



Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

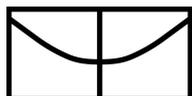
**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO
DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR E SEPSE**

KARLA ANDRÉIA MÊTTE WALDRICH TAUIL

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a VERONICA MOREIRA AMADO

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO VENTURA GAIO
DOS SANTOS**

Brasília-2014



Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SEPSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Mestranda: Karla A Mêtte Waldrich Tauil

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Veronica M Amado

Brasília-2014



Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO DE RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SEPSE

KARLA ANDRÉIA MÊTTE WALDRICH TAUIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em 24 de julho de 2014.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Carlos Alberto de Assis Viegas

Prof. Dr. Rodrigo Storek Carvalho

Prof. Dr. Sergio Leite Rodrigues

Brasília-2014

DEDICATÓRIA

À minha família, com imenso amor.

AGRADECIMENTO

Apesar do processo solitário ao qual qualquer pesquisador está destinado ao escrever sua dissertação, ele, na verdade, nunca está só. Há pessoas que colaboraram com sua elaboração de tal forma que preciso creditar um pouco do melhor resultado, a elas:

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Veronica Moreira Amado, com quem aprendi muito (e ainda tão pouco) sobre Hipertensão Pulmonar, por sua determinação, olhando à frente, sempre com perspectivas positivas e oferecendo seu melhor. Agradeço pelo encorajamento frente aos desafios e à confiança que depositou em mim. Espero, sinceramente, que possa se orgulhar deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Carlos Eduardo Ventura Gaio, pela constante demonstração de sabedoria e humildade, por me abrir as portas do laboratório e pela pronta disposição em ajudar mesmo a quilômetros de distância.

Aos meus filhos, Pedro e Maria Clara, e ao meu esposo Carlos, pela paciência, por todas as horas de convívio que lhes foram roubadas e por este amor verdadeiro que me dá força e esperança todos os dias da minha vida.

À colega que se tornou uma grande amiga ao longo desta caminhada, com toda sua generosidade e companheirismo : Glaciele, conte sempre comigo!

Ao Sr. “Dedé”, por toda ajuda no cuidado com os animais e pela companhia durante as muitas horas que passei no laboratório. À equipe do HVET pela acolhida e pela colaboração na preparação do material histológico e à equipe do Gtox-IB por facilitar a análise morfométrica! Muito obrigada!

Agradeço a Deus por colocar todas essas pessoas tão caprichosamente na minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Mestre, Prof. Dr. César Augusto Melo e Silva, meu mentor intelectual, a quem eu devo o gosto pela ciência e, em especial, pela pesquisa experimental. Agradeço pela incomensurável contribuição dada a este estudo. Mesmo sem qualquer obrigação em fazê-lo, solucionou dúvidas prontamente, apontou falhas, indicou o caminho para a resolução dos problemas e acima de tudo, questionou, para ensinar o que é ciência verdadeiramente. Agradeço por seu apoio, sua dedicação, amizade, clareza, rigor, disponibilidade e por tudo o que representa para mim como profissional e ser humano. Sem este apoio, eu não teria cumprido mais esta importante etapa em minha vida. Conte sempre comigo!

Muito obrigada!!!

“ Depois de escalar um grande morro, só se
descobre que há muitas mais montanhas
para escalar”

Nelson Mandela

RESUMO

Introdução: A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) está associada a alterações celulares e estruturais da vasculatura pulmonar. A disfunção endotelial promove vasoconstrição, proliferação do músculo liso, das células endoteliais da íntima, lesões plexiforme angioproliferativas, e trombose *in situ*, bem como, aumenta a rigidez e resistência vascular arterial pulmonar. A sepse é uma síndrome complexa sistêmica e de origem infecciosa. A associação entre HAP e sepse potencializa o consumo metabólico de oxigênio e o desequilíbrio na oferta, com o risco de mortalidade muito elevada. **Métodos:** Neste estudo foram utilizados 44 ratos machos adultos, da raça Wistar. Todos os animais foram randomizados e distribuídos em quatro grupos: Controle (CTRL), Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), Sepse (SPS) e Hipertensão Arterial Pulmonar associada à Sepse (HPSPS). Deste total, 32 animais foram submetidos à análise das propriedades mecânicas e análise morfométrica dos vasos pulmonares no 28º dia do experimento, enquanto 12 animais foram submetidos à hemodinâmica para confirmação da ocorrência de HAP. **Resultados:** A dissipação de energia no componente viscoelástico aumentou significativamente em pulmões de ratos com HAP (0,94 cmH₂O ±0,1), sepse (0,95 cmH₂O ±0,1) e na associação entre HAP e sepse (1,39 cmH₂O ±0,1) quando comparados ao grupo CTRL (0,37 cmH₂O ±0,1). A variável $\Delta P_{tot,L}$ aumentou significativamente no grupo HAP (1,75 cmH₂O ±0,1) e HPSPS (2,12 cmH₂O ±0,1). $\Delta P_{2,sr}$ (1,97 cmH₂O ± 0,1) e $E_{dyn,sr}$ (4,80 cmH₂O.ml⁻¹ ± 0,2) aumentaram significativamente no sistema respiratório de ratos do grupo HPSPS; $E_{st,sr}$ (4,02 cmH₂O.ml⁻¹ ± 0,3) aumentou significativamente no sistema respiratório de ratos com HAP. Não houve variações significativas no componente viscoso do sistema respiratório e de seus componentes, pulmão e parede torácica. A proporção de fibras colágenas aumentou significativamente em vasos pulmonares de ratos do grupo HAP (164% ± 67) e HPSPS (191% ±57) quando comparados ao grupo CTRL (69% ± 30) e ao grupo SPS (80% ±30). O remodelamento da parede vascular pulmonar foi significativamente maior nos vasos pulmonares de ratos do grupo HAP (25,8 µm ± 5) e HPSPS (33,6 µm ±8,1).

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Pulmonar, inflamação, sepse, trombose, mecânica respiratória.

ABSTRACT

Introduction: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is associated to cellular and structural alterations of lung vasculature. Endothelial dysfunction promotes vasoconstriction, smooth muscle and intimal endothelial cell proliferation, angioproliferative plexiform lesions, and in situ thrombosis increasing pulmonary vascular resistance and arterial stiffness. Sepsis is a systemic complex syndrome, of infectious origin. The presence of inflammation is well established in this condition and it is also considered a risk factor for acute lung injury. **Methods:** In this study 44 adult male rats of the Wistar strain were used. All animals were randomly divided in four groups: Control (CTRL), Pulmonary Arterial Hypertension (PAH), sepsis (SPS) and Pulmonary Arterial Hypertension associated with sepsis (HPSPS). Of that total, 32 animals underwent to analysis of mechanical properties and morphometric analysis of pulmonary vessels in the 28th day of the experiment, while 12 animals underwent hemodynamic for confirmation of PAH. **Results:** The pressure dissipation in the viscoelastic component increased significantly in the lungs of rats with PAH (0.94 ± 0.1 cmH₂O), sepsis (0.95 ± 0.1 cmH₂O) and the association between PAH and sepsis (1.39 ± 0.1 cmH₂O) compared to CTRL (0.37 ± 0.1 cmH₂O) group. The ΔP_{tot} , L variable increased significantly in PAH (1.75 ± 0.1 cmH₂O) and HPSPS group (2.12 ± 0.1 cmH₂O). The ΔP_2 , sr (1.97 ± 0.1 cmH₂O) component and E_{dyn} , sr (4.80 ± 0.2 cmH₂O.ml⁻¹) was significantly increased into the respiratory system of rats in HPSPS group; E_{st} , sr (4.02 cmH₂O.ml⁻¹ ± 0.3) was significantly increased in the respiratory system of rats with PAH. There were no significant variations in the viscous component of the respiratory system and its components, lung and chest wall. The proportion of collagen fibers increased significantly in pulmonary vessels for PAH ($164\% \pm 67$) and HPSPS ($191\% \pm 57$) group when compared to the CTRL ($69\% \pm 30$) and the SPS ($80 \pm 30\%$). The remodeling of the pulmonary vascular wall was significantly higher in the pulmonary vessels of the rat in the PAH ($25.8 \mu\text{m} \pm 5$) and HPSPS ($33.6 \mu\text{m} \pm 8.1$) group.

Keywords: Pulmonary Arterial Hypertension, inflammation, sepsis, thrombosis, respiratory mechanics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proliferação de células musculares lisas, endoteliais e fibroblastos com estreitamento dos vasos pulmonares.	17
Figura 2. Acesso do catéter ao ventrículo direito (VD) para obtenção das pressões. Monitor multiparamétrico com registro das pressões do ventrículo direito.	28
Figura 3. Modelo bicompartimental com dois graus de liberdade.....	30
Figura 4. Representação esquemática das pressões durante interrupção súbita do fluxo aéreo ao final da inspiração.	31
Figura 5. Aquisição dos sinais digitais: fluxo, pressão traqueal e pressão esofageana.	35
Figura 6. Fotomicrografia da mensuração da camada arterial média em animal do grupo CTRL (a) e HAP (b).....	37
Figura 7. Média da PS_{VD} nos quatro grupos estudados	40
Figura 8. Variação total de pressão, variação da pressão resistiva ($\Delta P1$) e viscoelástica ($\Delta P2$) (c) no sistema respiratório dos quatro grupos;	44
Figura 9. Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn) no sistema respiratório dos quatro grupos.	44
Figura 10. Variação total da pressão, variação da pressão resistiva ($\Delta P1$) e viscoelástica ($\Delta P2$) na parede torácica dos quatro grupos;	44
Figura 11. Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn)(b) na parede torácica dos quatro grupos;.....	45
Figura 12. Variação total da pressão, variação da pressão resistiva ($\Delta P1$) e viscoelástica ($\Delta P2$) pulmonar dos quatro grupos.....	44
Figura 13. Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn) pulmonar dos quatro grupos;	45
Figura 14. Proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar..	47
Figura 15. Valor da espessura da camada arterial média para os quatro grupos estudados.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso dos animais de todos os grupos no dia 1 e 28 do experimento	39
Tabela 2. Estudo hemodinâmico.....	40
Tabela 3. Perfil hematológico	41
Tabela 4. Variáveis mecânicas do sistema respiratório nos grupos estudados ...	43
Tabela 5. Relação peso úmido/ peso seco dos pulmões e corações dos animais estudados	46
Tabela 6. Espessura da camada arterial média e proporção de fibras colágenas em arteríolas pulmonares.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIQ	Amplitude interquartil
ANOVA	Análise da variância
CCL2	Quimiocina ligante 2
CCL5	Quimiocina ligante 5
CLP	Ligação e punção do ceco
CTRL	Grupo controle
cw	Parede torácica
$\Delta P1$	Varição da pressão no componente viscoso
$\Delta P2$	Varição da pressão no componente viscoelástico
ΔP_{tot}	Varição total de pressão
E2	Componente viscoelástico arranjado em série – “mola”
EDTA K2	Ácido diaminoetanetetraacético – “anticoagulante”
E_{CAM}	Espessura da camada arterial média
E_{dyn}	Elastância dinâmica
E_{st}	Elastância estática
FR	Frequência respiratória
HP	Hipertensão Pulmonar
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HAPi	Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática
HE	Hematoxilina & eosina
HIV	Human immunodeficiency vírus
HPSPS	Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepsis
HVET	Hospital Veterinário da Universidade de Brasília
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
irpm	Incursões respiratórias por minuto

IVD	Insuficiência Ventricular Direita
L	Pulmão
MCT	Monocrotalina
PCS	Picrossírius
PEEP	Pressão positiva ao final da expiração
Pel	Pressão elástica
Pes	Pressão esofageana
P _{FC}	Proporção de fibras colágenas
Pi	Ponto de inflexão
Ppico	Pressão de pico
Ppl	Pressão intrapleural
PS	Peso seco
PS _{VD}	Pressão sistólica no ventrículo direito
Pt	Pressão traqueal
PU	Peso úmido
R2	Componente viscoelástico arranjado em série – “amortecedor”
R _{int,sr}	Resistência inicial do sistema respiratório
rs	Sistema respiratório
RVP	Resistência Vascular Pulmonar
SARA	Síndrome da Angustia Respiratória Aguda
SPS	Grupo Sepsis
t	Tempo
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de terapia intensiva
V'	Fluxo
V	Volume
VC	Volume corrente
\tilde{x}	Mediana

SUMÁRIO

Introdução	15
1.1 Definição de Hipertensão Arterial Pulmonar	15
1.2 Fisiopatologia.....	16
1.3 Clínica e Epidemiologia.....	19
1.4 Além do equilíbrio entre oferta e demanda.....	21
Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
Materiais e métodos	24
3.1 Desenho do Estudo	24
3.2 Cálculo do Tamanho da Amostra	24
3.3 Caracterização da Amostra.....	25
3.4 Grupos Experimentais	25
3.5 Estudo Hemodinâmico	27
3.6 Perfil Hematológico	29
3.7 Propriedades Mecânicas do Sistema Respiratório.....	29
3.8 Aquisição dos Sinais Biológicos	34
3.9 Quantificação de Edema Pulmonar e Análise do Peso Ponderal do Coração.....	35
3.10 Análise Morfométrica da Vasculatura Pulmonar	36
3.11 Análise Estatística	38
Resultados	39
4.1 Análise Descritiva	39
4.2 Hemodinâmica.....	40
4.3 Análise Hematológica.....	41
4.4 Análise das Propriedades Mecânicas	41
4.5 Relação Peso Úmido/Peso Seco	46
4.6 Análise Morfométrica.....	46
Discussão	49
Conclusão	60
Referências Bibliográficas	61
Apêndice	69
Anexo	71

INTRODUÇÃO

1.1 Definição de Hipertensão Arterial Pulmonar

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença grave, caracterizada por um aumento progressivo na resistência vascular pulmonar que resulta na elevação da pressão arterial pulmonar, insuficiência cardíaca direita e morte.¹ A HAP é um termo que congrega um conjunto de doenças com fisiopatologia, histologia e prognósticos semelhantes, constituindo o grupo I pela classificação estabelecida para hipertensão pulmonar (HP).^{2,3} (Quadro 1)

A HAP é definida por pressão arterial pulmonar média igual ou superior a 25 mmHg em repouso, resistência vascular pulmonar (RVP) superior a 3 unidades Wood e pressão de oclusão da artéria pulmonar igual ou inferior a 15 mmHg.³

