, e que essa elevação da impedância se deve ao incremento das propriedades resistivas das vias aéreas e das propriedades viscoelásticas do tecido pulmonar.

Peták e colaboradores²⁶ demonstraram, em pulmões isolados de ratos, que a hipoperfusão também altera as propriedades mecânicas pulmonares. Os autores demonstraram que a hipoperfusão aumenta a elastância (H) e a resistência do tecido pulmonar (R_{tis}) e que, uma vez restabelecida a perfusão, a H e a R_{tis} são atenuadas. A análise histológica dos pulmões submetidos à hipoperfusão revelou que na ausência de pressão no capilar pulmonar, os contornos alveolares estavam torcidos e que o restabelecimento das pressões fisiológicas dos capilares pulmonares devolveu aos alvéolos sua geometria ótima. Sendo assim, está claro que perturbações hemodinâmicas pulmonares, sobretudo o aumento ou a redução da pressão do capilar pulmonar, alteram a impedância do sistema respiratório.

Em 2010 Silva e colaboradores²⁷ ratificaram as informações trazidas por Peták e colaboradores²⁶ ao demonstrarem em um modelo de lesão pulmonar por isquemia e reperfusão que o simples fato de remover o sangue da vasculatura pulmonar ou substituí-lo por uma solução de preservação (Euro-Collins), que contém baixa pressão oncótica, é suficiente para desarranjar a arquitetura alveolar e conseqüentemente desestabilizar mecanicamente o parênquima pulmonar.

Bates e colaboradores em 1985,²⁸ ao reunirem as informações produzidas Otis e colaboradores,²⁹ Mount³⁰ e Zin e colaboradores,³¹ apresentaram o modelo proposto por Mount³⁰ (modelo reológico bicompartimental reológico, figura 1)

composto por elementos elásticos e resistivos, representados por molas e amortecedores, respectivamente. Com este modelo, é possível estudar as propriedades mecânicas do sistema respiratório.

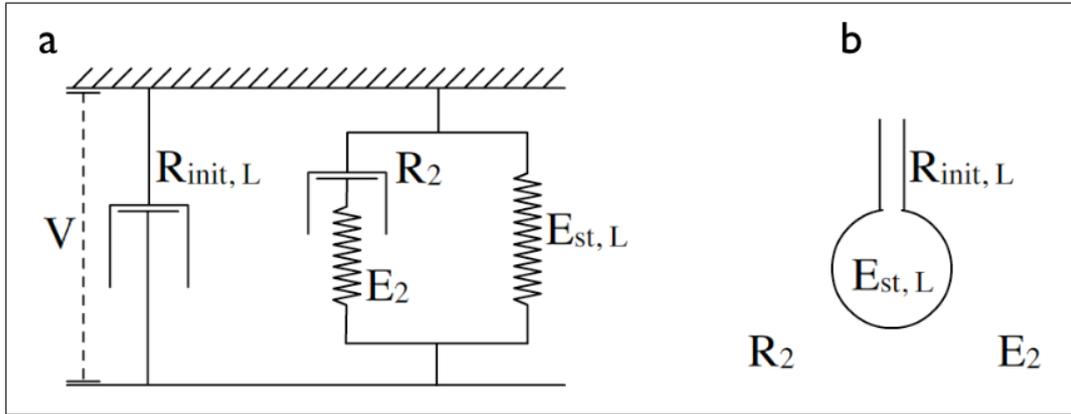


Figura 1: Modelo linear bicompartimental proposto por Mount. a) representação mecânica: uma barra fixa conectada a uma barra móvel por meio de uma mola de elastância $E_{st, L}$ e um amortecedor de resistência $R_{init, L}$, associados em paralelo a um corpo de Maxwell (amortecedor R_2 ligado em série a uma mola E_2). V é o análogo do volume; b) representação anatômica.

É sabido que na HPP o aumento da resistência vascular pulmonar se deve a alguns fatores, como: (i) vasoconstrição pulmonar; (ii) níveis alterados de mediadores na circulação; (iii) estresse tangencial no leito vascular pulmonar e (iv) remodelamento vascular.³² No entanto, não se conhece o efeito desses fatores nas propriedades mecânicas do sistema respiratório, muito embora alguns estudos mostrem um padrão predominantemente restritivo em pacientes com hipertensão arterial pulmonar, o que se atribui a alterações da complacência do sistema respiratório ou eventual redução da força da musculatura respiratória.^{33,34} Isto nos leva a supor que a hipertensão arterial pulmonar presente nestas condições não deva ser, exclusivamente, a única alteração da função do sistema respiratório.

Provavelmente a HPP também está associada a maior inflamação intravascular, o que contribuiria, também, com aumento da dissipação de energia nos componentes viscoelástico e elástico pulmonares, isto é, com aumento da impedância do sistema respiratório.³⁵

Também é sabido que as forças físicas exercem papel fundamental na regulação da estrutura, da função e do metabolismo pulmonar.³⁶ Estas forças estão relacionadas à (i) regulação da proliferação celular,^{37,38} (ii) ao metabolismo do surfactante,³⁹ (iii) à permeabilidade celular,⁴⁰ (iv) à liberação de mediadores inflamatórios^{41,42} e (v) ao remodelamento da vasculatura e do parênquima pulmonar.^{43,44}

No que tange ao remodelamento, o tecido pulmonar pode se alterar se for exposto, ininterruptamente, à forças mecânicas provenientes das vias aéreas e ou da vasculatura capazes de distender ou alongar as células que os compõem,^{36,44} ou também por estímulos inflamatórios.⁴⁵

Portanto, será que as repercussões estruturais e hemodinâmicas observadas na hipertensão portopulmonar alteram a impedância do sistema respiratório?

2 Objetivo

Estudar as propriedades resistiva, viscoelástica e elástica do sistema respiratório e de seus componentes, pulmões e parede torácica, de ratos submetidos a um modelo experimental de hipertensão portopulmonar, bem como investigar o comportamento das variáveis ventilatórias e a morfometria do parênquima pulmonar, das artérias pulmonares e tecido hepático.

3 Materiais e Métodos

O presente estudo (Comitê de Ética no Uso Animal, UnBDOC nº 10316/2010) foi dividido em duas fases: (i) fase 1, com intuito de garantir que o modelo experimental proposto fora capaz de reproduzir a hipertensão arterial pulmonar vista nos indivíduos que têm hipertensão portopulmonar; e (ii) fase 2, com o intuito de estudar as alterações nas funções do sistema respiratório.

3.1 Animais utilizados

Para a realização desse estudo, foram utilizados 32 ratos machos, da cepa *Wistar*, adquiridos no Laboratório BioAgri, Planaltina – DF, com peso entre 295 e 320 gramas. Dos 32 animais, 16 foram utilizados na fase 1 e os outros 16 na fase 2, como ilustrado na figura 2.

3.2 Local da Pesquisa

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Universidade de Brasília – UnB, Faculdade de Medicina, sala BC-204. As lâminas dos tecidos pulmonar e hepático foram processadas no laboratório MICRA (Brasília – DF).

3.3 Fase 1

3.3.1 Caracterização dos grupos

Os 16 animais foram divididos, de forma aleatória, em 2 grupos:

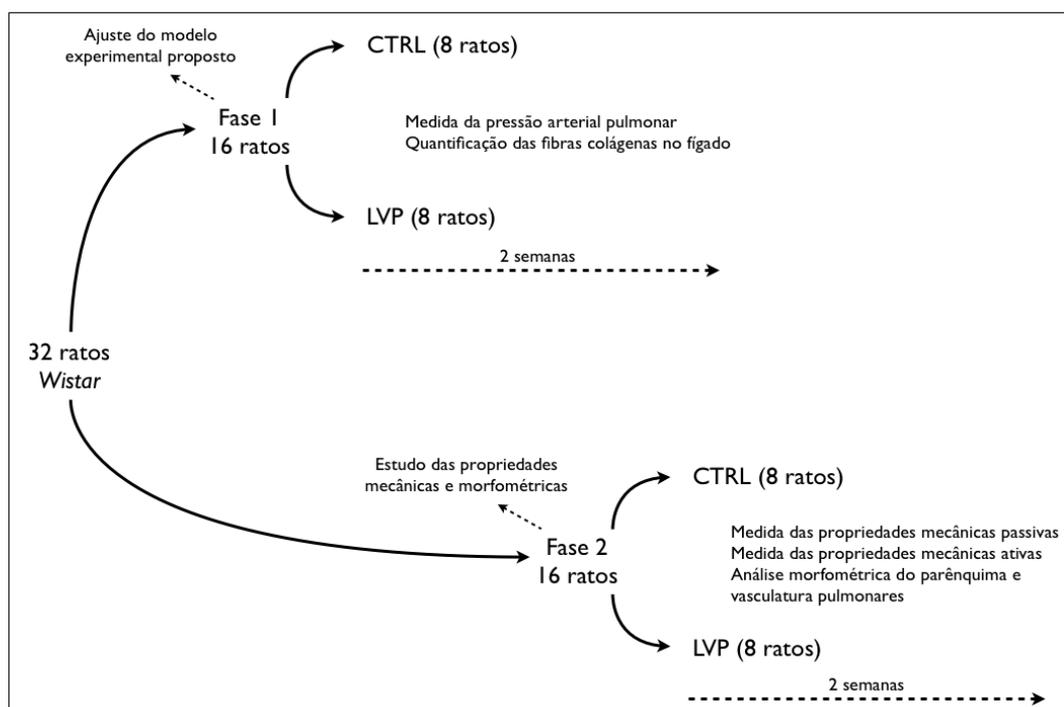


Figura 2: Esquematização do delineamento do estudo. CTRL: grupo controle; LVP: grupo ligadura parcial da veia porta.