Quadro 1. Classificação Clínica de Hipertensão Pulmonar (Nice, 2013)

1	Hipertensão arterial pulmonar (HAP)
1.1	HAP idiopática
1.2	HAP Hereditária
1.2.1	BMPR2
1.2.2	ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3	Desconhecida
1.3	Induzida por droga/toxinas
1.4	Associada com:
1.4.1	Doenças do tecido conectivo
1.4.2	Infeção por vírus HIV
1.4.3	Hipertensão Portal
1.4.4	Doenças cardíacas congênicas
1.4.5	Esquistossomose
1'	Doença pulmonar veno-oclusiva e/ou Hemangiomatose capilar pulmonar
1"	Hipertensão Pulmonar persistente do recém-nascido (HPPRN)
2	Hipertensão Pulmonar do coração esquerdo
2.1	Disfunção sistólica
2.2	Disfunção diastólica
2.3	Doença da válvula
2.4	Obstrução congênita/adquirida do fluxo de entrada/saída e cardiomiopatias congênicas
3	Hipertensão Pulmonar relacionada a doenças pulmonares e/ou hipóxia
3.1	Doença pulmonar obstrutiva crônica
3.2	Doença pulmonar intersticial
3.3	Outras doenças pulmonares mistas quanto ao padrão (obstrutivo/restritivo)
3.4	Distúrbio respiratório do sono
3.5	Distúrbio de hipoventilação alveolar
3.6	Exposição crônica a altitudes elevadas
3.7	Anormalidades de desenvolvimento
4	Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC)
5	Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais desconhecidos
5.1	Distúrbios hematológicos: Anemia hemolítica crônica, desordens mieloproliferativas, esplenectomia
5.2	Distúrbios sistêmicos: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose
5.3	Distúrbios metabólicos: Doença de armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, distúrbios da tireóide
5.4	Outros: Obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica, HP segmentar

Adaptado de Simonneau et al. Classification of Pulmonary Hypertension. JACC Vol. 62, No. 25, Suppl D, 2013 December 24, 2013:D34–41

1.2 Fisiopatologia

A fisiopatologia da HAP ainda não foi completamente elucidada. Trata-se de uma doença complexa, com envolvimento de diferentes vias que resultam em alterações da vasorreatividade vascular, remodelamento, com alterações

significativas da estrutura vascular e lesões trombóticas, e envolvimento do sistema de coagulação.^{4,5}

Na HAP, as lesões vasculares são mais evidentes nos vasos pré-capilares, comprometendo, principalmente, artérias com diâmetros inferiores a 500 μ m. O intenso remodelamento vascular compromete as diferentes camadas da parede vascular pulmonar, levando à redução progressiva da luz do vaso, podendo obliterá-lo, elevando, de maneira significativa, a resistência vascular pulmonar e reduzindo a complacência dos vasos comprometidos.^{6,7}

A camada média nos vasos pulmonares é, tipicamente, hipertrófica e hiperplásica na HAP.^{8,9} A camada íntima, frequentemente, apresenta lesões fibróticas, possivelmente relacionadas ao recrutamento e à proliferação de fibroblastos, miofibroblastos e outras células do tecido conectivo, que determinam a deposição de colágeno no interstício.^{10,11} A fibrose da camada íntima pode assumir uma apresentação excêntrica ou concêntrica com aspecto semelhante à “pele de cebola”, cursando com obliteração vascular.¹²

A camada adventícia, por sua vez, também pode apresentar fibrose, embora uma avaliação histológica, neste caso, seja mais complexa.^{6,13} (Figura 1)

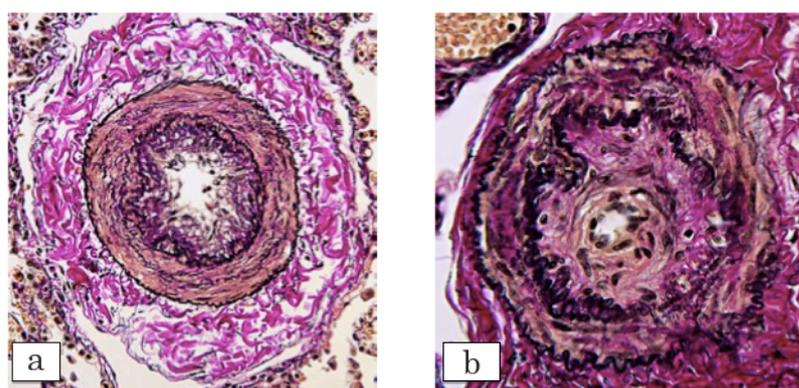


Figura 1. Proliferação de células musculares lisas, endoteliais e fibroblastos com estreitamento dos vasos pulmonares. (a) artéria normal (b) artéria com HAP. (Selimovic, 2008.p.14) ^a

^aSelimovic, N. Pulmonary hypertension. Clinical and pathophysiological studies. Gothenburg. Thesis [Doctoral Thesis]. University of Gothenburg, 2008.

Lesões vasculares complexas também são comuns em pacientes com HAP, sendo a lesão plexiforme uma característica marcante nesta doença.^{7,10} Morfologicamente, esta lesão assemelha-se a um glomérulo, com espessamento focal na camada íntima das pequenas artérias e proliferação endotelial significativa, formando canais sinusoidais em uma matriz rica em colágeno e células musculares lisas, que se desenvolve dentro da luz vascular original, causando sua obstrução.^{10,14}

Um ponto importante é que as lesões plexiformes não são comumente encontradas na maioria dos modelos experimentais, como o mais frequentemente utilizado, que utiliza o alcaloide monocrotalina para indução de HAP.¹⁵ Outras lesões podem ser encontradas, como as dilatações vasculares, usualmente associadas às lesões plexiformes, e, as alterações infiltrativas transmuralis, com inflamação e necrose fibrinóide.^{6,16,17}

A relação entre o sistema imune, inflamação e HAP foi, inicialmente, sugerida pela associação da HAP com as doenças do colágeno e infecção por HIV.^{18,19} Estudos histológicos revelam infiltrados de células inflamatórias perivasculares em lesões plexiformes, compostos por linfócitos B, T e macrófagos.^{19,20}

Estudos recentes demonstram que os infiltrados inflamatórios não estão restritos às lesões plexiformes e, também, são observados ao longo da parede vascular de arteríolas com diferentes diâmetros em pulmões extraídos de pacientes submetidos ao transplante pulmonar.^{4,21,22} Observou-se o aumento de mastócitos, macrófagos, linfócitos B e T CD4⁺ e CD8⁺, com predomínio de infiltrado na camada adventícia, sugerindo um papel patogênico desta camada no remodelamento vascular observado na HAP.¹⁹

Níveis circulantes elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, e P-selectina; bem como o aumento da expressão de quimiocinas, como a fractalina, CCL2 e CCL5, reforçam a hipótese de um papel patogênico da inflamação na HAP.^{4,6}

Além do remodelamento vascular, eventos trombóticos, na periferia vascular, como a trombose *in situ*, também são, classicamente, descritos nos pulmões de pacientes com HAP.^{23,24} Entretanto, ainda não há definição quanto ao papel fisiopatológico da *trombose in situ* na HAP, ela pode apenas corresponder a um epifenômeno relacionado à disfunção endotelial e à hipertensão pulmonar ou, ainda, pode ter um papel central no remodelamento vascular e na obstrução vascular pulmonar progressiva, com consequente aumento da resistência vascular pulmonar.⁹

Habitualmente, os trombos observados na HAP têm como característica a fibrose excêntrica na camada íntima, sugerindo uma organização de trombose pré-existente.^{9,25}

É plausível que as alterações no sistema de coagulação de pacientes com HAP possam justificar a predisposição à formação de trombose periférica pulmonar.²⁶⁻²⁸ Alguns estudos assinalam um predomínio pró-trombótico na atividade do sistema de coagulação, especialmente em pacientes com diagnóstico de HAP idiopática (HAPi), explicado pelo aumento na concentração e atividade do fator de von Willebrand.^{12,27,29}

1.3 Clínica e Epidemiologia

As manifestações clínicas da HAP são inespecíficas e, usualmente, caracterizadas por dispneia aos esforços com evolução progressiva, dor torácica, sinais de insuficiência ventricular direita e de baixo débito cardíaco, como edema de membros inferiores, hepatomegalia e síncope.³⁰

Dessa forma, e aliado ao fato de ser uma doença rara, com incidência anual de, aproximadamente, 2 casos por milhão de adultos, é comum que o diagnóstico seja confirmado tardiamente, com intervalo médio entre o início dos sintomas e a definição diagnóstica próxima de 1 ano, para pacientes com hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPi).^{3,30,31}

A idade média dos pacientes com HAP é de cerca de 50 anos, conforme indicam registros europeus e americanos.^{32,33} A distribuição da doença entre os gêneros é variável, com predomínio do sexo feminino em pacientes mais jovens, porém com tendência à equalização dessa distribuição em pacientes mais idosos.^{3,30}

Nas duas últimas décadas, houve um grande avanço no tratamento de pacientes com HAP, com o surgimento e disponibilização no mercado de drogas vasodilatadoras da circulação pulmonar.³⁰ Observou-se melhora considerável da sobrevida, podendo alcançar três anos em cerca de 70% dos pacientes. Apesar desses avanços, a doença continua sendo grave, com comprometimento da qualidade de vida e limitação da capacidade produtiva de pessoas jovens.^{30,34}

A insuficiência ventricular direita (IVD), caracterizada pela redução do índice cardíaco e por elevação da pressão atrial direita, é a principal causa de morte nos pacientes com hipertensão pulmonar.^{25,30,35}

A IVD pode se desenvolver em fases avançadas da HAP, mesmo com tratamento vasodilatador adequado, como consequência do remodelamento e da obliteração progressiva do leito vascular arterial pulmonar.³⁰

Por outro lado, descompensações agudas, habitualmente, estão associadas a condições como arritmias cardíacas, anemias e complicações infecciosas. Em pacientes com HAP internados em UTI, a identificação de complicações infecciosas é um forte preditor de mortalidade.³⁶

Infecções graves que cursam com sepse ou choque séptico e cuja característica é o grave comprometimento circulatório com depleção do volume intravascular, vasodilatação, depressão miocárdica e aumento do metabolismo sistêmico, determinando um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio, que resulta em hipóxia tecidual.³⁷ Em pacientes com HAP, a incapacidade de adequar o débito cardíaco a esse estado hiperdinâmico é ainda muito mais intenso.³⁸

A mortalidade entre pacientes com sepse grave ou choque séptico é alta, atingindo cerca de 30% na população em geral³⁹, no entanto, em pacientes com

HAP internados em UTI, que cursam com complicações infecciosas, a mortalidade pode chegar a 74%.⁴⁰

Na literatura, o mau prognóstico relacionado à associação das duas doenças é atribuído, basicamente, ao extremo desequilíbrio hemodinâmico/metabólico descrito acima, contudo, não há informação sobre outros mecanismos fisiopatológicos que possam contribuir para essa evolução.⁴¹⁻⁴³

1.4 Além do equilíbrio entre oferta e demanda

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepse são complexos. A resposta do hospedeiro a um agente infeccioso cursa com inflamação, mas, ao longo do tempo, observou-se que parte importante das complicações relacionadas à sepse, como a síndrome da deficiência múltipla de órgãos, estava associada, na verdade, a mecanismos inflamatórios e à imunodepressão.⁴⁴

A sepse é o principal fator de risco para o desenvolvimento da síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e, aproximadamente, 40% dos pacientes com sepse evoluem com SARA.⁴⁵

A expressão endotelial de citocinas inflamatórias, como o TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, bem como a interação com moléculas de adesão presentes no endotélio capilar pulmonar e na superfície celular dos neutrófilos, favorece as alterações das funções celulares dos polimorfonucleares e a migração dessas células para o pulmão.⁴⁵

Diversos estudos demonstraram a relação entre inflamação e alterações da coagulação na sepse. Está claro que citocinas inflamatórias, notadamente aumentadas na sepse, ativam o sistema de coagulação e que os mediadores ativados da coagulação podem determinar o aumento dos mediadores inflamatórios.⁴⁵

Considerando a extensão do leito vascular pulmonar e do seu endotélio, o pulmão é um cenário importante para a gênese do processo inflamatório e pró-coagulante, mas também sofre de forma relevante o impacto dos eventos trombóticos.^{45,46} Como consequência, a presença de microtrombozes vasculares foi descrita nos pulmões em vigência de sepse e/ou SARA.⁴⁵

Os eventos trombóticos na sepse estão associados ao aumento da atividade pró-coagulante, observado pela elevação de marcadores, como o fator de von Willebrand, e, também, pela redução de mecanismos anticoagulantes, como os associados à proteína C e antitrombina.^{44,45,47,48}

É possível que as justificativas para o prognóstico adverso dos pacientes com HAP que desenvolvem sepse não se restrinjam ao intenso desequilíbrio entre oferta de oxigênio, amplamente comprometida nesses pacientes, em consequência da incapacidade de aumentar o débito cardíaco pelo aumento da resistência vascular pulmonar e da disfunção ventricular direita.³⁶

Considerando que, em ambas as condições, a fisiopatologia envolve mecanismos inflamatórios e alterações do sistema de coagulação, levando a eventos trombóticos da microcirculação, é aceitável que haja algum grau de sinergismo na associação das duas doenças, determinando manifestações mais agressivas da sepse com repercussão nas propriedades mecânicas do sistema respiratório.⁴⁹

Este estudo avalia, indiretamente, o impacto da associação entre HAP e sepse, por meio do estudo das propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos com HAP. Foram explorados, também, os aspectos histológicos que podem indicar a potencialização dos processos inflamatórios e as alterações estruturais associadas ao remodelamento dos vasos pulmonares, na associação das duas doenças.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos com HAP e sepse.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Avaliar os efeitos da HAP, da sepse e de sua associação nos componentes resistivos, viscoelásticos e elásticos dos pulmões, e da parede torácica de ratos Wistar;
- ii. Analisar as características histopatológicas na vasculatura pulmonar, por meio de estudo morfométrico, em todos os grupos estudados;

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, aleatorizado, controlado e cego, desenvolvido em modelo animal e realizado no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sala BC-204. Seu delineamento está estruturado em forma de fluxograma (Apêndice 1).