Controle: composto por 8 ratos que foram submetidos à laparotomia mediana, tiveram a veia porta e fígado manipulados e seus abdômen suturados. A pressão arterial pulmonar e a proporção de volume de fibras colágenas no fígado foram estudadas nos 8 animais. Todas as medidas foram realizadas 2 semanas após a realização do protocolo experimental.

LVP: composto por 8 ratos que foram submetidos à laparotomia mediana e ligadura parcial da veia porta. A pressão arterial pulmonar e a proporção de volume de fibras colágenas no fígado foram estudadas nos 8 animais. Todas as medidas foram realizadas 2 semanas após a realização do protocolo experimental.

3.3.2 Protocolo experimental

Para a realização deste experimento, todos os animais dos 2 grupos foram anestesiados com ketamina (75 mg.kg^{-1} i.p.) e xilazina (10 mg.kg^{-1} i.p.). Os ratos do grupo controle foram submetidos à laparotomia mediana de 3 cm, manipulação da veia porta e do fígado, seguida de fechamento da cavidade abdominal (fio Catgut 3-0). Nos animais do grupo LVP, para indução da hipertensão porto-pulmonar, foi feita então uma ligadura parcial (fio de seda 3-0) compreendendo a veia porta e uma agulha (Nº 20G), de modo que ao remover a agulha o calibre da veia ficasse reduzido, e não completamente obstruído,⁴⁶ conforme ilustrado na figura 3. Em seguida foi procedido o fechamento da cavidade abdominal (fio Catgut 3-0). A pele foi suturada com fio de nylon (4-0) e utilizamos água oxigenada para limpar todas as feridas operatórias.

Após a realização de todas as cirurgias, os ratos foram abrigados, individualmente, por 2 semanas, no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB, onde há ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. O acesso à água potável e à ração foi *ad libidum*. Para analgesia pós-operatória, buprenorfina foi adicionada à água de modo que a solução contivesse 0.056 mg.mL^{-1} da droga. Esta solução analgésica foi administrada durante os 3 primeiros dias de pós-operatório.⁴⁷

3.3.3 Técnica de extração do bloco coração-pulmões

Inicialmente, os animais foram sedados com diazepam (5 mg i.p.) e anestesiados com thionembital sódico (30 mg.kg^{-1} i.p.). Em seguida foi realizada a

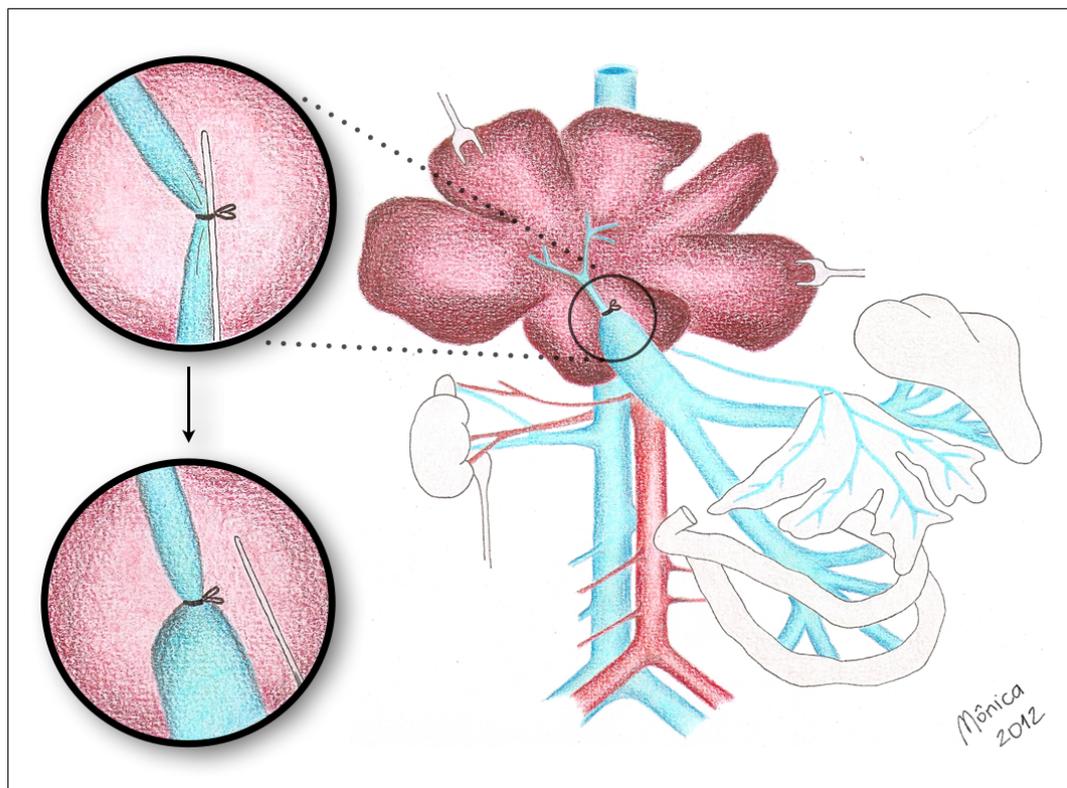


Figura 3: Ilustração do modelo de ligadura parcial da veia porta.

traqueostomia, com introdução de uma cânula de polietileno (cateter Jelco[®] N^o 14G, com sua extremidade distal conectada a uma torneira plástica de três vias), fixada à traquéia com fio de seda 3-0. Dessa forma, os animais foram ventilados mecanicamente em modo controlado (Harvard Apparatus 680A, Millis, MA, EUA) com ar ambiente, frequência respiratória de 80 irpm, volume corrente de 10 mL.kg⁻¹ e pressão positiva ao final da expiração de 5 cmH₂O.

Ainda em ventilação mecânica os animais foram submetidos à laparotomia mediana, seguida de administração, via veia cava inferior, de heparina sódica (1.000 UI.kg⁻¹). O acesso torácico foi realizado por meio de esternotomia mediana. O timo foi ressecado, os grandes vasos cardíacos expostos e, no tronco da artéria pulmonar, via ventrículo direito, foi introduzida uma cânula de polietileno

(cateter Jelco[®] N^o 16G). Após o preenchimento com sangue oriundo da artéria pulmonar, a extremidade distal da cânula foi conectada a uma torneira plástica de três vias, previamente preenchida com solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, que tinha como objetivo evitar a entrada de ar na circulação pulmonar. O átrio e o ventrículo esquerdos foram excisados. Este procedimento evitava oclusão da drenagem venosa pulmonar e permitia fluxo livre do sangue efluente dos pulmões.

Ao final da inspiração, a torneira de três vias da cânula traqueal foi ocluída e os pulmões mantidos insuflados. O bloco coração-pulmões foi excisado e imediatamente colocado e preservado, em temperatura ambiente, em uma placa de Petri, preenchida com solução fisiológica de NaCl a 0,9%. O bloco foi coberto por um pequeno pedaço de filme plástico, para evitar sua desidratação, e permaneceu em isquemia à temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos, tempo necessário para realizar todo o procedimento experimental para, então, se iniciar a reperfusão.

3.3.4 Medida da pressão arterial pulmonar

Para a medida da pressão arterial pulmonar, utilizamos uma versão modificada do modelo de reperfusão pulmão-para-pulmão *ex-vivo* descrito por DeCampos e colaboradores.⁴⁸ Basicamente, a adaptação feita ao modelo foi a utilização de apenas um bloco de coração-pulmões em vez de dois como descrito no modelo original. Como não pretendíamos avaliar as trocas gasosas, preferimos poupar

animais e materiais utilizando tão somente um bloco de coração-pulmões. Esta adaptação pode ser vista na figura 4.

Esse modelo permite a medição prolongada, em condições estáveis, de diversas variáveis ligadas a função pulmonar, inclusive a pressão arterial pulmonar (registrada por 10 minutos após a estabilização do sistema). Utilizamos a câmara de vidro (38 cm de comprimento, 60 cm de largura e 44 cm de altura) construída para o modelo original. No interior da câmara o calor úmido foi mantido por banho-maria, ajustado para temperatura entre 37 – 38°C.