3.2 Cálculo do Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com os seguintes parâmetros:

- Erro tipo I = 5%;
- Erro tipo II = 20%;
- Poder do teste estatístico = 80%. Análise de variância “*one-way*”;
- Número de grupos = 4;
- Tamanho do efeito = 50%.

Com estes parâmetros, o tamanho amostral calculado, *a priori*, foi de 44 animais.

3.3 Caracterização da Amostra

Para a realização do experimento, foram utilizados 44 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, raça Wistar, doados pelo biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás – GO), com peso entre 295 e 380 g.

Os ratos foram alocados em gaiolas apropriadas, com até cinco animais por gaiola e mantidos no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas cada, e acesso à ração e à água potável *ad libitum*.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, sob o Protocolo 11060/2012, e seguiu todos os cuidados éticos conforme as normas locais, nacionais e internacionais que regem a pesquisa com animais de laboratório.^{50,51}

3.4 Grupos Experimentais

A distribuição dos animais entre os grupos foi feita de forma aleatória a partir de sorteio utilizando-se uma urna. Esta continha a identificação de onze elementos de cada um dos quatro grupos experimentais. Os animais foram, então, divididos em 4 grupos experimentais com onze ratos cada, para avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório, morfologia do tecido vascular pulmonar e hemodinâmica, a saber:

Controle (CTRL): composto por onze ratos, aos quais foi administrada dose única, subcutânea, de 7 ml de solução salina a 0,9% em pata traseira direita. Após três semanas, oito animais, foram anestesiados (ketamina 150 mg.kg⁻¹ i.p. e xilazina 7,5 mg.kg⁻¹ i.p.) em quadrante inferior esquerdo do abdome, para preservação do ceco. Posicionados em mesa cirúrgica, o abdome de cada animal foi tricotomizado seguido de assepsia feita por povinilpirrolidona-iodo. Todos os animais foram submetidos à laparotomia, com incisão de 2 centímetros no terço

médio do abdome, com exposição, mas sem perfuração nem ligação do ceco. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado no plano peritônio e músculo-aponeurótico com fio absorvível Vicryl 4-0 e, para a pele, foi utilizado fio de Nylon 4-0. Foi realizada limpeza no sítio cirúrgico com água oxigenada a 10% e identificação do animal com aplicação de tinta pigmentada atóxica na base da cauda. Nos primeiros cinco dias de pós-operatório, os ratos receberam analgesia com 60–360 mg.kg⁻¹ de dipirona sódica diluídos em água potável e substituída a cada 24 horas para garantia de manutenção da propriedade analgésica.⁵²

Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP): composto por onze ratos, aos quais foi administrada dose única, subcutânea, em pata traseira direita, de 7 ml de solução contendo 60 mg.kg⁻¹ de monocrotalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) para indução da HAP.^{53,54} Ao final da terceira semana, oito animais do grupo foram anestesiados, submetidos à laparotomia exploradora e cuidado pós-operatório, seguindo o mesmo método descrito no grupo controle.

Sepse (SPS): composto por onze ratos, aos quais foi administrada dose única, subcutânea, de 7 ml de solução salina a 0,9% em pata traseira direita. Decorridas três semanas, oito animais foram anestesiados, conforme procedimentos descritos para o grupo controle, e submetidos à laparotomia exploradora no terço médio do abdome, com identificação e exposição do ceco que recebeu a ligadura abaixo da válvula ileocecal com fio de seda estéril 3-0, promovendo a obstrução total do segmento, sem, contudo, provocar isquemia, impedindo o livre trânsito do conteúdo do intestino delgado para o intestino grosso.^{55,56} Abaixo da ligadura, o ceco foi transfixado em dois pontos distintos com Jelco estéril n° 14, e levemente pressionado para extravasamento do conteúdo fecal na cavidade abdominal garantindo a patência do orifício^{56–58} O ceco foi reposicionado na cavidade abdominal seguido da sutura e limpeza do sítio cirúrgico conforme protocolo descrito nos grupos anteriores.

Grupo HAP + Sepse (HPSPS): Composto por onze ratos, aos quais foi administrada solução contendo 60 mg.kg^{-1} monocrotalina, conforme descrito no grupo HAP, e, ao final de três semanas, oito animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia exploradora com punção e ligação do ceco, conforme descrição detalhada dos procedimentos realizados para os animais do grupo SPS, e seguindo o protocolo cirúrgico e pós-operatório descrito nos grupos anteriores;

Após 4 semanas da administração da monocrotalina ao grupo HAP, três animais de cada grupo foram submetidos à avaliação hemodinâmica e os outros oito animais de todos os grupos foram anestesiados para a estudo das propriedades mecânicas do sistema respiratório e de seus componentes (parede torácica e pulmões), descritas em detalhes nos itens [3.5] e [3.7], respectivamente;

Quadro 2. Procedimentos realizados nos animais de cada grupo experimental.

	CTRL	HAP	SPS	HPSPS
Administração de solução salina	√		√	
Administração de monocrotalina		√		√
Laparotomia sem perfuração do ceco	√	√		
Laparotomia com perfuração do ceco			√	√

3.5 Estudo Hemodinâmico

Todos os animais submetidos à monitorização hemodinâmica foram anestesiados (ketamina 150 mg.kg^{-1} i.p. e xilazina $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.p.), pesados em balança digital Filizola BP *Baby* (Filizola®, São Paulo, SP) e traqueostomizados com cânula de polietileno (4,5 cm x 2,1 mm), em que a extremidade proximal foi fixada à traqueia com fio de seda 3-0 e a extremidade distal conectada ao ventilador mecânico (Harvard Apparatus 680A, Millis, MA, EUA) que era disparado a tempo, limitado e ciclado a volume. Os parâmetros ventilatórios

utilizados, foram: ar ambiente, frequência respiratória (FR) de $80.\text{min}^{-1}$, volume corrente (VC) de 8 mL.kg^{-1} e pressão positiva ao final de expiração (PEEP) de $2 \text{ cmH}_2\text{O}$.

Os animais foram, então, submetidos à esternotomia mediana para exposição do coração. Um fio cirúrgico de polipropileno 4-0 foi utilizado para ancoragem e retificação do coração para o correto posicionamento do órgão e posterior inserção do catéter na base do ventrículo direito para acesso à câmara.

A medida invasiva da pressão arterial, de maneira contínua, com a utilização de transdutores de pressão, apresenta melhor correlação com a medida considerada “padrão-ouro”, por meio do registro do traçado de pressão arterial.⁵⁹ Para a adequada precisão do método, foi realizada a calibração do aparelho, bem como o emprego de uma referência anatômica, utilizada como zero hidrostático. Para as medidas da pressão do ventrículo direito, foi utilizado um ponto no meio do tórax, considerado como a linha axilar média que, com maior exatidão, corresponde à desembocadura das veias cavas no átrio direito.

A pressão sistólica do ventrículo direito (PS_{VD}) foi mensurada por meio de um cateter Jelco® nº 21 conectado ao transdutor de pressão com PEEP de $0 \text{ cmH}_2\text{O}$. Posicionado o transdutor no nível da linha zero de referência, o aparelho foi zerado e, posteriormente, o sistema foi fechado para a atmosfera e aberto para a linha arterial, iniciando-se os registros das curvas e pressões. (Figura 2)

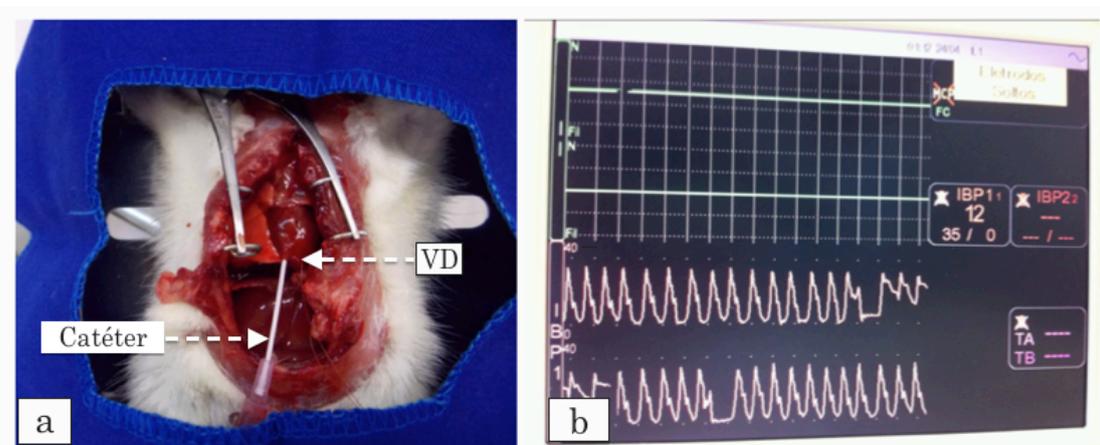


Figura 2. (a) Acesso do catéter ao ventrículo direito (VD) para obtenção das pressões. (b) Monitor multiparamétrico com registro das pressões do ventrículo direito (PVD).

A partir da obtenção e estabilização dos sinais e análise da morfologia da curva, a PVD foi aferida e registrada durante 1 minuto. A pressão sistólica do ventrículo direito (PS_{VD}) foi calculada utilizando-se a média dos valores que a PVD registrou ao longo da aferição. O diagnóstico de HAP foi realizado utilizando o modelo sugerido por Kolettis *et al.*¹⁵

3.6 Perfil Hematológico

O número de leucócitos totais, hemoglobina, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas foram obtidos por meio de seleção aleatória de dois animais de cada grupo, para coleta sanguínea após a realização do estudo hemodinâmico, por meio de punção atrial direita e extração de 2,0 ml de sangue venoso por sistema de coleta a vácuo Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e armazenado em frasco estéril de EDTA K2 (BD, Franklin Lates, NJ, EUA), hermeticamente fechado.

Os frascos foram homogeneizados e enviados, imediatamente, ao Departamento de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVET) para realização de hemograma completo.

3.7 Propriedades Mecânicas do Sistema Respiratório

O sistema respiratório possui propriedades mecânicas que podem ser estudadas por meio de modelos matemáticos. É possível recorrer à analogia da física para representar as propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas do sistema respiratório utilizando resistores e capacitores arranjados em série e ou em paralelo.

A inhomogeneidade na distribuição do gás nos pulmões e a viscoelasticidade do tecido pulmonar levaram Mount⁶⁰, Otis⁶¹, Mead⁶² e Bates⁶³⁻⁶⁵ a descreverem a natureza compartimental do sistema respiratório.

Para este estudo, foi escolhido o modelo bicompartimental descrito por Bates⁶⁵ (Figura 3) no qual, de uma maneira simples, o sistema respiratório (rs) é representado por dois compartimentos em paralelo: um amortecedor representando a resistência inicial do sistema respiratório ($R_{int,rs}$) e um corpo de Kelvin. Este último é constituído por uma mola que representa a elastância estática do sistema respiratório ($E_{st,rs}$) em paralelo com um corpo Maxwell, isto é, uma mola (E_2) e um amortecedor (R_2) dispostos em série. Os componentes E_2 e R_2 representam as propriedades viscoelásticas dos tecidos do pulmão e da parede torácica. A distância entre as barras representa o volume e a pressão gerados quando o modelo é deslocado mecanicamente, e a velocidade com a qual as barras se afastam, o fluxo aéreo.

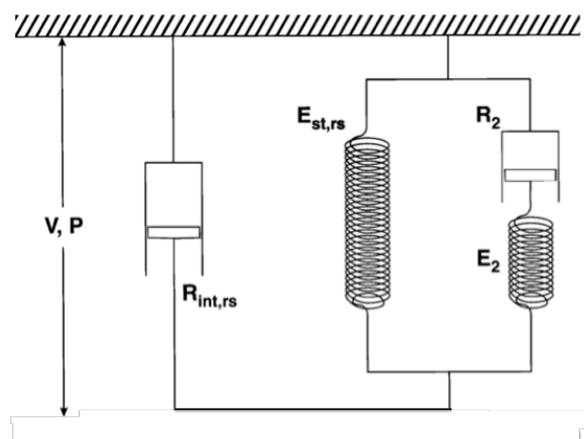


Figura 3. Modelo bicompartimental com dois graus de liberdade. As regiões alveolares são representadas como um único compartimento uniformemente ventilado, servido por uma via aérea com a resistência $R_{int,rs}$. O tecido pulmonar está descrito por um corpo de Kelvin constituído por três elementos, E_{st} , E_2 e R_2 . Representação mecânica. (D'Angelo, 1989)

O modelo representa um único compartimento físico no pulmão, contudo, possui dois graus de liberdade, porque, em qualquer ponto do tempo, seu estado é definido por duas grandezas, o volume no compartimento alveolar e a extensão da mola E_2 (ou, equivalentemente, a extensão do amortecedor).^{65,66} Este modelo foi escolhido por representar, de maneira adequada, as quedas pressóricas do sistema respiratório e de seus componentes vistas após uma oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração.

O método de oclusão rápida das vias aéreas ao final da inspiração, proposto por Bates e cols⁶⁷, foi utilizado para determinação das propriedades mecânicas do sistema respiratório e de seus componentes. Este método consiste em ventilar mecanicamente os animais com fluxo e volume constantes^{68,69}, e ocluir as vias aéreas ao final da inspiração. Após a oclusão, há queda rápida da pressão transpulmonar (ΔP_1) de um valor pré-oclusão até um ponto de inflexão (P_i), seguida de uma queda lenta (ΔP_2) até que um platô é alcançado. A queda rápida da pressão representa a dissipação de energia contra a resistência das vias aéreas; ΔP_2 reflete as propriedades viscoelásticas do sistema respiratório e de seus componentes juntamente com a contribuição das inhomogeneidades de constante de tempo⁷⁰; enquanto o platô representa a pressão de recolhimento elástico do sistema respiratório.

A queda da pressão em função do tempo, em razão do volume aprisionado nos pulmões por meio da oclusão, recebe o nome de *stress relaxation* e a redistribuição deste volume de gás de áreas de maior pressão para áreas de menor pressão, decorrente das diferentes constantes de tempo, recebe o nome de *pendeluft*.(Figura 4)^{67,71,72}

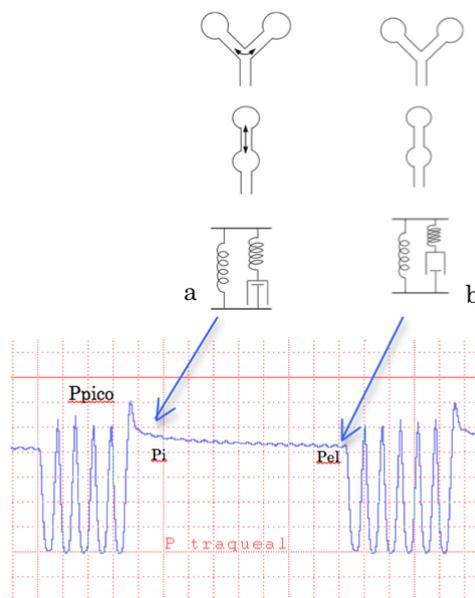


Figura 4. Representação esquemática das pressões durante interrupção súbita do fluxo aéreo ao final da inspiração. A primeira queda pode ser atribuída à dissipação de energia nas vias aéreas enquanto que a queda lenta da pressão pode ser atribuída tanto à redistribuição do fluxo de gás entre os dois compartimentos (*pendeluft*) (a) como por relaxamento do estresse (*stress relaxation*) (b). Adaptado de Bates,2009.

As variáveis analisadas para este estudo foram fluxo inspiratório (V), pressão de pico (P_{pico}), pressão no ponto de inflexão (P_i) e pressão elástica (P_e), calculadas a partir das curvas de pressão traqueal (P_t) e pressão esofageana (P_{es}). O volume (V) foi calculado a partir da curva de fluxo. Todas as variáveis foram analisadas para o sistema respiratório (rs), pulmões (L) e parede torácica (cw).

A decomposição do sistema respiratório em pulmões e parede torácica foi realizada com uma cânula de polietileno (15 cm x 1mm) introduzida no esôfago do animal para registro da pressão esofageana (P_{es}). O correto posicionamento da cânula esofageana foi realizado com os animais respirando espontaneamente e determinado por meio do teste de oclusão⁷³, que consiste em ocluir a abertura das vias aéreas aéreas ao final da expiração. Nesta condição, a variação das pressões traqueal e esofageana deve ser similar. De maneira geral, as mudanças na P_{es} refletem as mudanças na pressão intrapleural (P_{pl}) em função do tempo (t).⁷⁴ Isto permitiu avaliar, isoladamente, as alterações mecânicas destes compartimentos induzidos pela HAP, pela sepse e pelas duas condições sobrepostas.

Para estudar as propriedades mecânicas do sistema respiratório e de seus componentes, os animais foram anestesiados (ketamina 75 mg.kg⁻¹ i.p e xilazina 10 mg.kg⁻¹ i.p), traqueostomizados com uma cânula de polietileno (4,5 cm x 2,1 mm) e paralisados com administração de brometo de pancurônio (5 µg.kg⁻¹ i.v). A extremidade proximal da cânula traqueal foi fixada à traqueia com fio de seda 3-0, e a extremidade distal foi conectada a um pneumotacógrafo (Fleisch n° 0) e esta ao ventilador mecânico de fluxo constante (Samay VR 15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai). Os parâmetros ventilatórios utilizados para a medida das propriedades mecânicas dos sistema respiratório, parede torácica e pulmões foram: ar ambiente, fluxo constante de 10 mL.min⁻¹, frequência respiratória de 80 irpm e volume conhecido de 2 mL.

As variáveis mecânicas do sistema respiratório, da parede torácica e dos pulmões foram determinadas da seguinte forma:

a) **Elastância estática (Est):**

$$Est = \frac{Pel - PEEP}{V} \quad \text{cmH}_2\text{O.ml}^{-1} \quad (1)$$

Onde, Pel é o ponto onde a pressão alcança um platô, ou pressão elástica, PEEP a pressão positiva ao final da expiração e V o volume;

b) **Elastância dinâmica (Edyn):**

$$Edyn = \frac{Pi - PEEP}{V} \quad \text{cmH}_2\text{O.ml}^{-1} \quad (2)$$

Onde, Pi corresponde à pressão no ponto de inflexão, PEEP a pressão positiva ao final da expiração e V o volume;

c) **Variação de pressão no componente viscoso ($\Delta P1$):**

$$\Delta P1 = P_{\text{pico}} - Pi \quad \text{cmH}_2\text{O} \quad (3)$$

Onde, P_{pico} corresponde à pressão máxima gerada e Pi corresponde à pressão no ponto de inflexão;

d) **Variação de pressão no componente viscoelástico ($\Delta P2$):**

$$\Delta P2 = Pi - Pel \quad \text{cmH}_2\text{O} \quad (4)$$

Onde, Pi corresponde à pressão no ponto de inflexão e Pel ao ponto onde a pressão alcança um platô.

As medidas descritas acima foram obtidas para o sistema respiratório (sr), pulmões (L) e parede torácica (cw). As medidas de cw e sr foram obtidas diretamente, enquanto as medidas de L foram obtidas subtraindo-se de sr os valores de cw ($sr - cw = L$). Foram realizadas dez oclusões das vias aéreas para cada animal e os valores individuais das variáveis mecânicas descritas acima foram obtidos pela média das dez curvas.

Ao término destas medidas, os animais, ainda sob anestesia e sem reatividade, foram eutanasiados por exanguinação, precedidos pela coleta sanguínea e/ou seguidos pela extração do bloco coração-pulmão, destinados à análise hematológica e morfométrica, respectivamente.

3.8 Aquisição dos Sinais Biológicos

Para aquisição dos sinais hemodinâmicos, foi utilizado um transdutor de pressão (Deltran®, Midvale, UT, EUA) conectado a um catéter completamente preenchido por solução salina fisiológica 0,9% e este a um monitor multiparamétrico Dixtal DX 2010 (Dixtal® Biomédica, Manaus, AM, Brasil). Para determinação da resposta dinâmica do sistema de mensuração, foi realizado um “teste de lavagem” (*flush*), no qual foi observado o registro de uma curva no monitor, produzido imediatamente após a liberação de um fluxo determinado de soro fisiológico, antes do início dos registros.

O pneumotacógrafo foi conectado a um transdutor diferencial de pressão (PT5A, Grass, Quincy, MA, EUA) para registro do fluxo aéreo. Para registro das pressões traqueal e esofagiana, utilizamos um transdutor absoluto de pressão (P23 Db, Grass, Quincy, MA, EUA).

Todos os transdutores estavam ligados a um polígrafo (7C, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EUA), no qual os sinais foram filtrados e amplificados. A partir do polígrafo, os sinais seguiam para um módulo condicionador de sinais biológicos (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo) e, então, eram transformados em formato digital por um conversor analógico-digital de 12 bits (EMG System do Brasil, São José dos Campos, São Paulo). O módulo condicionador foi acoplado a um microcomputador para registro dos sinais por meio do *software Windaq/Pro* (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA). (Figura 5)

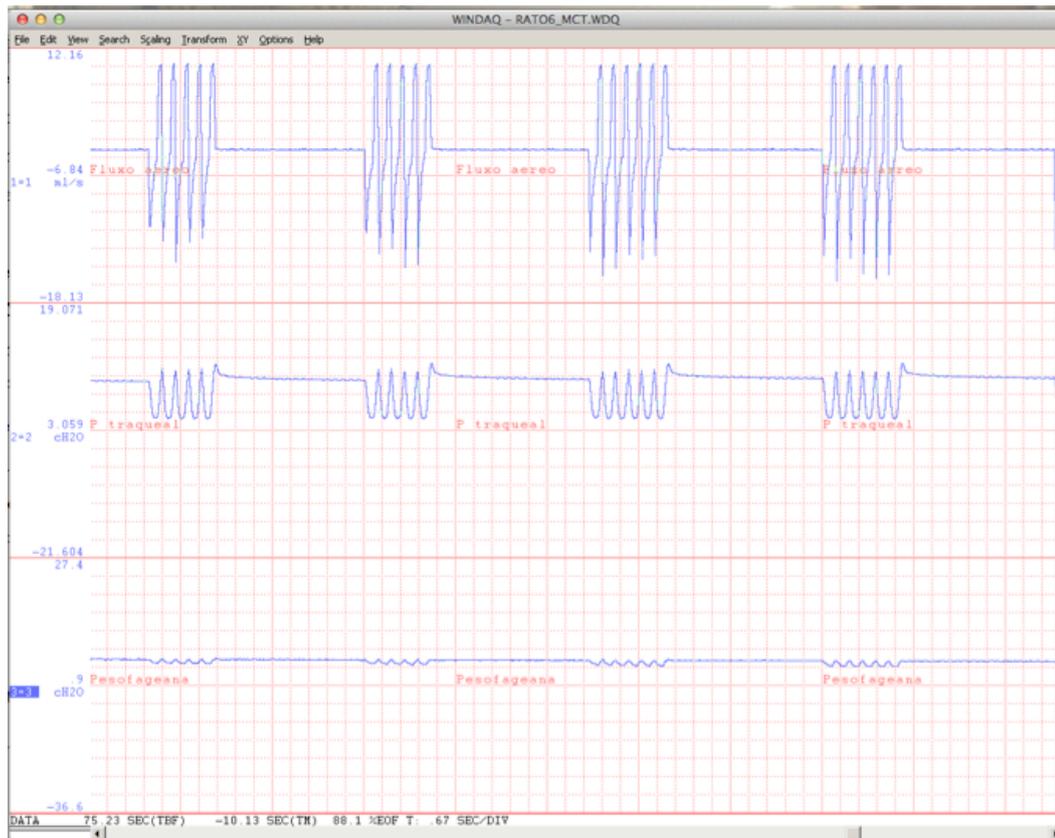


Figura 5. Aquisição dos sinais digitais em três canais distintos de cima para baixo: fluxo, pressão traqueal e pressão esofageana.

3.9 Quantificação de Edema Pulmonar e Análise do Peso Ponderal do Coração

Ao término do registro das medidas das propriedades mecânicas do sistema respiratório, o bloco coração-pulmão foi excisado, o pulmão esquerdo e o coração eram dissecados, identificados e pesados em balança de precisão (balança analítica eletrônica 2104N, Bioprecisa). As peças foram mantidas em estufa a uma temperatura de 60°C durante 72 horas e, então, novamente pesados para cálculo da relação peso úmido/peso seco (PU/PS).

3.10 Análise Morfométrica da Vasculatura Pulmonar

O pulmão direito de cada bloco coração-pulmão foi identificado e imerso em solução de formaldeído a 10%, e encaminhado ao Departamento de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVET).

Uma vez fixados, os tecidos pulmonares foram processados para cortes histológicos em parafina [3 micrômetros (μm) de espessura] e corados com hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius (PCS) para estudo das fibras colágenas e da espessura da camada arterial média dos vasos pulmonares.

Para a análise morfométrica dos vasos pulmonares, foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Proporção do volume de fibras colágenas na vasculatura pulmonar (P_{FC}) - Para esta análise, foi empregada a técnica de contagem de pontos, descrita por Gundersen⁷⁵, onde um retículo substituiu uma ocular do microscópio óptico (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) seguido pela contagem da proporção de fibras colágenas que incidem sobre os pontos do retículo e dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre os vasos pulmonares, utilizando aumento de 100x (valor do intercepto $10\mu\text{m}/\text{área}$ do retículo $10.000\mu\text{m}^2$) em coloração PCS, sob luz polarizada.
- Espessura da camada arterial média em vasos pulmonares (E_{CAM}) - Para esta análise, as lâminas foram digitalizadas pelo microscópio confocal Axio modelo CSM 700 (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) e as medidas obtidas com auxílio do *software AxioVision™* (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) em coloração HE.

Neste estudo foram analisadas arteríolas pulmonares dos espaços acinar e pré-acinar, sempre que apresentavam, nitidamente, uma lâmina elástica externa e interna separada ou não pela presença de músculo. Foram avaliados aleatoriamente três pontos distintos em cada uma das artériolas pulmonares escolhidas para a análise.

A análise do remodelamento vascular foi realizado utilizando a espessura da camada arterial média (EC_{AM}), em três pontos distintos de vasos pré e intra-acinares, escolhidos aleatoriamente, em cada um dos ratos pertencentes aos quatro grupos estudados, o que permitiu calcular o valor, em micrômetros, da espessura da camada arterial média para cada animal.(Figura 6)

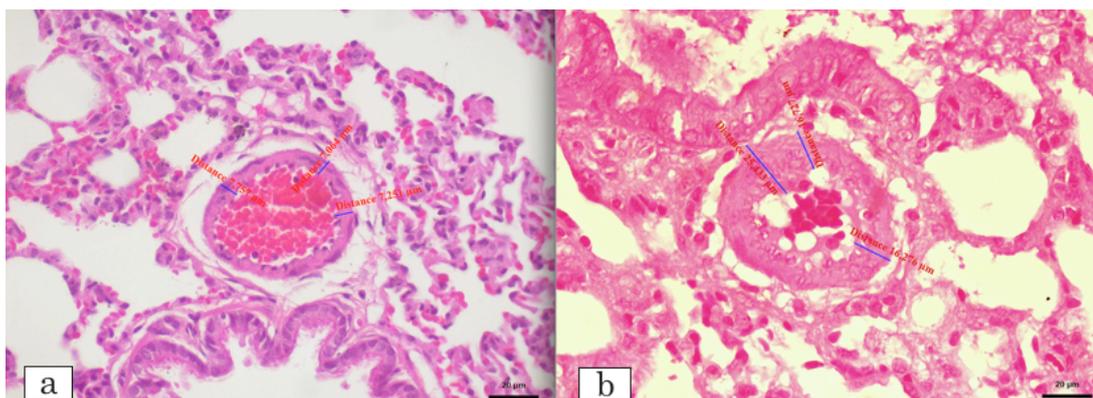


Figura 6. Fotomicrografia da mensuração da camada arterial média em animal do grupo CTRL (a) e HAP (b). HE, 20X.

A análise morfométrica dos vasos pulmonares foi realizada com o cegamento prévio do examinador. O cegamento foi determinado pela codificação das lâminas por meio de um número não sequencial de cinco algarismos referente ao registro de entrada das peças fornecido pelo Laboratório de Patologia Veterinária do HVET, de modo que o examinador não pudesse saber, no momento da análise, a que grupo pertencia cada lâmina. Ao término das medidas, o código foi quebrado e as lâminas renomeadas de acordo com o número do animal e o grupo experimental a que cada uma pertencia.