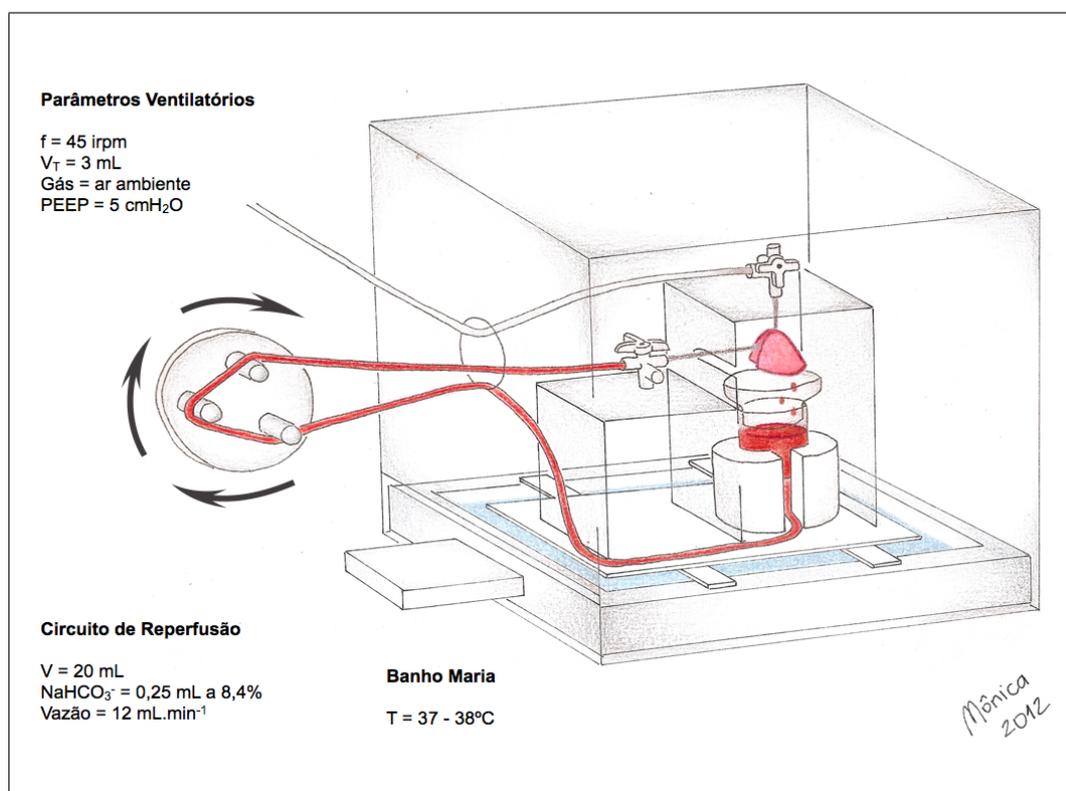


Figura 4: Adaptação do modelo de reperfusão pulmão-para-pulmão *ex-vivo* descrito por DeCampos e colaboradores em 1996. f : frequência respiratória; V_T : volume corrente; PEEP: pressão positiva ao final da expiração; V : volume de sangue; NaHCO_3^- : bicarbonato de sódio; T : temperatura.

O bloco estudado foi devidamente posicionado em seu suporte, e conectado

ao sistema de reperfusão posicionado em mesmo nível do bloco estudado (Nutri-mat II, B. Braun, Melsungen, AG, Alemanha) e ao ventilador mecânico, onde foi ventilado com volume controlado (Harvard Apparatus 680A, Millis, MA, EUA), disparado a tempo, limitado e ciclado a volume, alimentado com ar ambiente, frequência respiratória de 45 irpm, volume corrente de 3 mL e pressão positiva ao final da expiração de 5 cmH₂O. O circuito foi preenchido com 20 mL de sangue proveniente de dois ratos (um doador do bloco coração-pulmões e outro utilizado exclusivamente para doar sangue). A este volume foi adicionado 0,25 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO₃⁻) a 8,4%, para elevar o pH sanguíneo para a faixa de normalidade (7,35 – 7,45). Antes de reperfundir os pulmões, o sangue circulou (12 mL.min⁻¹) durante dez minutos por *by-pass* localizado entre a cânula da artéria pulmonar e o reservatório de sangue, com intuito de retirar do sistema eventuais bolhas de ar.

3.3.5 Aquisição do sinais

Um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) foi conectado a cânula posicionada na artéria pulmonar do bloco coração-pulmões estudado para registro e medida da pressão arterial pulmonar. O transdutor estava ligado a um polígrafo (7C, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA) onde o sinal foi filtrado e amplificado. Do polígrafo, o sinal seguiu para um módulo condicionador de sinais biológicos (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) e, então, para um conversor analógico-digital de 12 bits (EMG System do

Brasil, São José dos Campos, São Paulo). Em um microcomputador (MacBook, Mac OSX 10.6), com uso do *software* Windaq/Pro (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), o sinal da pressão arterial pulmonar foi registrado e armazenado para posterior análise. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz.

3.3.6 Fixação do tecido hepático e preparo das lâminas

Após a excisão do bloco coração-pulmões, o lobo superior do fígado foi excisado e colocado em recipiente devidamente preenchido com solução de formol tamponado à 10%. Uma vez fixado, o tecido hepático foi processado para cortes histológicos em parafina, com 3 μm de espessura. A coloração utilizada foi de picrossírius⁴⁹ para que, juntamente com a polarização, marcasse as fibras colágenas.

3.3.7 Proporção de volume de fibras colágenas no tecido hepático

A análise da proporção de volume das fibras colágenas no tecido hepático foi feita como descrita por Gundersen,⁵⁰ com um sistema teste coerente e de referência composto por 100 pontos e 50 linhas (comprimento conhecido) conectado à uma das oculares do microscópio óptico (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). De cada lâmina, 25 campos não coincidentes, escolhidos de forma aleatória, foram utilizados para a realização de tal análise. Em cada campo o número de pontos coincidentes com as fibras colágenas foram contados e divididos pelo número de pontos que coincidiram com o tecido hepático.

3.4 Fase 2

3.4.1 Caracterização dos grupos

Os 16 animais foram divididos, de forma aleatória, em 2 grupos:

Controle: composto por 8 ratos que foram submetidos à laparotomia mediana, tiveram a veia porta e fígado manipulados e seus abdômen suturados. As variáveis ventilatórias em ventilação espontânea, as propriedades resistiva, elástica e viscoelástica dos pulmões, parede torácica e sistema respiratório, a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar e nas artérias pulmonares foram estudadas nos 8 animais. Todas as medidas foram realizadas 2 semanas após a realização do protocolo experimental.

LVP: composto por 8 ratos que foram submetidos à laparotomia mediana e ligadura parcial da veia porta. As variáveis ventilatórias em ventilação espontânea, as propriedades resistiva, elástica e viscoelástica dos pulmões, parede torácica e sistema respiratório, a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar e nas artérias pulmonares foram estudadas nos 8 animais. Todas as medidas foram realizadas 2 semanas após a realização do protocolo experimental.

3.4.2 Protocolo experimental

Nesta fase do estudo, o protocolo utilizado foi o mesmo descrito no item 3.3.2.

3.4.3 Variáveis ventilatórias

Durante a ventilação espontânea, que antecedia a ventilação artificial (dez minutos) para medida das propriedades mecânica passivas do sistema respiratório, a duração da inspiração (T_I), da expiração (T_E) e do ciclo ventilatório (T_{tot}) foram medidas por meio da análise do sinal do fluxo aéreo,⁵¹ conforme registro ilustrado na figura 5. Utilizando estas variáveis, a relação entre o tempo inspiratório e o tempo total (T_I/T_{tot}), o fluxo inspiratório médio (V_T/T_I), a frequência ventilatória e o volume minuto foram calculados.

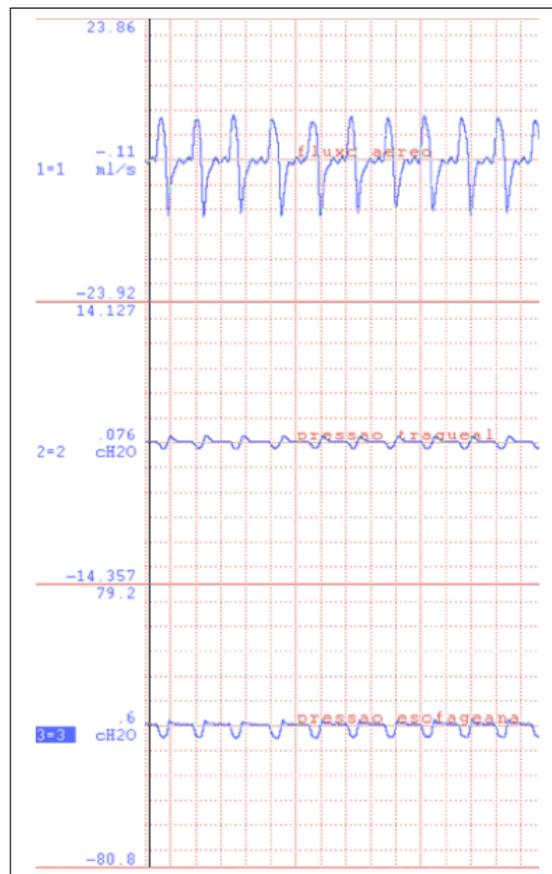


Figura 5: De cima para baixo: fluxo aéreo, pressão traqueal e pressão esofágica durante ventilação espontânea. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz. Cada quadrado de tempo equivale a 0,54s.

3.4.4 Análise das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório

Para o estudo das propriedades mecânicas do sistema respiratório e de seus componentes, pulmões e parede torácica, os animais foram anestesiados com (ketamina 75 mg.kg^{-1} i.p.) e xilazina (10 mg.kg^{-1} i.p.), traqueostomizados e canulados. Os animais foram paralisados totalmente com administração de brometo de pancurônio ($5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ i.v.) e, então, ventilados mecanicamente, sem pressão positiva ao final da expiração, com fluxo constante de 10 mL.s^{-1} e volume corrente de 2 mL.

Muito embora tenhamos modelos bastante simples para a aferição da mecânica do sistema respiratório, como o modelo unicompartmental proposto por Otis,⁵² precisamos utilizar um modelo que explicasse alguns fenômenos observados no sistema respiratório como a queda lenta da pressão ao longo da via aérea do animal quando da oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração (figura 1). Logo, o método de oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração, proposto por Bates e colaboradores²⁸ foi utilizado para determinação das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório e de seus componentes, haja vista utilizarmos um ventilador mecânico que possuía um dispositivo de oclusão rápida das vias aéreas (tempo de fechamento das vias aéreas inferior a 10 ms). Uma cânula de polietileno foi introduzida no esôfago dos animais para decomposição do sistema respiratório em pulmões e parede torácica.⁵³ A cânula introduzida no esôfago foi posicionada de modo a captar, em uma manobra de oclusão ao final da expiração, oscilações pressóricas similares às observadas na via aérea.

Essa mensuração nos permite inferir a oscilação da pressão pleural, que por sua vez possibilita a decomposição do sistema respiratório em pulmões e parede torácica.⁵³ Dessa forma permite avaliar as possíveis alterações mecânicas destes compartimentos, isoladamente, decorrentes da ligadura parcial da veia porta.

Quando ventilado mecanicamente com fluxo inspiratório constante e volume controlado^{54,55} e submetido a oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração, observa-se, no traçado de pressão em função do tempo, uma queda rápida de pressão ($\Delta P1$) de um ponto máximo ($P_{m\acute{a}x}$) até um ponto de inflexão (P_i), seguida de uma queda lenta ($\Delta P2$) até o ponto em que seja atingido o platô pressórico (P_{el}). A queda rápida representa a dissipação de energia para vencer as resistências newtonianas das vias aéreas e dos pulmões, a queda lenta representa a dissipação de energia nos componente viscoelásticos e inomogeneidades de constante de tempo,⁵⁶ e o platô representa a pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}).

Sustentado pela premissa deste modelo, a queda rápida de pressão resultante da oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração pode ser explicada pela característica do componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório, a ausência de desigualdades da constante de tempo. Já a queda lenta observada na sequência da oclusão das vias aéreas, pode ser explicada pelas características do componente viscoelástico e inomogeneidade do sistema respiratório, o *stress relaxation* e *pendelluft*.^{28,56} O *stress relaxation* é a propriedade da matéria de se adaptar a um estiramento mantido, mostrando queda da tensão tecidual em

função do tempo. Uma vez que os pulmões são insuflados e, em seguida, há oclusão rápida das vias aéreas, o volume insuflado é mantido aprisionado nos pulmões. No entanto, a pressão gerada por este volume cai progressivamente até que ocorra um equilíbrio na relação comprimento-tensão. Já o *pendelluft* é a redistribuição regional de pequenos volumes de gás de áreas de maior pressão para áreas de menor pressão, explicadas pelas diferentes constantes de tempo.

Foram realizadas 10 manobras de oclusão (figura 6) das vias aéreas para cada rato e, ao término, ainda em ventilação mecânica, os animais foram eutanasiados com administração, via endovenosa, de 2 mmol.kg⁻¹ de cloreto de potássio.

As variáveis mecânicas calculadas foram:

ΔP_1 Dissipação de energia no componente resistivo (cmH₂O);

$$\Delta P_1 = P_{max} - P_i$$

ΔP_2 Dissipação de energia no componente viscoelástico (cmH₂O);

$$\Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

ΔP_{tot} Dissipação total de energia (cmH₂O);

$$\Delta P_{tot} = P_{max} - P_{el}$$

E_{st} Elastância estática (cmH₂O.mL⁻¹);

$$E_{st} = \frac{P_{el} - PEEP}{V}$$

E_{dyn} Elastância dinâmica (cmH₂O.mL⁻¹);

$$E_{dyn} = \frac{P_i - PEEP}{V}$$

R Resistência (cmH₂O.mL.s⁻¹);

$$R = \frac{\Delta P1}{\dot{V}}$$

3.4.5 Aquisição do sinais

Um pneumotacógrafo, construído segundo Mortola e Noworaj,⁵⁷ ligado a um transdutor diferencial de pressão (PT5A, Grass, Quincy, MA, EUA) foi conectado à saída do ventilador mecânico para registro e medida do fluxo aéreo e, por integração eletrônica deste sinal, calculamos o volume. Proximalmente ao ventilador e antes do pneumotacógrafo, uma saída lateral estava conectada a um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) para registro e medida da pressão na abertura da via aérea. Um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA) foi conectado a uma cânula (P200, com orifício na extremidade distal) posicionada no esôfago do animal para registro e medida da pressão esofageana. Todos os registros foram feitos conforme já descrito no item 3.3.5.

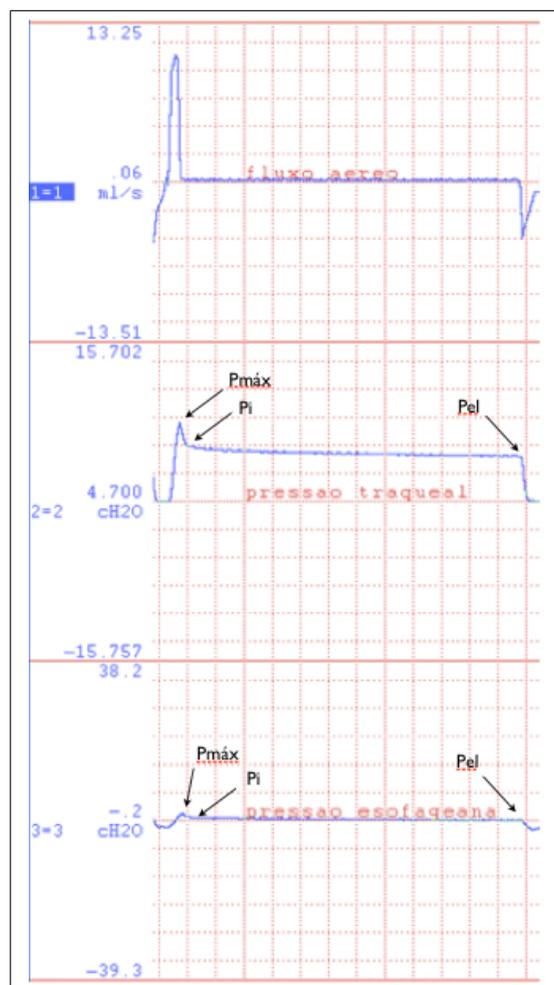


Figura 6: De cima para baixo: traçados representativos de fluxo aéreo, pressão traqueal e pressão esofageana durante manobra de oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração. A frequência de amostragem utilizada foi de 200 Hz. P_{max} : pressão máxima; P_i : pressão no ponto de inflexão; P_{el} : pressão elástica. Cada quadrado de tempo equivale a 0,54s.

3.4.6 Fixação dos pulmões e do tecido hepático e preparo das lâminas

Após a eutanásia dos animais, a via aérea de cada rato foi ocluída ao final da expiração, e posteriormente o bloco coração-pulmões foi excisado e imediatamente colocado em recipiente devidamente preenchido com solução de formol tamponado. Uma vez fixados, os tecidos pulmonares foram processados para cortes histológicos em parafina e corados com picrossírius para, junto a polarização,

marcar as fibras colágenas, e resorcina fucsina de Weigert com oxidação⁵⁸ para marcar as fibras elásticas. O tecido hepático foi processado conforme já descrito no item 3.3.6.

3.4.7 Proporção de volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar, artérias pulmonares e tecido hepático

A análise da proporção de volume das fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar, artérias pulmonares e tecido hepático foi feita como descrita por Gundersen,⁵⁰ com um sistema teste coerente e de referência composto por 100 pontos e 50 linhas (comprimento conhecido) conectado à uma das oculares do microscópio óptico (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). De cada lâmina, 25 campos não coincidentes, escolhidos de forma aleatória, foram utilizados para a realização de tal análise. Em cada campo o número de pontos coincidentes com as fibras colágenas ou elásticas foram contados e divididos pelo número de pontos que coincidiram com o parênquima pulmonar, artérias pulmonares e tecido hepático.