Os resultados obtidos com a análise das propriedades morfométricas do tecido vascular pulmonar dos animais de todos os grupos contemplaram o objetivo específico descrito no item [1.2,ii].

3.11 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis. Todas as variáveis que apresentaram distribuição gaussiana, a ANOVA *one-way* foi empregada para testar a hipótese nula (H_0) de que não havia diferenças entre os quatro grupos estudados. Para as variáveis que mantiveram uma distribuição não gaussiana, mesmo após a transformação logarítmica dos dados, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparação emparelhada nos grupos com distribuição paramétrica e teste U de Mann-Whitney nos demais casos.

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software Statistical Package Social Sciences* (SPSS) versão 20 para Mac OS X (Chicago, IL, EUA) e o nível de significância estabelecido em 5%. Os gráficos foram elaborados no *software* GraphPad Prism® versão 5.0 para Mac OS X (Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

4.1 Análise Descritiva

Foram estudados 44 animais, tendo ocorrido a perda de 8 animais durante o experimento, a saber: um do grupo CTRL, três do grupo SPS, dois do grupo HPSPS e dois do grupo HAP. Estes animais, foram prontamente substituídos por animais idênticos, para perfazer o total da amostra inicialmente proposta sem prejuízo a quaisquer dos grupos. O peso está sumarizado na tabela 1 para cada grupo no dia 1 (D1) e no dia 28 (D28) do experimento.

Tabela 1. Peso dos animais de todos os grupos no dia 1 e 28 do experimento

Variáveis	CTRL (n=8)	HAP (n=8)	SPS (n=8)	HPSPS (n=8)	p-valor❖
Peso D1 (g)	301 ± 15 ^{b♦}	342 ± 30	322 ± 20 ^{a❖}	319 ± 15	0,008
Peso D28 (g)	311 ± 18 ^{b♦}	361 ± 39	355 ± 26 ^{a❖}	347 ± 22	0,005
Peso28-Peso1(g)	9 ± 5 ^{a❖}	20 ± 10 ^{b❖}	22 ± 8	28 ± 9 ^{c❖}	0,001

Resultados apresentados em média ± DP. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse. ❖ Comparação entre grupos; p < 0,05[❖], p < 0,01[♦]. a = (CTRL x SPS); b = (CTRL x HAP); c = (CTRL x HPSPS);

Em todos os grupos houve ganho ponderal, tendo sido mais evidente nos grupos de intervenção.

Os resultados indicam diferença estatística no ganho de peso dos animais entre o primeiro e o último dia do experimento, entre os grupos CTRL x HAP, CTRL X SPS e CTRL x HPSPS.

4.2 Hemodinâmica

O valor médio da pressão sistólica do VD (PS_{VD}), utilizado para observar a presença ou ausência de HAP apresentou variação entre os grupos, confirmando a presença de HAP nos grupos HAP e HAP + SPS, com diferença estatisticamente significativa. O peso dos três animais de cada grupo submetidos ao estudo hemodinâmico não foi significativo ao nível de 5 %. (Tabela 2, Figura 7)

Tabela 2. Estudo hemodinâmico

Variáveis	CTRL (n=3)	HAP (n=3)	SPS (n=3)	HPSPS (n=3)	p-valor [✦]
PS_{VD} (mmHg)*	28 ± 6	40 ± 5	27 ± 1 [⊙]	58 ± 19	0,02
Peso (g)**	363 ± 13	347 ± 16	373 ± 12	355 ± 12	0,39

Resultados apresentados em mediana e AIQ.* Resultados apresentados em média ± DP.** CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse. ✦Comparação entre grupos.; $p < 0,05^{\odot}$. e = (SPS x HPSPS).

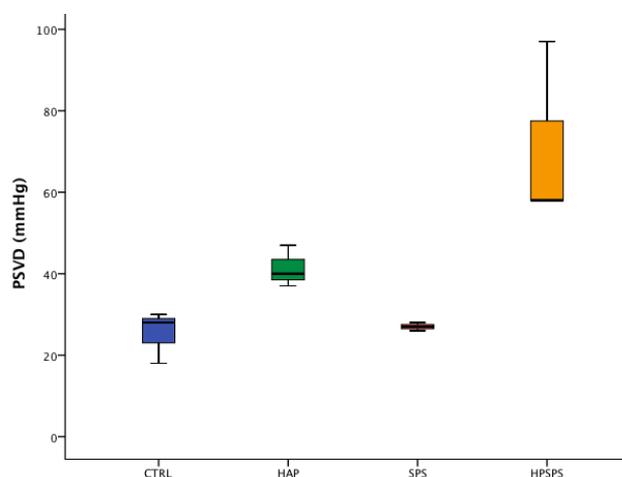


Figura 7. PS_{VD} nos quatro grupos estudados. \tilde{x} -AIQ

4.3 Análise Hematológica

Os dados obtidos a partir do hemograma completo para as variáveis leucócitos totais, hemoglobina, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas, foram comparados aos dados disponíveis na literatura para animais da mesma raça, faixa etária e peso. (Tabela 3)

Os valores encontrados demonstraram concordância com os de referência para o grupo CTRL e elevados em todos os grupos de intervenção.

Tabela 3. Perfil hematológico

	CTRL (n=2)	HAP (n=2)	SPS (n=2)	HPSPS (n=3)	Valor de * Referência
Leuc (x10 ³ µl)	5,05 ± 0,2	8,55 ± 2,4	12,92 ± 3,0	8,7 ± 0,8	4,52 ± 1,8
Hb (d/dL)	13,9 ± 1,5	11,8 ± 2,4	11,55 ± 3,0	18,0 ± 0,8	15,7 ± 1,0
Neut* (x10 ³ µl)	0,52 ± 0,5	3,49 ± 0,8	3,70 ± 0,9	17,5 ± 0,7	0,68 ± 0,3
Linf (x10 ³ µl)	4,82 ± 1,1	5,99 ± 0,5	8,80 ± 2,0	8,05 ± 0,2	3,63 ± 1,6
Mon (x10 ³ µl)	0,04 ± 0,07	0,30 ± 0,1	2,91 ± 1,9	2,00 ± 1,4	0,08 ± 0,04
Plaq (x10 ³ µl)	1067 ± 306	1214 ± 595	2900 ± 160	1087 ± 123	904 ± 137

Todos os valores apresentados em média ± DP. Leu= Leucócitos ,Hb=Hemoglobina,Neut= neutrófilos *segmentados, Linf= linfócitos, Mon= monócitos ,Plaq = plaquetas. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.*Fonte: © 2014 Charles River Laboratories International, Inc.

4.4 Análise das Propriedades Mecânicas

Os valores de fluxo aéreo e volume pulmonar, utilizados durante a ventilação mecânica, demonstraram ausência de variação não implicando em influência aos resultados das demais variáveis estudadas.(Tabela4)

Os resultados obtidos na análise da mecânica respiratória apresentaram

um aumento na variação total de pressão no sistema respiratório para o grupo HPSPS (34%) quando comparado ao grupo CTRL. Também foi observado o aumento significativo na dissipação de energia no componente viscoelástico do sistema respiratório do grupo HPSPS quando comparado aos grupos CTRL (46%) e SPS (58%).

A dissipação de energia no componente resistivo do sistema respiratório não sofreu alterações significativas em nenhum dos grupos estudados.

Pode-se observar um aumento significativo da elastância estática do sistema respiratório no grupo HAP (36%) quando comparado ao grupo CTRL. O mesmo aumento ocorreu para a elastância dinâmica do grupo HPSPS (28%) quando comparado ao grupo CTRL.

Não puderam ser observadas alterações significativas em quaisquer das variáveis da parede torácica.

Para as variáveis correspondentes ao componente pulmonar, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo na variação total de pressão para o grupo HAP (77%) quando comparado ao grupo CTRL. Um aumento ainda maior na variação total da pressão pulmonar foi observado no grupo HPSPS (115%) quando comparado ao grupo CTRL.

Foi observado um aumento significativo na dissipação da energia no componente viscoelástico pulmonar, nos três grupos de intervenção HAP (154%), SPS (157%) e HPSPS (276%) quando comparados ao grupo CTRL.

A elastância estática pulmonar também apresentou um aumento estatisticamente significativo nos três grupos de intervenção HAP (56%), SPS (48%) e HPSPS (53%) bem como a elastância dinâmica para HAP (59%), SPS (47%) e HPSPS (63%) quando comparados ao grupo CTRL.

Não foram observadas alterações significativas na dissipação de energia no componente resistivo pulmonar para nenhum dos grupos estudados. (Tabela, 4, Figuras 8-13).

Tabela 4. Variáveis mecânicas do sistema respiratório nos grupos estudados

Volume (ml)	CTRL (n=8)	HAP (n=8)	SPS (n=8)	HPSPS (n=8)	p*‡
Fluxo (mls ⁻¹)	9,99 ± 0,2	9,92 ± 0,2	10,04 ± 0,5	9,99 ± 0,2	0,91
Volume (ml)	2,02 ± 0,1	1,98 ± 0,2	1,98 ± 0,1	2,04 ± 0,1	0,58
ΔP _{tot,sr} (cmH ₂ O)	2,33 ± 0,2	2,63 ± 0,1	2,61 ± 0,4	3,11 ± 0,4 ^{c♦}	0,03
ΔP _{1,sr} (cmH ₂ O)	1,19 ± 0,1	1,19 ± 0,8	1,25 ± 0,1	1,13 ± 0,1	0,91
ΔP _{2,sr} (cmH ₂ O)	1,25 ± 0,1	1,43 ± 0,8	1,35 ± 0,1 ^{e♦}	1,97 ± 0,1 ^{c†}	0,007
E _{st,sr} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	2,95 ± 0,1	4,02 ± 0,3 ^{b♦}	3,73 ± 0,1	3,84 ± 0,2	0,01
E _{dyn,sr} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	3,75 ± 0,1	4,75 ± 0,4	4,41 ± 0,1	4,80 ± 0,2 ^{c♦}	0,03
ΔP _{tot,cw} (cmH ₂ O)	1,44 ± 0,8	1,31 ± 0,3	1,30 ± 0,9	1,23 ± 0,5	0,26
ΔP _{1,cw} (cmH ₂ O)	0,57 ± 0,0	0,53 ± 0,0	0,57 ± 0,0	0,55 ± 0,0	0,90
ΔP _{2,cw} (cmH ₂ O)	0,86 ± 0,0	0,77 ± 0,0	0,73 ± 0,0	0,68 ± 0,0	0,07
E _{st,cw} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	0,66 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,71 ± 0,0	0,74 ± 0,4	0,61
E _{dyn,cw} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	1,26 ± 0,1	1,26 ± 0,1	1,39 ± 0,11	1,23 ± 0,5	0,68
ΔP _{tot,L} (cmH ₂ O)	0,99 ± 0,1	1,75 ± 0,1 ^{b♦}	1,64 ± 0,2	2,12 ± 0,1 ^{c†}	0,002
ΔP _{1,L} (cmH ₂ O)	0,61 ± 0,1	0,81 ± 0,1	0,91 ± 0,1	0,73 ± 0,1	0,41
ΔP _{2,L} (cmH ₂ O)	0,37 ± 0,1	0,94 ± 0,1 ^{b♦}	0,95 ± 0,1 ^{a♦}	1,39 ± 0,1 ^{c‡}	<0,0001
E _{st,L} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	2,22 ± 0,1	3,47 ± 0,4 ^{b♦}	3,29 ± 0,1 ^{a♦}	3,39 ± 0,2 ^{c♦}	0,009
E _{dyn,L} (cmH ₂ O.ml ⁻¹)	2,49 ± 0,2	3,95 ± 0,4 ^{b†}	3,66 ± 0,1 ^{a♦}	4,07 ± 0,2 ^{c†}	0,003

Resultados apresentados em média ± DP. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse. ‡Comparação entre grupos.*p-valor, p<0,05[♦], p<0,01[†] e p<0,0001^{*}. a = (CTRL x SPS); b = (CTRL x HAP); c = (CTRL x HPSPS); e = (SPS x HPSPS).