3.5 Análise estatística

Os resultados estão apresentados em valores de média mais e menos desvio padrão (média \pm desvio padrão). O tamanho da amostra foi calculado considerando-se: (i) teste t de *student* para amostras independentes; (ii) 2 grupos; (iii) erro tipo I = 5%; (iv) erro tipo II = 20%; (v) poder do teste estatístico = 80%; e (vi) tamanho do efeito = 90%. Com estes parâmetros ficou determinado que o número total

de animais para cada fase do presente estudo é de 16 (dezesesseis), ou seja, 8 (oito) em cada grupo. Este cálculo foi realizado com auxílio do programa G*Power 3, versão para Mac OsX. Ao final do estudo, os 2 grupos (fase 1 e fase 2) tiveram a normalidade da distribuição de frequências testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. As variáveis foram testadas por meio do teste t de *student* para amostras independentes, considerando-se o erro tipo I igual ao utilizado para o cálculo do tamanho amostral.

4 Resultados

4.1 Fase 1

Nessa fase observamos a pressão arterial pulmonar 245% maior no grupo LVP (CTRL: $53,3 \pm 1,06$ cmH₂O, LVP: $183,2 \pm 8,48$ cmH₂O; $p < 0,0001$). Quando estudada a proporção de volume de fibras colágenas no tecido hepático não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTRL e LVP (CTRL: $0,92 \pm 0,18$, LVP: $0,97 \pm 0,16$; $p = 0,83$). Estes resultados nos permitem visualizar um grande aumento na pressão arterial pulmonar, sem alteração no tecido hepático, garantindo que o modelo proposto foi capaz de gerar hipertensão arterial pulmonar.

4.2 Fase 2

Já nessa fase podemos separar os resultados em três partes: (i) medidas das variáveis ventilatórias; (ii) medida das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório; e (iii) análise morfométrica do tecido pulmonar e das artérias pulmonares.

4.2.1 Medidas das variáveis ventilatórias

Na medida das variáveis ventilatórias observamos no grupo LVP em relação ao grupo controle: queda de 17% no volume corrente ($p = 0,003$); aumento de 47% do tempo inspiratório ($p < 0,0001$); queda de 24% na frequência respiratória ($p < 0,0001$); queda de 37% no volume minuto ($p < 0,0001$); aumento de 30% no

tempo total do ciclo ventilatório ($p < 0,0001$); queda de 44% no fluxo inspiratório médio ($p < 0,0001$); e aumento de 13% na relação entre o tempo inspiratório e o tempo total do ciclo ventilatório ($p = 0,0005$). Esses resultados estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Medidas das variáveis ventilatórias durante ventilação espontânea.

Variável	CTRL	LVP	p valor
Volume corrente (mL)	$1,3 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,04$	0,003
T_I (s)	$0,26 \pm 0,004$	$0,39 \pm 0,003$	$< 0,0001$
Frequência respiratória (irpm)	$105,3 \pm 0,74$	$80,7 \pm 0,81$	$< 0,0001$
Volume minuto ($\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$)	$140,4 \pm 3,75$	$89,5 \pm 2,32$	$< 0,0001$
T_{tot} (s)	$0,57 \pm 0,004$	$0,74 \pm 0,007$	$< 0,0001$
V_T/T_I ($\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$)	$5,1 \pm 0,11$	$2,9 \pm 0,13$	$< 0,0001$
T_I/T_{tot} (s)	$0,46 \pm 0,005$	$0,52 \pm 0,009$	0,0005

Valores em média \pm desvio padrão. CTRL: grupo controle; LVP: grupo ligadura parcial da veia porta; T_I : tempo inspiratório; T_{tot} : tempo total do ciclo ventilatório; V_T/T_I : fluxo inspiratório médio; T_I/T_{tot} : relação do tempo inspiratório e o tempo total do ciclo ventilatório.

4.2.2 Medida das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório

Nas propriedades mecânicas do sistema respiratório observamos no grupo LVP em relação ao grupo controle: aumento de 9% no $\Delta P2$ ($p = 0,016$); aumento de 11% na E_{st} ($p = 0,0008$); e aumento de 10% na E_{dyn} ($p = 0,0001$). Nos pulmões observamos: aumento de 45% no $\Delta P2$ ($p = 0,04$); aumento de 24% na E_{st} ($p = 0,0001$); e aumento de 26% na E_{dyn} ($p < 0,0001$). E na parede torácica observamos: aumento de 53% no $\Delta P1$ ($p < 0,0001$); e aumento de 52% na R ($p < 0,0001$). Os resultados das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório e seus componentes podem ser vistos na tabela 2.

Tabela 2: Medidas das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório, pulmões e parede torácica.

Variável	CTRL	LVP	<i>p</i> valor
Fluxo aéreo (mL.s ⁻¹)	10,1 ± 0,07	10,0 ± 0,09	0,11
Volume corrente (mL)	2,02 ± 0,03	2,03 ± 0,10	0,12
<i>Sistema Respiratório</i>			
ΔP1 (cmH ₂ O)	2,26 ± 0,14	2,51 ± 0,10	0,19
ΔP2 (cmH ₂ O)	1,22 ± 0,03	1,33 ± 0,02	0,016
ΔP _{tot} (cmH ₂ O)	3,49 ± 0,15	3,84 ± 0,08	0,06
E _{st} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	2,76 ± 0,06	3,07 ± 0,02	0,0008
E _{dyn} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	3,36 ± 0,06	3,70 ± 0,01	0,0001
R (cmH ₂ O.mL.s ⁻¹)	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,27
<i>Pulmões</i>			
ΔP1 (cmH ₂ O)	1,84 ± 0,14	1,85 ± 0,10	0,93
ΔP2 (cmH ₂ O)	0,48 ± 0,10	0,70 ± 0,02	0,04
ΔP _{tot} (cmH ₂ O)	2,32 ± 0,16	2,56 ± 0,08	0,20
E _{st} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	1,37 ± 0,05	1,70 ± 0,01	0,0001
E _{dyn} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	1,61 ± 0,07	2,04 ± 0,01	< 0,0001
R (cmH ₂ O.mL.s ⁻¹)	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,95
<i>parede Torácica</i>			
ΔP1 (cmH ₂ O)	0,43 ± 0,02	0,66 ± 0,01	< 0,0001
ΔP2 (cmH ₂ O)	0,73 ± 0,10	0,62 ± 0,01	0,24
ΔP _{tot} (cmH ₂ O)	1,16 ± 0,08	1,28 ± 0,01	0,16
E _{st} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	1,39 ± 0,02	1,37 ± 0,01	0,24
E _{dyn} (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	1,75 ± 0,04	1,67 ± 0,01	0,07
R (cmH ₂ O.mL.s ⁻¹)	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	< 0,0001

Valores em média ± desvio padrão. CTRL: grupo controle; LVP: grupo ligadura parcial da veia porta; ΔP1: dissipação de energia no componente resistivo; ΔP2: dissipação de energia no componente viscoelástico; ΔP_{tot}: dissipação total de energia; E_{st}: elastância estática; E_{dyn}: elastância dinâmica; R: resistência.

4.2.3 Análise morfométrica do parênquima pulmonar e artéria pulmonar

Na análise morfométrica do parênquima pulmonar, observamos um incremento de 31,19% na proporção de fibras elásticas ($p < 0,0001$) no grupo LVP

quando comparado ao grupo controle, no entanto não houve diferença entre os grupos quando analisada a proporção de fibras colágenas. Ao analisar morfo-metricamente, as artérias pulmonares, observamos um incremento de 23,36% e 25,66% na proporção de fibras elásticas ($p < 0,0001$) e colágenas ($p < 0,0001$), respectivamente, do grupo LVP em relação ao grupo controle, como mostrado na tabela 3 e ilustrado na figura 7. Estes resultados ratificam os achados das medidas da mecânica respiratória, bem como das variáveis ventilatórias.

Tabela 3: Análise morfométrica dos tecidos pulmonar e artéria pulmonar.

Variável	CTRL	LVP	p valor
<i>Parênquima Pulmonar</i>			
fibras elásticas (%)	33,44 ± 1,16	43,87 ± 3,72	< 0,0001
fibras colágenas (%)	34,60 ± 1,92	35,25 ± 3,15	0,63
<i>Artéria Pulmonar</i>			
fibras elásticas (%)	51,24 ± 1,65	63,21 ± 3,57	< 0,0001
fibras colágenas (%)	63,48 ± 3,07	79,77 ± 3,22	< 0,0001

Valores em média ± desvio padrão. CTRL: grupo controle; LVP: grupo ligadura parcial da veia porta.

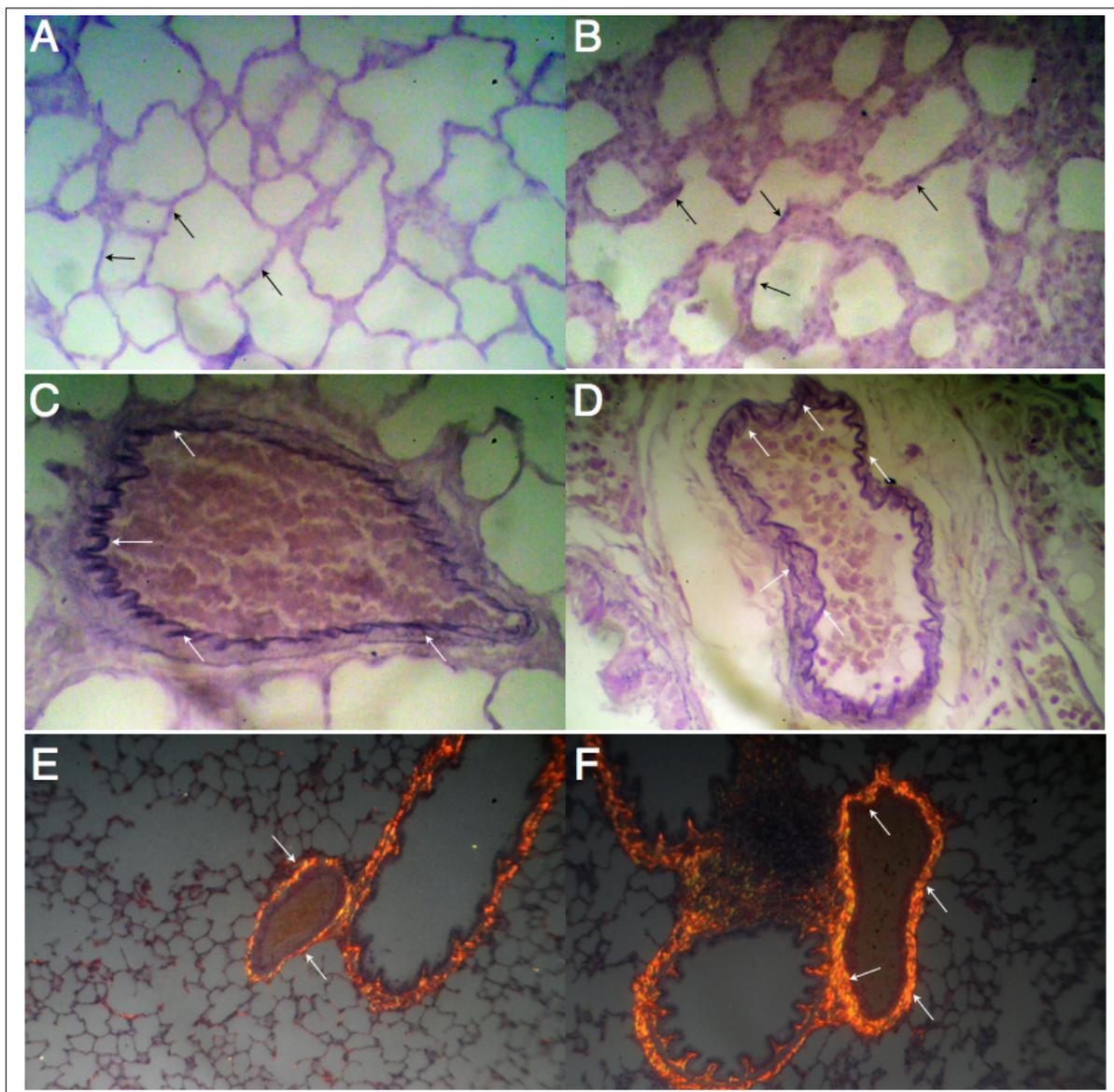


Figura 7: Fotomicrografias do parênquima pulmonar corado com resorcina fucsina de Weigert com oxidação para marcação das fibras elásticas no grupo controle (A) e no grupo LVP (B); fotomicrografia das artérias pulmonares coradas com resorcina fucsina de Weigert com oxidação para marcação das fibras elásticas no grupo controle (C) e no grupo LVP (D); fotomicrografia das artérias pulmonares coradas com picrossírius com polarização para marcação das fibras colágenas no grupo controle (E) e no grupo LVP (F). Nas fotomicrografias A, B, C e D as setas apontam fibras elásticas (marcadas em preto) em um aumento de 1000 X; nas fotomicrografias E e F as setas apontam as fibras colágenas (marcadas em tonalidade alaranjada brilhante) em um aumento de 400 X.

5 Discussão

O principal objetivo do presente estudo foi de investigar possíveis alterações nas propriedades mecânicas do sistema respiratório, pulmões e parede torácica em um modelo experimental capaz de reproduzir a hipertensão portopulmonar. Os resultados obtidos com esta investigação nos permite acrescentar novas evidências no que tange a fisiopatologia das complicações pulmonares originadas por doenças hepáticas, neste caso, a hipertensão portopulmonar.

5.1 Fase 1

Ainda que o modelo fosse capaz de mimetizar remodelamento vascular pulmonar, nesta fase, o propósito foi de garantir que o modelo experimental reproduziria a hipertensão portopulmonar presente em indivíduos com doenças hepáticas crônicas,⁶ observamos de fato um incremento importante (245%) na pressão arterial pulmonar, o que nos mostra ser eficaz o modelo.⁴⁶ Quando analisamos a proporção e fibras colágenas no tecido hepático não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, o que vai de encontro ao resultado obtido por Melo-Silva e colaboradores em 2011³ quando investigou o impacto da síndrome hepatopulmonar nas propriedades mecânicas do sistema respiratório e na morfologia pulmonar. Melo-Silva e colaboradores encontraram uma proporção de fibras colágenas aumentada no grupo experimental quando comparado ao grupo controle. O que pode explicar tal diferença é o modelo experimental utilizado, pois no presente estudo foi utilizado um modelo onde a intervenção foi na veia porta e em região

pré-hepática, enquanto no modelo utilizado por Melo-Silva a intervenção foi de ligadura completa do ducto colédoco.

Ao analisarmos as proporções de fibras colágenas e elásticas nas artérias pulmonares obtidos na fase 2 deste estudo houve um incremento significativo no grupo experimental quando comparado ao grupo controle (25,66% e 23,36%, respectivamente). Este resultado, portanto, ratifica o fato de termos encontrado uma pressão arterial pulmonar aumentada no grupo experimental. Muito embora o remodelamento da parede das artérias pulmonares contribua para o aumento da pressão arterial pulmonar, esta, possivelmente, não seja a única explicação de tal aumento, haja vista existir evidências da participação de citocinas,⁸ fatores de crescimento⁹ e até mesmo uma possível falha no mecanismo vasodilatador promovido pela ação do óxido nítrico⁵⁹ na gênese das alterações vasculares pulmonares encontradas em pacientes com doenças hepáticas.

5.2 Fase 2

Na segunda etapa do presente estudo o propósito foi de investigar o possível efeito da hipertensão portopulmonar mimetizada em ratos nas propriedades mecânicas do sistema respiratório. Diante dos resultados obtidos nesse estudo podemos compreender com argumentos mais robustos as alterações clínicas observadas nos indivíduos com hipertensão portopulmonar, onde a *performance* mecânica do sistema respiratório sofre impacto negativo de origem circulatória.

O modelo experimental de hipertensão portopulmonar foi capaz de pro-

duzir alterações significantes no padrão ventilatório dos animais estudados, bem como provocou perturbações de cunho mecânico, aumentando a impedância da parede torácica e as heterogeneidades pulmonares, e induzindo o remodelamento em parênquima e vasculatura pulmonares.

Na literatura não temos estudos que investigam a mecânica do sistema respiratório em modelo experimental de hipertensão portopulmonar, no entanto Melo-Silva e colaboradores em 2011³ publicaram um estudo onde investigaram os efeitos da síndrome hepatopulmonar nas propriedades mecânicas do sistema respiratório. Estudo este que, muito embora utilize um modelo experimental diferente do apresentado no presente trabalho, apresentou resultados que são compatíveis com as repercussões pulmonares observadas em indivíduos com doenças hepáticas.

Em nosso trabalho utilizamos o método da oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração²⁸ para acessar as informações mecânicas passivas do sistema respiratório, bem como de seus dois componentes, pulmões e parede torácica, o que foi possível graças a utilização de um cateter esofageano. Por meio deste método e do uso do cateter esofageano pudemos aferir as propriedades resistivas, viscoelásticas e elásticas do sistema respiratório, pulmões e parede torácica.

Para a medida das propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório não houve diferença nas variáveis de fluxo aéreo ($p = 0,11$) e volume corrente ($p = 0,12$), tabela 2, nos garantindo que quaisquer alterações encontradas no sistema respiratório e seus componentes não se deveram a inhomogeneidades da ventilação mecânica, e sim à alterações estruturais.

Tanto a mecânica dos pulmões quanto a da parede torácica apresentaram alterações, a primeira com aumento das cargas viscoelástica (ΔP_2) e elástica (E_{st} e E_{dyn}), e a segunda com aumento da carga resistiva (ΔP_1 e R). Como o sistema respiratório compreende a interação biomecânica dos pulmões com a parede torácica, predominou o aumento das cargas viscoelástica e elástica de modo que a variação de pressão no componente viscoelástico como as elastâncias estática e dinâmica se alteraram no sistema respiratório.