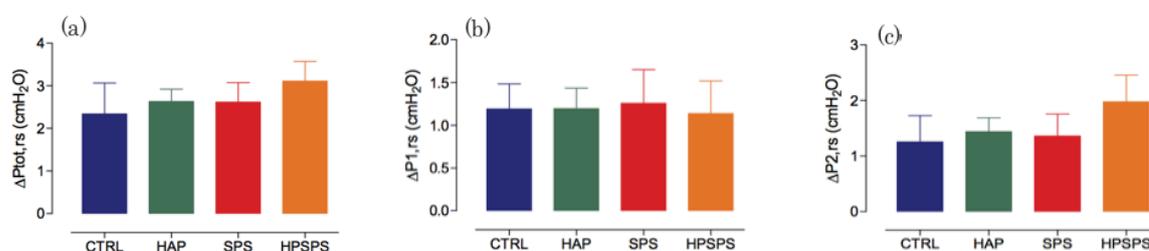


Figura 8. (a) Variação total de pressão no sistema respiratório (ΔP_{tot}) nos quatro grupos; (b) Variação da pressão resistiva (ΔP_1) e viscoelástica (ΔP_2) (c) no sistema respiratório dos quatro grupos; CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

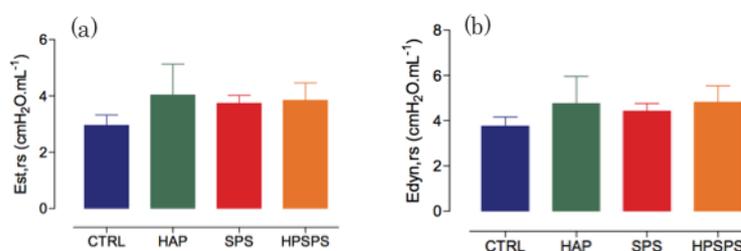


Figura 9. (a) Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn)(b) no sistema respiratório dos quatro grupos. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

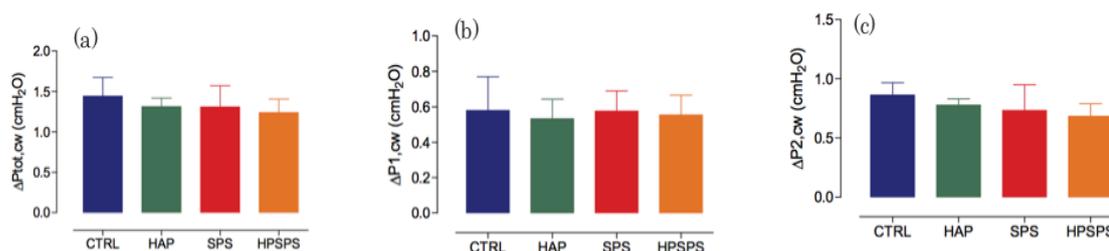


Figura 10. (a) Variação total da pressão na parede torácica dos quatro grupos; (b) Variação da pressão resistiva (ΔP_1) e viscoelástica (ΔP_2) (c) na parede torácica dos quatro grupos; CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

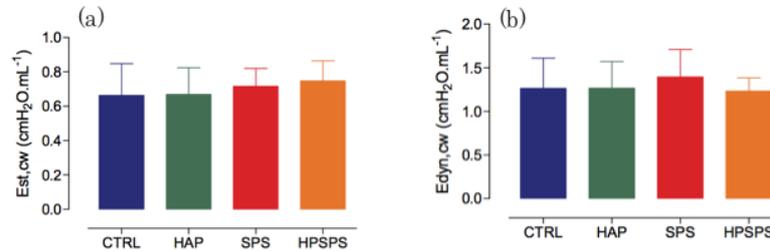


Figure 11. (a) Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn)(b) na parede torácica dos quatro grupos. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

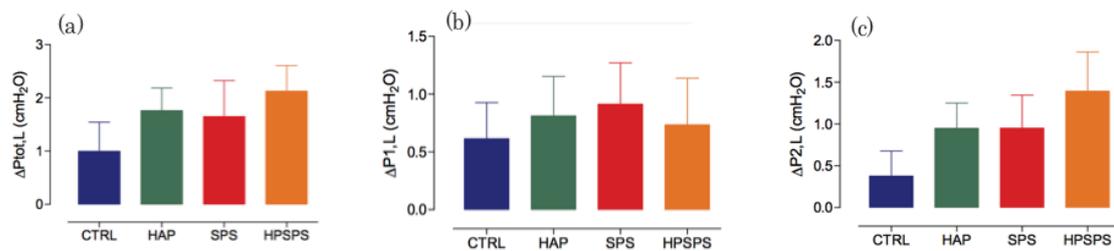


Figura 12. (a) Variação total na pressão pulmonar dos quatro grupos estudados. (b) Variação da pressão resistiva (ΔP_1) e viscoelástica (ΔP_2) (c) pulmonar dos quatro grupos; CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

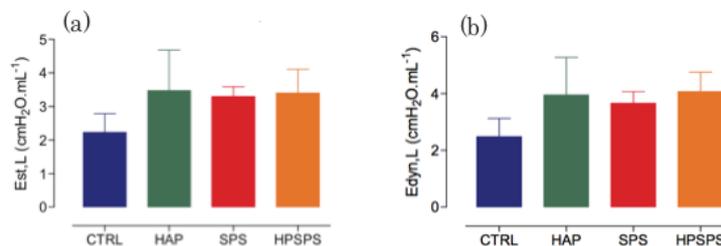


Figura 13. Variação da elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn) pulmonar dos quatro grupos; CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse.

4.5 Relação Peso Úmido/Peso Seco

Todos os animais submetidos à análise das propriedades mecânicas do Sistema Respiratório, tiveram um de seus pulmões e o coração removidos, para obtenção do valor da relação peso úmido (PU)/ peso seco (PS). (Tabela 5).

É possível observar diferenças estatisticamente significativas entre todos os animais dos grupos HAP e HPSPS quando comparados ao grupo CTRL para a variável PU/PS pulmão, indicativa de edema pulmonar.

A diferença também foi significativa para os grupos HAP quando comparados ao grupo CTRL, SPS e HPSPS para a variável coração, referente a diferenças na média do peso ponderal do coração, na relação PU/PS. A diferença foi mais evidente ($p < 0,01$) quando estes grupos foram comparados aos grupos que não receberam a monocrotalina, CTRL e SPS, respectivamente.

Tabela 5. Relação peso úmido/ peso seco dos pulmões e corações dos animais estudados

Variáveis	CTRL (n=8)	HAP (n=8)	SPS (n=8)	HPSPS (n=8)	p- valor✚
PU/PS Pulmão	2,69±0,3	4,02±0,2 ^{b*}	2,70±0,5 ^{d*}	3,36±0,5 ^{c,e,f} ✚	<0,0001
PU/PS Coração	2,84±0,3	3,69 ± 0,5 ^{b,d} ✚	2,90± 0,4	2,98±0,3 ^f ✚	0,001

PU = Peso úmido; PS= Peso seco. Resultados apresentados em média ± DP. CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse. ✚Comparação entre grupos; $p < 0,05$ ✚, $p < 0,01$ ✚ e $p < 0,0001$ ✚. b = (CTRL x HAP); c = (CTRL x HPSPS); d = (SPS x HAP); e = (SPS x HPSPS); f = (HAP x HPSPS).

4.6 Análise Morfométrica

Nos animais com HAP e HAP associada à sepse, foi possível observar diferenças significativas na proporção de fibras colágenas na vasculatura

pulmonar quando comparados aos grupos CTRL e SPS, indicando a existência de maior quantidade de fibras colágenas. (Tabela 6, Figura 13)

Tabela 6. Espessura da camada arterial média e proporção de fibras colágenas em arteríolas pulmonares

Variáveis	CTRL (n=8)	HAP (n=8)	SPS (n=8)	HPSPS (n=8)	p ✧
P _{FC} (%)*	63 ± 47	144 ± 82 ^{b✧}	75 ± 28 ^{d✧}	176 ± 85 ^{c,f✧}	<0,0001
E _{CAM} (μm)**	9,83 ± 1,8	25,80 ± 5,9 ^{b,d✧}	14,92 ± 3,0 ^{a✧}	33,62 ± 8,1 ^{c,e,f✧}	<0,0001

Resultados apresentados em mediana e AIQ.* Resultados apresentados em média ± DP.** CTRL=Grupo Controle, HAP= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar, SPS= Grupo Sepse, HPSPS= Grupo Hipertensão Arterial Pulmonar + Sepse. ✧ Comparação entre grupos, p-valor; p<0,05[✧], p<0,01[✧] e p<0,0001[✧]. a = (CTRL x SPS); b = (CTRL x HAP); c = (CTRL x HPSPS); d = (SPS x HAP); e = (SPS x HPSPS); f = (HAP x HPSPS).

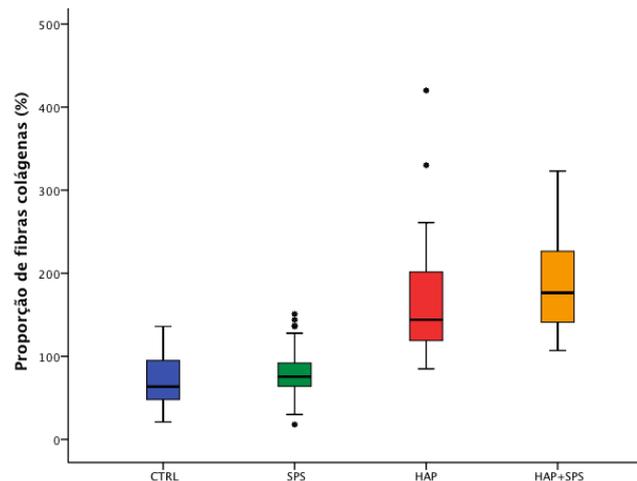


Figura 14. Proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar. \tilde{x} ± AIQ

Os valores obtidos para a espessura da camada arterial média, apresentaram diferença significativa em todos os grupos. Estes resultados, sinalizam um remodelamento expressivo da parede vascular pulmonar, característico das alterações morfológicas dos vasos pulmonares na HAP, nos grupos onde houve a indução da doença.

Adicionalmente, também foi encontrada diferença significativa na comparação do grupo SPS com os grupos onde houve indução da HAP (p<0,0001)

e no grupo onde a HAP estava associada à sepse ($p < 0,001$). O remodelamento foi menos expressivo, a despeito da significância nos resultados ($p < 0,05$), na comparação entre o grupo CTRL e grupo SPS. (Tabela 6, Figura 14)

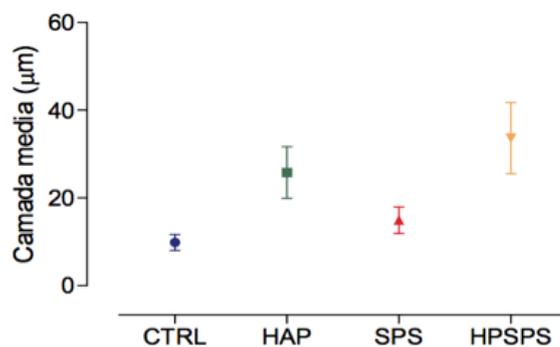


Figura 15. Valor da média \pm DP para a espessura da camada arterial média para os quatro grupos estudado

DISCUSSÃO

O propósito principal deste estudo, foi avaliar a repercussão da HAP e sepse sobre as propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos.

O principal achado deste estudo foi verificar que a sobreposição da HAP com a sepse, aumentou a variação total de pressão, a dissipação de energia no componente viscoelástico e nas propriedades elásticas em pulmões de ratos sem nenhuma doença pulmonar pré-existente. Este resultado, somado à demonstração histológica do aumento no remodelamento vascular e na proporção de fibras colágenas nos vasos pulmonares de ratos do grupo HPSPS, indica que esta condição produz inomogeneidades pulmonares.

Em adição, as duas doenças isoladamente e a sua sobreposição, não alteraram a dissipação de energia no componente newtoniano e não houve diferença nos componentes viscoelásticos e elásticos da parede torácica.

O estudo de HAP associado à sepse em modelo experimental, sem dúvida, pode ser considerado essencial no sentido de tentar compreender um pouco mais a fisiopatologia destas duas graves doenças e facilitar o entendimento dos mecanismos de ação e das consequências na sobreposição destas condições em seres humanos.

Não existe registro prévio na literatura de estudos experimentais ou clínicos semelhantes, envolvendo a associação entre HAP e sepse, sobretudo no que diz respeito ao comportamento dessa justaposição nas propriedades mecânicas do sistema respiratório.

A indução de HAP por monocrotalina, constitui-se de um modelo que habitualmente é utilizado para estudo de alterações pulmonares provocadas pela

doença. A monocrotalina (MCT), é um alcaloide de origem vegetal, isolado a partir da *Crotalaria spectabilis*, que causa lesão celular endotelial e, posteriormente, uma infiltração mononuclear maciça nas regiões perivasculares de artérias e arteríolas pulmonares quando injetadas em ratos. Embora a monocrotalina tenha sido empregada com frequência nas últimas cinco décadas, o seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.¹⁵

No modelo utilizado neste estudo, a injeção subcutânea de monocrotalina, induziu a HAP em 21 dias e está de acordo com os estudos de Cabrini⁵³ e Kolettis¹⁵. Apesar das lesões plexiformes típicas não serem normalmente encontradas na HAP induzida por monocrotalina, este é considerado o modelo padrão para a HAP experimental .

De outro lado, para a indução da sepse, o modelo mais amplamente utilizado é o *cecal ligation and puncture* (CLP). É reconhecido como um dos modelos com a maior compatibilidade em termos clínicos e reproduz muitas das manifestações clínicas de sepse.^{55,76,77} As limitações do modelo CLP estão na alta mortalidade e na dificuldade em controlar a quantidade de fuga fecal do intestino, desse modo, as manifestações sépticas podem variar numa gama bastante ampla. Além disso, a flora intestinal entre os animais pode não ser uniforme.^{57,78}

Os animais de todos os grupos apresentaram ganho ponderal ao longo das quatro semanas do experimento. Em animais do grupo controle é esperado ganho de peso ao longo do período do experimento, contudo, em relação aos grupos de intervenção, este dado está em discordância com o observado por Gout *et al*⁷⁹ e Schermuly *et al*⁸⁰ que observaram ganho de peso nos animais do grupo controle e diminuição de peso nos animais com HAP. Ambos atribuíram a perda de peso às consequências das alterações na atividade metabólica provocada pela HAP.

Em contrapartida, o sintoma mais comum da HAP é a intolerância ao esforço e fadiga pela diminuição do débito cardíaco, o que poderia explicar, em parte, o aumento de peso verificado nos animais deste estudo, contudo, não foi observado se o ganho de peso foi contínuo ao longo do experimento ou se sofreu

variação ao longo das semanas, por influência do desenvolvimento da HAP, da sepse ou de ambas. Outra possibilidade para o aumento do peso poderia estar ligada à insuficiência ventricular direita, por congestão sistêmica e redução do volume circulante efetivo nos animais do grupo intervenção.

Nos animais do grupo sepse, uma possível justificativa para o ganho ponderal poderia ser o estado catabólico associado à doença e a ocorrência de peritonite, o que levaria os animais a uma diminuição da atividade física.⁸¹ A ocorrência de abscesso intra-abdominal também não pode ser descartada.⁸¹

Um estudo de Alexander et al⁸², apontou peso semelhante nos grupos controle e sepse.

Lourenço *et al*⁸³, reportou a perda de peso em ratos na sexta semana após a injeção de monocrotalina, no entanto, na quarta semana, o peso dos animais foi similar ao do grupo controle.

Outra possível explicação sobre a variação no comportamento do peso em animais sépticos, foi descrita nos estudos de Xiao *et al*⁸⁴ onde foi observado um aumento no peso corporal no dia anterior à morte dos animais que morreram na fase aguda, durante os primeiros quatro dias após a ligação e perfuração do ceco. Nos estágios mais avançados de sepse, porém, os ratos perderam peso, tendo uma perda substancial de peso corporal, entre 1 a 2 dias antes da morte.

Quanto aos dados obtidos neste estudo, os dados da literatura foram discordantes para a HAP, inconclusivos para a sepse e ausentes na associação das duas doenças.

O modelo experimental de indução de HAP por meio da administração subcutânea de MCT em ratos Wistar, utilizado neste estudo, foi capaz de elevar a PS_{VD} a valores, evidentemente, compatíveis com a hipertensão pulmonar.

No estudo hemodinâmico, a predição da pressão na artéria pulmonar foi obtida por meio da pressão sistólica do ventrículo direito pelo método direto, com a canulação do ventrículo direito em animais anestesiados com o tórax aberto.

Está bem documentado tanto na clínica como em estudos experimentais que as propriedades mecânicas pulmonares são profundamente influenciadas pela hemodinâmica pulmonar, especialmente pela pressão capilar pulmonar.⁸⁵⁻⁸⁹

Em nosso modelo, foi possível confirmar a presença de HAP nos grupos de intervenção onde foi utilizada a monocrotalina, HAP e HPSPS, respectivamente e observar que a diferença nos valores da pressão sistólica entre os grupos foi significativa ($p < 0,05$).

Esses dados concordam com os dados publicados por Dumitrascu *et al*⁹⁰, onde foi comparada a pressão no grupo monocrotalina ($59,60 \pm 2,93$ mmHg) em relação ao controle ($25,08 \pm 1,35$ mmHg), com a confirmação da presença de HAP no grupo monocrotalina, sem obter, contudo, diferença significativa entre os grupos.

No estudo de Dumitrascu⁹⁰, a medida foi realizada com o tórax fechado, por inserção de um cateter acoplado a um transdutor de pressão na veia jugular direita dos animais para alcançar o VD.

A mesma técnica foi empregada por Gava *et cols*⁹¹ que encontrou resultados semelhantes para o grupo monocrotalina (45 ± 2 mmHg) em relação ao controle (26 ± 1 mmHg). Polônio *et cols*⁹², também encontrou variabilidade nas medidas da pressão, confirmando a HAP, sem obter diferença estatística entre os grupos, por meio de outra técnica: a inserção de um microcateter, acoplado a um transdutor de pressão na veia jugular direita para obter, diretamente, a pressão da artéria pulmonar (PAP).

No que diz respeito aos resultados hematológicos, utilizamos uma análise exploratória, com o intuito de obter maior entendimento sobre o comportamento das variáveis hematológicas, essencialmente, àquelas indicativas de inflamação e infecção na sobreposição da HAP e da sepse.

Os resultados demonstraram concordância com os valores de referência para os animais do grupo CTRL, todavia, nos demais grupos, embora seja possível observar diferença entre os valores apresentados em relação aos valores

de referência estabelecidos, não é possível explicar tais diferenças ou relacioná-las com a HAP e a sepse ou com a sobreposição destas.

Dados de Remick *et al*⁹³, apontam para uma redução na contagem de glóbulos brancos totais e uma redução específica de linfócitos no sangue de animais com sepse na fase crônica em comparação com animais na fase aguda, mais precisamente, 26 horas após a ligação e punção do ceco. Xiao *et al*⁸⁴, verificou uma leucopenia inicial, seguida por um aumento na contagem de células brancas do sangue que persistiu até ao final do estudo. Este resultado foi relacionado ao aumento de linfócitos, monócitos e os neutrófilos.

Após uma diminuição inicial, a contagem de neutrófilos aumentou e os níveis mais elevados foram observados em ratos que morreram na fase crônica da sepse. O autor⁸⁴ também observou uma correlação positiva entre os níveis de neutrófilos e o tamanho do abscesso intra-abdominal.

Os neutrófilos são os mais abundantes glóbulos brancos circulantes no homem, e são efetores principais da resposta imune inata, sob estímulos específicos, mobilizam-se para para os pulmões e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por sepse.⁹⁴

A vasculatura pulmonar saudável pode desempenhar um papel importante por meio da retenção seletiva de neutrófilos imunizados e liberando-os de volta para a circulação sistêmica em um estado inativo⁹⁵.

Summers *et al*⁹⁵, demonstraram que este mecanismo parece falhar em pacientes com SARA, levando a níveis elevados os neutrófilos injetados na circulação sistêmica, proporcionando, assim, um mecanismo potente para danos em órgãos à distância. Desse modo, é possível especular que o mesmo mecanismo possa ocorrer na HAP, uma vez que os neutrófilos também estão envolvidos no processo inflamatório da doença onde é possível encontrar extensos infiltrados periarteriais com macrófagos e linfócitos T em torno das artérias pulmonares periféricas⁹⁶ e ainda, podemos supor que este mecanismo seja potencializado na associação da sepse com a HAP.

Além disso, na HAP, a hipertrofia da camada arterial média nas arteríolas, o aumento da permeabilidade vascular e a microtrombose difusa, facilitam a infiltração leucocitária adjacente a bronquíolos, alvéolos, linfócitos, histiócitos e polimorfonucleares permeando a parede dos vasos^{97,98}

Alterações nas trocas gasosas, por colapso dos espaços aéreos em razão de fluidos inflamatórios é uma causa bem documentada da ocorrência de SARA em pacientes com sepse.⁹⁹

Em nosso estudo, a alteração mais significativa para o grupo SPS, foi o aumento na dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar ($\Delta P_{2,L}$), o que sugere uma distribuição desigual na ventilação pulmonar no grupo SPS em relação ao grupo CTRL, ratificando as evidências. Também puderam ser observadas alterações significativas nas propriedades elásticas, indicando uma diminuição na complacência pulmonar entre o grupo SPS e o grupo CTRL, o que concorda com os dados publicados por Castiello *et al*¹⁰⁰, sobre a diminuição na complacência pulmonar em modelo experimental de sepse, ainda que este estudo tenha empregado uma técnica diferente na indução da sepse, utilizando o agente *E.coli*.

O mesmo estudo também não encontrou alterações na pressão resistiva pulmonar, dados concordantes aos encontrados em nosso estudo.

Carvalho *et al*.¹⁰¹, avaliou alterações na mecânica pulmonar de camundongos com sepse subletal e letal, induzidas por ligação e punção do ceco e não foram observadas alterações nas propriedades mecânicas pulmonares em ambos os grupos.

Muito embora o estudo tenha sido realizado em camundongos, podendo haver diferenças consideráveis quanto tempo, ao peso, idade e outras características morfológicas em relação aos ratos Wistar, utilizados neste estudo, a principal justificativa do autor para a ausência de alterações foi o curto espaço de tempo entre a indução da sepse e a medida das propriedades mecânicas, que foi de apenas oito horas o que difere de nosso estudo quanto ao tempo de indução da sepse e avaliação das propriedades mecânicas que foi de sete dias.

O valor de ΔP_{2sr} , é afetado pelas alterações nas propriedades viscoelásticas dos tecidos pulmonares, da parede torácica, e por desigualdades nas constantes de tempo. Isso pode explicar algumas alterações isoladas neste componente do sistema respiratório, como a observada no grupo SPS quando comparada ao grupo HPSPS e na comparação entre o grupo HPSPS e o grupo CTRL.

Na HAP as limitações funcionais são causadas, principalmente, por insuficiência cardíaca direita progressiva e comprometimento na troca gasosa.¹⁰²

A filtração capilar observada na HAP, acentua o edema alveolar e promove a diminuição do tamanho do alvéolo, reduzindo a relação gás-tecido. Sob o efeito da gravidade, as porções dependentes do pulmão estão sujeitas a uma pressão externa, atuando no sentido do colapso alveolar. Ainda neste sentido, o volume corrente tende a se distribuir pelas áreas superiores, ou “abertas” em detrimento das áreas inferiores.^{79,103}

Como a disfunção do sistema respiratório e de seus componentes pode influenciar a evolução da doença vascular pulmonar, é importante monitorar o curso da HAP, bem como, avaliar a repercussão na mecânica respiratória.¹⁰⁴ Apesar disso, não foram localizados na literatura estudos prévios sobre a mecânica pulmonar na HAP.

Nosso estudo mostra alterações significativas na dissipação de energia do componente viscoelástico pulmonar e na elastância pulmonar, no grupo HAP, corroborando para as diferenças na elastância do sistema respiratório quando comparadas ao grupo CTRL.

Na literatura, estudos sobre a mecânica do sistema respiratório em ratos com HAP e na associação da HAP com a sepse não foram previamente investigados. Utilizando o método de oclusão ao final da inspiração associado à medida da pressão esofágica, fomos capazes de investigar o impacto mecânico induzido pelo HAP experimental e pela associação desta com a sepse, no sistema respiratório e em seus componentes, pulmão e na parede torácica.

Assim como no grupo HAP, houve um aumento na dissipação de energia do componente viscoelástico pulmonar e na elastância pulmonar nos animais do grupo HPSPS, quando comparados ao grupo CTRL.

O aumento em ΔP_2L nos animais do grupo HAP e HPSPS, possivelmente, está associada a heterogeneidades mecânicas e ao *stress relaxation*, pela distribuição anormal do surfactante em decorrência do edema alveolar provocado pelo intenso processo inflamatório observado nas duas doenças individualmente e potencializado na associação delas.

Nesse sentido, é possível levantar a hipótese de que a complacência sofre variação entre as diferentes regiões alveolares promovendo alterações na constante de tempo e levando ao aumento na dissipação de energia no componente viscoelástico pulmonar.

Embora os parâmetros mecânicos do pulmão tenham demonstrado alterações relevantes induzidas pela HAP experimental e pela associação desta à sepse, os componentes viscoso, viscoelástico e elástico da parede torácica não se alteraram e, como consequência disso, as alterações no sistema respiratório, referentes a variação total de pressão e dissipação de energia nos componentes viscoelásticos e elásticos foram influenciadas, diretamente, pelas alterações nas variáveis pulmonares.

Ainda que este estudo não tenha avaliado o perfil pró-trombótico nas duas condições, não se pode descartar a hipótese de a associação da HAP à sepse intensifique eventos trombóticos na microcirculação pulmonar, reduzindo a área de leito vascular pulmonar disponível para o fluxo sanguíneo e que este fato possa ter influência sobre as alterações nas variáveis mecânicas do sistema respiratório.²³

No que diz respeito aos indicadores de edema pulmonar, razão entre o peso úmido e o peso seco dos pulmões, as diferenças significativas notadas entre os grupos de estudo, poderiam ser explicadas pelas alterações histopatológicas pulmonares promovidas pela monocrotalina, que dentro do período de vinte e um

dias, leva a um aumento na permeabilidade capilar, resultando em edema intersticial e alveolar.^{15,54}

A hipertrofia miocárdica, por sua vez, pode ser decorrente de processos adaptativos do tecido cardíaco, quando submetido à sobrecarga de trabalho, imposta ao ventrículo direito pelo aumento na resistência vascular pulmonar (RVP) em pacientes com HAP. Um fator confundidor para a hipertrofia do VD, é a gênese de miocardite diretamente relacionada à administração de monocrotalina.¹⁰⁵

Embora seja possível especular que a diferença encontrada na relação entre o peso úmido e o peso seco do coração neste estudo seja atribuída à hipertrofia do VD, esta hipótese não pode ser confirmada, sendo necessário, para tanto, realizar um estudo histológico detalhado das câmaras cardíacas para mensuração da espessura ventricular direita, o que não foi realizado neste estudo por não contemplar os objetivos inicialmente propostos.

Embora nenhum modelo experimental reproduza completamente as alterações histopatológicas da hipertensão pulmonar humana, as lesões histológicas provocadas pela monocrotalina são semelhantes às lesões típicas da hipertensão pulmonar, resultante de etiologia diversa, especialmente, no que diz respeito às mudanças estruturais, incluindo a proliferação de músculo liso medial em pequenas artérias pulmonares¹⁰⁶

Frente aos estímulos provocados pela monocrotalina na indução da HAP experimental, os vasos pulmonares respondem ao estímulo dos mediadores inflamatórios, como as citocinas e os fatores de crescimento, levando ao remodelamento vascular pulmonar com hipertrofia da túnica média, espessamento fibroso da adventícia e redução do lúmen do vaso.^{80,98}

A disfunção pulmonar ocasionada pela sepse, com alterações na permeabilidade alvéolo-capilar e extravasamento para o interior dos alvéolos, frequentemente evoluem para a SARA. Um estudo de Thomashefsky *et al*, em pacientes com a síndrome, demonstrou alterações na extensão periférica do

músculo liso vascular e um aumento significativo no percentual da espessura da camada média das artérias pulmonares.¹⁰⁷

A intensidade do remodelamento vascular pulmonar é usualmente medida pela espessura da camada arterial média. Nossos achados, foram semelhantes aos encontrados por Langleben *et al*¹⁰⁸ quanto à espessura da camada arterial média no grupo monocrotalina (25,5 $\mu\text{m} \pm 2,8$) mas apresentaram diferença no grupo controle (17,2 $\mu\text{m} \pm 2,7$) em artérias pulmonares pré-acinares distais. No estudo de Langleben¹⁰⁸, não foram encontradas diferenças entre a espessura da camada arterial média nas artérias pré-acinares proximais e distais.

A camada arterial média é composta pela deposição de componentes da matrix extracelular como as fibras colágenas, elásticas e os preteoglicanos.¹⁰⁹

Em nosso estudo houve um aumento significativo na proporção de fibras colágenas, assim como na espessura da camada arterial média na comparação entre os quatro grupos. Diversos estudos^{15,19,53,54,90} na literatura apontam para o aumento na quantidade de fibras colágenas nos vasos pulmonares em modelos experimentais de HAP induzida por monocrotalina.

A maior quantidade de fibras colágenas foi encontrada nos grupos HAP e HPSPS.

Pudemos observar diferença significativa ($p < 0,05$) na espessura da camada arterial média do grupo SPS quando comparado ao grupo CTRL, todavia, não foi observado aumento na proporção de fibras colágenas entre os dois grupos.

É importante ressaltar que ao se estudar modelos experimentais de HAP, é preciso ter em mente que por melhor que seja o modelo, ele não consegue mimetizar, de maneira fidedigna, a HAP em seres humanos. O tempo de instalação da doença em humanos, pode levar anos, enquanto em animais, são necessárias apenas três semanas. Nisso implica, por exemplo, a ausência de lesões vasculares pulmonares, como as lesões plexiformes, nos modelos animais utilizando monocrotalina.

A interpretação cautelosa de estudos experimentais é obrigatória, e é preciso reconhecer os pontos fortes e fracos do modelo animal e os riscos da extrapolação para humanos com HAP.