As alterações encontradas nos componentes viscoelástico e elástico podem ser explicadas (tomando os resultados do presente estudo) por três mecanismos: (i) impacto hemodinâmico; (ii) remodelamento parenquimatoso dos pulmões; e (iii) remodelamento das artérias pulmonares.⁶⁰

A hipertensão pulmonar causada pelo modelo utilizado impactou no aumento das inomogeneidades mecânicas nos pulmões, aumento das inomogeneidades das constantes de tempo, bem como no aumento do *stress-relaxation*. Tomando informações que datam da década de 1960²² fica claro que de fato a pressão arterial pulmonar aumentada é capaz de desestabilizar a arquitetura alveolar de modo a perturbar a *performance* mecânica dos pulmões, ou por provocar alterações na forma dos alvéolos, ou por torná-los congestos. Paralelamente a isso, temos que situações em que o parênquima pulmonar está desestabilizado, causando algum grau de inflamação local (não avaliamos inflamação tecidual), é possível que tenhamos anormalidades na atividade dos pneumócitos do tipo II e, portanto, alguma deficiência na atividade do surfactante,⁶¹ o que certamente provocaria o

aumento das inomogeneidades mecânicas do parênquima pulmonar, bem como as inomogeneidades de constantes de tempo e *stress-relaxation* representadas pelo ΔP_2 .

Mesmo sendo parte das alterações mecânicas atribuídas às variações de pressão dentro do leito vascular pulmonar, também sabemos que a qualidade da estrutura parenquimatosa é capaz de produzir diferenças nas propriedades mecânicas dos pulmões.⁶⁰ No presente estudo tivemos um aumento da proporção de volume de fibras elásticas no parênquima pulmonar, sugerindo remodelamento parenquimatoso, o que certamente representou um aumento no grau de retração elástica pulmonar e que refletiu no aumento das E_{st} e E_{dyn} .

Corroborando para as repercussões mecânicas avaliadas no presente estudo observamos aumento da proporção das fibras elásticas e colágenas nas artérias pulmonares, o que sugere remodelamento no leito vascular pulmonar e justifica o aumento da resistência vascular pulmonar e provoca o aumento da pressão arterial pulmonar. É possível que o modelo utilizado produza algum grau de inflamação no leito vascular pulmonar, certamente provocando uma resposta à inflamação que, não sendo resolvida potencializaria um mecanismo de retroalimentação positiva e assim nova formação vascular.⁶²

Muito embora as propriedades mecânicas do sistema respiratório estarem bastante influenciadas pelas alterações mecânicas pulmonares, observamos que mecanicamente a parede torácica também apresentou alterações, no entanto no que diz respeito à energia dissipada no componente resistivo. Mesmo não tendo

sido investigadas características da parede torácica, é plausível supor que a execução do modelo experimental, modelo pré-hepático de hipertensão portopulmonar, tenha causado algum aumento de volume abdominal, o que certamente poderia explicar o aumento de $\Delta P1$ e R observadas na mecânica da parede torácica. É sabido que mudanças na forma ou volume do conteúdo toracoabdominal provoca aumento de gasto energético no componente resistivo da parede torácica.^{63,64}

Além das informações supracitadas, a avaliação das variáveis ventilatórias também pode ratificar as repercussões mecânicas do sistema respiratório à hipertensão portopulmonar. Observamos que houve alteração em todas as variáveis ventilatórias estudadas. É possível que o aumento da impedância da parede torácica tenha corroborado para a diminuição do volume corrente e do volume minuto dos animais do grupo LVP, bem como a diminuição do fluxo inspiratório médio.⁶⁵

Leduc e De Troyer, em 2007,⁶⁵ estudaram o efeito do aumento do volume abdominal em cães sob a resposta ventilatória e verificaram que o aumento do volume abdominal provocou um deslocamento cranial do diafragma, bem como um aumento no seu comprimento quando relaxado, que por sua vez corroborou com o aumento da elastância da parede torácica. Paralelamente ao aumento da elastância da parede torácica, e em consonância com o presente estudo, o efeito depressor do anestésico utilizado pode também reduzir o impulso ventilatório, de modo a contribuir com a diminuição do volume corrente.

A carga mecânica imposta ao sistema respiratório diante da hipertensão portopulmonar cria uma nova demanda ventilatória que precisa ser ajustada pelo

controlador central, no entanto pode não ser a única responsável pelas alterações observadas.⁶⁵ A queda da frequência respiratória pode ser atribuída a necessidade de aumentar o tempo inspiratório como tentativa de garantir o volume minuto adequado diante de uma carga mecânica aumentada.

Dessa forma, temos evidências morfológicas, ventilatórias e mecânicas de que a hipertensão portopulmonar é potencial causadora de desarranjo na arquitetura do parênquima pulmonar implicando em déficit nas propriedades mecânicas passivas do sistema respiratório.

6 Limitações do Estudo

Possíveis aspectos não investigados nesse estudo podem ter contribuído para o resultado. Como no desenho original do estudo a avaliação dos aspectos que seguem não estava prevista, preferimos manter a fidelidade ao projeto proposto e levantar tais aspectos como possíveis limitações do estudo. São eles:

1. Os animais não tiveram o volume abdominal mensurado, portanto, possível presença de ascite pode ter interferido na carga mecânica da parede torácica, muito embora não tenha sido observado qualquer suspeita de ascite (inclusive ao acessar o conteúdo abdominal);
2. Não avaliamos as trocas gasosas pois, em princípio, na síndrome portopulmonar não é característico haver impacto nas trocas gasosas, no entanto, na possível presença dessas alterações poderíamos atribuir parte das respostas ventilatórias encontradas a esta associação das trocas gasosas comprometidas com a depressão anestésica a qual o sistema respiratório do rato estava submetida;
3. Tentamos ratificar os achados mecânicos com os aspectos morfométricos que, no presente estudo, foram as proporções de fibras elásticas e colágenas no parênquima e nas artérias pulmonares, no entanto, podem não ser, do ponto de vista morfométrico, as únicas responsáveis por tais achados, haja vista parecer haver um edema importante no parênquima pulmonar dos animais do grupo LVP, o que não estava previsto no projeto e portanto não foi quan-

tificado;

4. Diante da escassez de estudos explorando os aspectos mecânicos do sistema respiratório de indivíduos e(ou) animais na presença de doenças hepáticas, especialmente na síndrome portopulmonar, grande parte dos achados do presente estudo não puderam ser confrontados com os estudos similares.

7 Conclusões

1. A sobrecarga hemodinâmica induzida pela hipertensão portopulmonar altera o padrão ventilatório espontâneo;
2. A sobrecarga hemodinâmica induzida pela hipertensão portopulmonar altera as propriedades elásticas e viscoelásticas do sistema respiratório e dos pulmões, e altera as propriedades resistivas da parede torácica;
3. A sobrecarga hemodinâmica induzida pela hipertensão portopulmonar provoca remodelamento do parênquima pulmonar e remodelamento das artérias pulmonares.

Referências Bibliográficas

- [1] Fluckiger M. Vorkommen Von Trommelschagel Formigen Fingerendphalangen Ohne Chronische Veranderungen An Der Lungen Oder Am Herzen. *Wien Med Wochenschr*, 34:1497, 1884.
- [2] Kennedy TC and Knudson RJ. Exercise aggregated hypoxemia and orthodeoxia in cirrhosis. *Chest*, 72:305 – 309, 1977.
- [3] Melo-Silva CA, Gaio E, Trevizoli JE, Souza CS, Gonçalves AS, Sousa GCC, Takano G, Tavares P, and Amado VM. Respiratory mechanics and lung tissue remodeling in a hepatopulmonary syndrome rat model. *Respir Physiol Neurobiol*, 179:326 – 333, 2011.
- [4] Palma DT and Fallon MB. The hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol*, 45:617 – 625, 2006.
- [5] Porres-Aguilar M, Zuckerman MJ, Figueroa-Casas JB, and Krowka MJ. Portopulmonary hypertension: state of the art. *Ann Hepatol*, 7:321 – 330, 2008.
- [6] Rudolf ES and Horst O. Portopulmonary hypertension: short review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009.
- [7] Fallon M and Abrams G. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology*, 32:859 – 865, 2000.
- [8] Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, and Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide

-
- synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*, 125:1441 – 1451, 2003.
- [9] Zhang J, Luo B, Tang L, Wang Y, Stockard CR, Kadish I, Van Groen T, Grizzle WE, Ponnazhagan S, and Fallon MB. Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*, 136:1070 – 1080, 2009.
- [10] Spagnolo P, Zeuzem S, Richeldi L, and du Bois RM. The complex interrelationships between chronic lung and liver disease: a review. *J Viral Hepat*, 17:381 – 390, 2010.
- [11] Robalino BD and Moodie DS. Association between primary pulmonary hypertension and portal hypertension: analysis of its pathophysiology and clinical, laboratory and hemodynamic manifestations. *J Am Coll Cardiol*, 17:492 – 498, 1991.
- [12] Laleman W, Omasta A, M Van de Casteele, Zeegers M, Vander Elst I, Van Landeghem L, Severi T, Van Pelt J, Roskams T, Fevery J, and Nevens F. A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology*, 42:1382 – 1390, 2005.
- [13] Lebrec D, Capron JP, Dhumeaux D, and Benhamou JP. Pulmonary hypertension complicating portal hypertension. *Am Rev Respir Dis*, 120:849 – 856, 1979.

-
- [14] Murray JF, Dawson AM, and Sherlock S. Circulatory changes in chronic liver disease. *Am J Med*, 24:358 – 367, 1958.
- [15] Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, and Johns RA. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase i in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 108:1493 – 1498, 2003.
- [16] Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, and Hoepfer MM. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:1414 – 1418, 2005.
- [17] Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA, Soubrier F, Trembath RC, and Chung WK. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54:S32 – S42, 2009.
- [18] Weibel ER, Sapoval B, and Filoche M. Design of peripheral airways for efficient gas exchange. *Respir Physiol Neurobiol*, 148:3 – 21, 2005.
- [19] Peták F, Habre W, Hantos Z, Sly PD, and Morel DR. Effects of pulmonary vascular pressure and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*, 92:169 – 178, 2002.

-
- [20] Freezer NJ, Lanteri CJ, and Sly PD. The effect of pulmonary blood flow on measurement of respiratory mechanics using the interrupter technique. *J Appl Physiol*, 74:1083 – 1088, 1993.
- [21] Ishii M, Matsumoto N, Fukuyi T, Hida W, Ichnose M, and Takashima T. Effects os hemodynamic edema formation with developing pulmonary edema in dogs. *J Appl Physiol*, 59:1578 – 1584, 1985.
- [22] Borst HG, Berglund E, Whittenberger JL, Mead J, McGregor M, and Collier C. The effect of pulmonary vascular pressures on the mechanical properties of the lungs of anesthetized dogs. *J Clin Invest*, 36:1708 – 1714, 1957.
- [23] Gray BA, McCaffree DR, Sivak ED, and McCurdy HT. Effect of pulmonary vascular engorgement on respiratory mechanics in the dog. *J Appl Physiol*, 45:119 – 127, 1978.
- [24] Colebatch HJH, Ng CKY, Berend N, and Maccioni FJ. Effect of the chest wall and blood volume on pulmonary distensibility. *J Appl Physiol*, 72:186 – 193, 1992.
- [25] Simon BA, Tsuzaki K, and Venegas JG. Changes in regional lung mechanics and ventilation distribution after unilateral pulmonary artery occlusion. *J Appl Physiol*, 82:882 – 891, 1997.

-
- [26] Peták F, Babik B, Hantos Z, Morel DR, Pache J, Biton C, Suki B, and Habre W. Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287:L879 – L889, 2004.
- [27] Melo-Silva CA, Carvalho RS, Cagido VR, Zin WA, Tavares P, and DeCampos KN. Influence of lung mechanical properties and alveolar architecture on the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 11:46 – 51, 2010.
- [28] Bates JHT, Rossi A, and Milici-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 58:1840 – 1848, 1985.
- [29] Otis AB, Mckerrow CB, Bartlett RA, Mead J, Mcilroy MB, Selver-Stone NJ, and Radford EP. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. *J Appl Physiol*, 8:427 – 443, 1956.
- [30] Mount LE. The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. *J Physiol*, 127:157 – 167, 1955.
- [31] Zin WA, Pengelly LD, and Milic-Emili J. Partitioning of respiratory mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 54:708 – 713, 1983.
- [32] Sussman N. Portopulmonary hypertension: An update. *Liver Transpl*, 2012.
- [33] Sun XG, Hansen JE, Oudiz RJ, and Wasserman K. Pulmonary function in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 41:1028 – 1035, 2003.

-
- [34] Burke CM, Glanville AR, Morris AJ, Rubin D, Harvey JA, Theodore J, and Robin ED. Pulmonary function in advanced pulmonary hypertension. *Thorax*, 42:131 – 135, 1987.
- [35] Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ, Hervé Ph, Fallon MB, and ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonary-hepatic vascular disorders (phd). *Eur Respir J*, 24:861 – 880, 2004.
- [36] Liu M, Transwell K, and Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*, 277:L667 – L683, 1999.
- [37] Bishop JE, Mitchell JJ, Absher PM, Baldor L, Geller HA, Woodcock-Mitchel J, Vacek P, and Low RB. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3:126 – 133, 1993.
- [38] Leslie CC, McCormick-Shannon K, Mason RJ, and Shannon JM. Proliferation of rat alveolar epithelial cells in low density primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9:64 – 72, 1993.
- [39] Hildebran JN, Goerke J, and Clements JA. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J Appl Physiol*, 51:905 – 910, 1981.
- [40] Dudek SM and Garcia JGN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 1:1487 – 1500, 2001.

-
- [41] Tremblay L, Valenza F, Ribeiro S, Li J, and Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*, 99:944 – 952, 1997.
- [42] Dreyfuss D and Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care*, 157:294 – 323, 1988.
- [43] Lehoux S, Castier Y, and Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med*, 259:381 – 392, 2006.
- [44] Garcia CSNB, Prota LFM, Morales MM, Romero PV, Zin WA, and Rocoo PRM. Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. *Braz J Med Biol Res*, 39:697 – 706, 2006.
- [45] Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch III JP, and Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med*, 55:395 – 417, 2004.
- [46] Schroeder RA, Ewing CA, Sitzmann JV, and Kuo PC. Pulmonary expression of inos and ho-1 protein is upregulated in a rat model of prehepatic portal hypertension. *Dig Dis Sci*, 45:2405 – 2410, 2000.
- [47] Jessen L, Christensen S, and Bjerrum OJ. The antinociceptive efficacy of buprenorphine administered through the drinking water of rats. *Lab Anim*, 41:185 – 196, 2007.

-
- [48] DeCampos KN, Keshavjee SH, Tremblay L, Yamashiro T, and Slutsky AS. Use of a hypoxic lung as a deoxygenator to provide extended assessment of pulmonary function in rats. *J Appl Physiol*, 80:1835 – 1840, 1996.
- [49] Junqueira LCU, Bignolas G, and Brentani RR. Pricossirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 11:447 – 455, 1979.
- [50] Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, and et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:379 – 394, 1988.
- [51] Dias CM, Pássaro CP, Cagido VR, Einicker-Lamas M, Lowe J, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, and Rocco PRM. Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. *J Appl Physiol*, 97:1888 – 1896, 2004.
- [52] Otis AB, Fenn WO, and Rahn H. Mechanics of breathing in man. *J Appl Physiol*, 2:592 – 607, 1950.
- [53] Baydur A, Behrakis PK, Zin WA, Jaeger M, and Milic-Emili J. A simple method for assessing the validity of the esophageal balloon technique. *Am Rev Respir Dis*, 126:788 – 791, 1982.

-
- [54] Kochi T, Okubo S, Zin WA, and Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 64:441 – 450, 1988.
- [55] Kochi T, Okubo S, Zin WA, and Milic-Emili J. Chest wall and respiratory mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol*, 64:2636 – 2646, 1988.
- [56] Bates JHT, Ludwig MS, Sly PD, Brown KA, Marting JG, and Fredberg JJ. Interrupter resistance elucidate by alveolar pressure measurements in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol*, 65:408 – 414, 1988.
- [57] Mortola JP and Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 55:250 – 253, 1983.
- [58] Vieira RP, Andrade VF, Duarte ACS, Dos Santos ABG, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff, and Carvalho CRF. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295:L670 – L679, 2008.
- [59] Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, Zerbib E, Dulmet E, Moreau R, Dinh-Xuan AT, Simonneau G, and Hervé P. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 164:879 – 885, 2001.

- [60] Changqing MA, Crippin JS, Chapman WC, Korenblat K, Vachharajani N, Gunter KL, and Brunt EM. Parenchymal alterations in cirrhotic livers in patients with hepatopulmonary syndrome or portopulmonary hypertension. *Liver Transpl*, 19:741 – 750, 2013.
- [61] Winkler C and Hohlfeld JM. Surfactant and allergic airway inflammation. *Swiss Med Wkly*, 143:w13818, 2013.
- [62] Arroyo AG and Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*, 86:226 – 235, 2010.
- [63] Moreira LF, Gobbi CF, Feijóo M, Rocco PR, and Zin WA. Respiratory mechanics and morphometric changes during pneumoperitoneum in normal rats. *Eur Respir J*, 10:1321 – 1326, 1997.
- [64] Mutoh T, Lamm WJ, Embree LJ, Hildebrandt J, and Albert RK. Abdominal distension alters regional pleural pressures and chest wall mechanics in pigs in vivo. *J Appl Physiol*, 70:2611 – 2618, 1991.
- [65] Leduc D and De Troyer A. Dysfunction of the canine respiratory muscle pump in ascites. *J Appl Physiol*, 102:650 – 657, 2007.