CONCLUSÃO

1. A dissipação de energia no componente viscoelástico e a elastância aumentam significativamente em pulmões de ratos com HAP, sepse e na associação entre HAP e sepse;
2. A variação total da pressão aumentou significativamente em pulmões de ratos com HAP e na associação entre HAP e sepse.
3. A variação total da pressão, a dissipação de energia no componente viscoelástico e a elastância dinâmica aumentaram significativamente no sistema respiratório de ratos com associação entre HAP e sepse;
4. A elastância estática aumentou significativamente no sistema respiratório de ratos com HAP;
5. Não houve variações significativas no componente viscoso do sistema respiratório e de seus componentes, pulmão e parede torácica;
6. A proporção de fibras colágenas aumentou significativamente em arteríolas pulmonares de ratos com HAP e na HAP associada à sepse;
7. O remodelamento da parede vascular pulmonar foi significativamente maior nos vasos pulmonares de ratos com HAP e na associação entre HAP e sepse;

8. O remodelamento da parede vascular pulmonar foi mais intenso em ratos com HAP associada à sepse quando comparado a ratos com HAP somente;

REFERÊNCIAS

1. Galiè, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the Internat. *Eur. Heart J.* **30**, 2493–537 (2009).
2. Humbert, M. More pressure on pulmonary hypertension. *Eur. Respir. Rev.* **18**, 1–3 (2009).
3. McGoon, M. D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D51–9 (2013).
4. Perros, F., Balabanian, K., Humbert, M. & Dorfmüller, P. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **22**, 358–363 (2003).
5. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. & Flores, S. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin. Chest Med.* **28**, 23–42, vii (2007).
6. Souza, R. & Simonneau, G. *Pulmonary Vascular Disorders*. (S. Karger AG, 2012).
7. Stacher, E. *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 261–272 (2012).
8. Humbert, M. *et al.* Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. **43**, (2004).
9. Tuder, R. M. *et al.* Development and Pathology of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S3–S9 (2009).
10. RM, T. *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* **195**, 367–374 (2001).
11. Van Albada, M. E. *et al.* The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **26**, 487–93 (2005).
12. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 97 (2013).
13. Stenmark Neil Frid, Maria Gerasimovskaya, Evgenia Das, Mita, K. R. D. Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling. *Physiology* **21**, 134–145 (2006).

14. Runo, J. R. & Loyd, J. E. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* **361**, 1533–44 (2003).
15. Kolettis, T. *et al.* Characterisation of a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Hellenic J. Cardiol.* **48**, 206–10 (2007).
16. Abe, K. *et al.* Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **121**, 2747–54 (2010).
17. Dickinson, M. G., Bartelds, B., Borgdorff, M. A. J. & Berger, R. M. F. The role of disturbed blood flow in the development of Pulmonary Arterial Hypertension: Lessons from preclinical animal models. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* (2013). doi:10.1152/ajplung.00031.2013
18. El Chami, H., Hassoun, P. M. & Chami, H. El. Immune and Inflammatory Mechanisms in Pulmonary Arterial Hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* **55**, 218–228 (2013).
19. Savai, R. *et al.* Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 897–908 (2012).
20. Dorfmueller, P. & Humbert, M. Progress in pulmonary arterial hypertension pathology: relighting a torch inside the tunnel. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 210–2 (2012).
21. ME, Y., GR, H., HA, G., NF, V. & RM, T. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circ Res* **88**, E2–E11 (2001).
22. Yeager, M. E., Frid, M. G. & Stenmark, K. R. Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulm. Circ.* **1**, 3–16 (2011).
23. Herve, P. *et al.* Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin. Chest Med.* **22**, 451–8 (2001).
24. Farber, H. W. & Loscalzo, J. Prothrombotic mechanisms in primary pulmonary hypertension. *J. Lab. Clin. Med.* **134**, 561–6 (1999).
25. Farber, H. W. & Loscalzo, J. Pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1655–65 (2004).
26. Otterdal, K. *et al.* Raised LIGHT levels in pulmonary arterial hypertension: potential role in thrombus formation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 202–7 (2008).
27. Johnson, S. R., Granton, J. T. & Mehta, S. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* **130**, 545–52 (2006).
28. White, R. J. Thrombin and Platelets in Pulmonary Hypertension : A Lot More Than Clot. 19–24

29. Aytekin, M. *et al.* Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L512–20 (2012).
30. Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D34–41 (2013).
31. Thenappan, T., Ryan, J. J. & Archer, S. L. Evolving Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 707–709 (2012).
32. GS, M., DM, M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**, 1546–1554 (2003).
33. Peacock, a J., Murphy, N. F., McMurray, J. J. V, Caballero, L. & Stewart, S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **30**, 104–9 (2007).
34. GE, D. *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **115**, 343–349 (1991).
35. DB, B. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* **137**, 376–387 (2010).
36. Hoeper, M. M. & Granton, J. Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 1114–1124 (2011).
37. Rivers, E. *et al.* Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1368–1377 (2001).
38. CF, L., TE, P., AJ, C., KA, N. & ZS, K. Functional adaptation and remodeling of pulmonary artery in flow-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **289**, H2334–H2341 (2005).
39. Stevenson, E. K., Rubenstein, A. R., Radin, G. T., Wiener, R. S. & Walkey, A. J. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit Care Med* **42**, 625–631 (2014).
40. Sztrymf, B. *et al.* Prognostic factors of acute heart failure in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **35**, 1286–93 (2010).
41. Linde-Zwirble, W. T. & Angus, D. C. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit. Care* **8**, 222–6 (2004).
42. RP, D. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* **34**, 17–60 (2008).
43. Price, L. C., Wort, S. J., Finney, S. J., Marino, P. S. & Brett, S. J. Pulmonary vascular and right ventricular dysfunction in adult critical care: current and emerging options for management: a systematic literature review. *Crit. Care* **14**, R169 (2010).

-
44. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–51 (2013).
 45. Happel, K. I., Nelson, S. & Summer, W. The lung in sepsis: fueling the fire. *Am. J. Med. Sci.* **328**, 230–7 (2004).
 46. Winkelman, C. Inactivity and inflammation in the critically ill patient. *Crit. Care Clin.* **23**, 21–34 (2007).
 47. Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 536–45 (2008).
 48. Bernard, G. R. *et al.* Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 699–709 (2001).
 49. Tauil, K., Gaio, E., Melo-Silva, C. A. & Carvalho, R. S. Pulmonary arterial hypertension and sepsis : Prothrombotic profile and inflammation can changes pulmonary mechanics ? *Med. Hypotheses* 5–6 (2014). doi:10.1183/09031936.03.00038903>.
 50. Raymundo, M. M. & Goldim, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética* **10**, 31–44 (2002).
 51. Sarmiento, E. O. Biossegurança e Experimentação Animal. (2005).
 52. Rezende, R. M. *et al.* Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 760–8 (2008).
 53. Cabrini, F. P. H. Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação eletrocardiográfica. (2009).
 54. White, S. & Roth, R. *Progressive lung injury and pulmonary hypertension from monocrotaline.* 75–91 (CRC Press, 1989).
 55. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **4**, 31–36 (2009).
 56. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2008).
 57. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* **30 Suppl 1**, 53–9 (2008).
 58. Correa, G. F. & Zapparoli, A. Modelo experimental em roedores. Ligadura e perfuração cecal. *Rev. Eletrônica Farmácia* **IX**, 67–72 (2012).
 59. Gardner, R. M. Ovid : Accuracy and reliability of disposable pressure transducers coup ... Accuracy and reliability of disposable pressure transducers coupled with modern pressure monitors Ovid : Accuracy and reliability of disposable pressure transducers coup ... *Crit. Care Med.* **24**, 879–882 (1996).

-
60. Mount, L. E. The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. *J. Physiol.* **127**, 157–167 (1955).
 61. Otis, a B. *et al.* Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. *J. Appl. Physiol.* **8**, 427–43 (1956).
 62. Mead, J. Contribution of compliance of airways of lungs to frequency-dependent behavior. *J. Appl. Physiol.* **26**, 670–673 (1969).
 63. Similowski, T. & Bates, J. H. Two-compartment modelling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? *Eur. Respir. J.* **4**, 353–8 (1991).
 64. Similowski, T. *et al.* Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. *J. Appl. Physiol.* **67**, 2219–29 (1989).
 65. Bates, J. H. *Lung Mechanics. An Inverse Modeling Approach.* 218 (Cambridge University Press, 2009).
 66. Angelo, E. *et al.* Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **67**, 2556–2564 (1989).
 67. Bates, J. H., Rossi, a & Milic-Emili, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J. Appl. Physiol.* **58**, 1840–8 (1985).
 68. Kochi, T., Okubo, S., Zin, W. a & Milic-Emili, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J. Appl. Physiol.* **64**, 2636–46 (1988).
 69. Kochi, T., Okubo, S., Zin, W. a & Milic-Emili, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J. Appl. Physiol.* **64**, 441–50 (1988).
 70. Bates, J. H. *et al.* Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J. Appl. Physiol.* **65**, 408–14 (1988).
 71. Melo e Silva, C. A. & Ventura, C. E. G. D. S. A simple model illustrating the respiratory system's time constant concept. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 129–30 (2006).
 72. Bates, J. H., Baconnier, P. & Milic-Emili, J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **64**, 2204–2214 (1988).
 73. Baydur, A., Behrakis, P. K., Zin, W. A., Jaeger, M. & Milic-Emili, J. A simple method for assessing the validity of the esophageal balloon technique. *Am. Rev. Respir. Dis.* **126**, 788—791 (1982).
 74. Iotti, G. A. & Braschi, A. *Monitorização da Mecânica Respiratória.* 139 (Editora Atheneu, 2004).
 75. GUNDERSEN, H. J. G. *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 379–394 (1988).

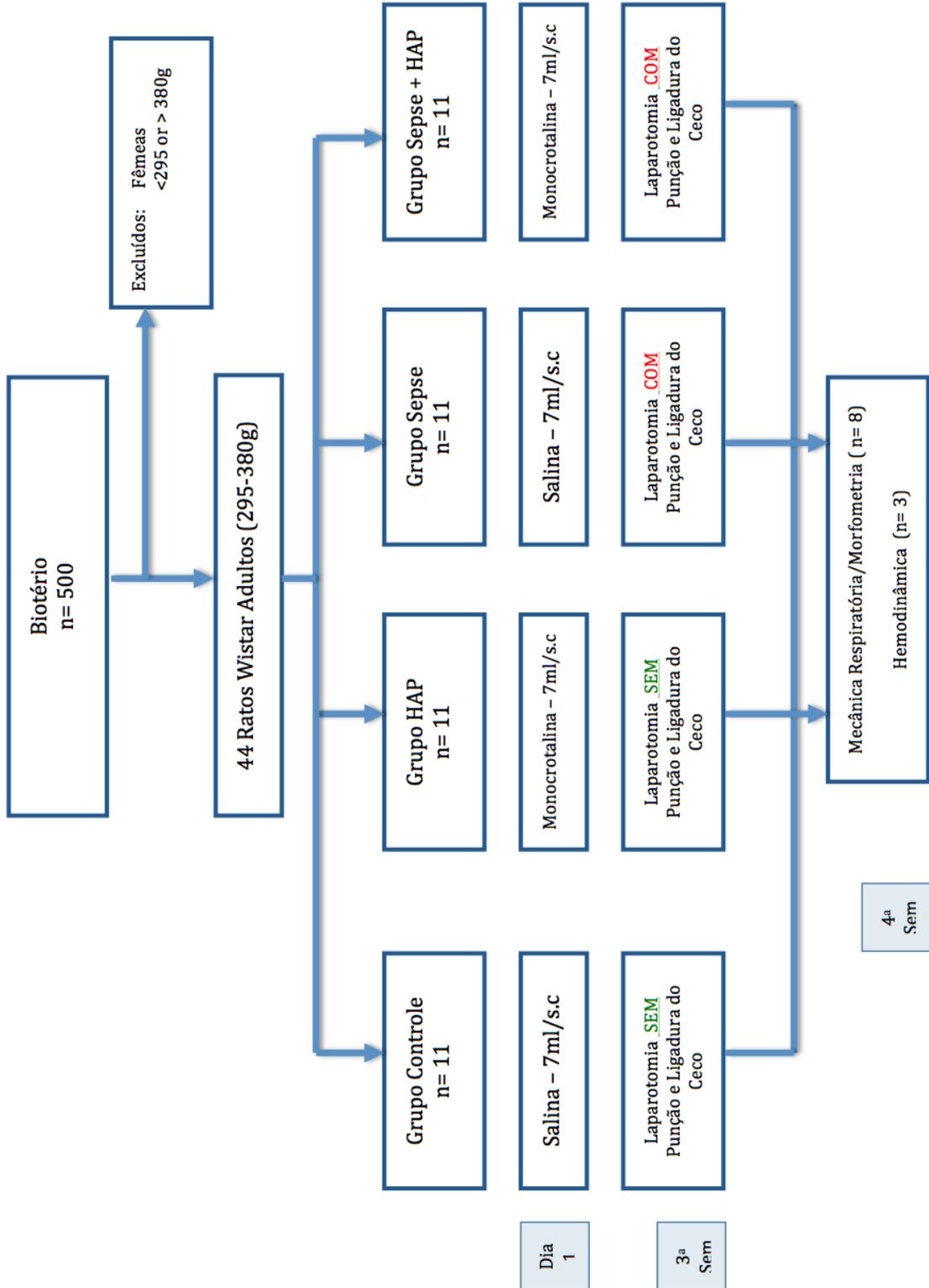
-
76. Buras, J. a, Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 854–65 (2005).
 77. Deitch, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* **24 Suppl 1**, 19–23 (2005).
 78. Popov, D. & Pavlov, G. Sepsis Models in Experimental Animals. *Trakia J. Sci.* **11**, 13–23 (2013).
 79. Gout, B., Quiniou, M.-J., Khandoudi, N., Dantec, C. Le & Saïag, B. Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries. *Eur J Pharmacol* **380**, 23–30 (1999).
 80. Schermuly, R. T. *et al.* Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 39–45 (2004).
 81. Baker, C. C., Chaudry, I. H., Gaines, H. O. & Baue, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* **94**, 331–335 (1983).
 82. Alexander, J. W., Gonce, S. J., Miskell, P. W., Peck, M. D. & Sax, H. A new model for studying nutrition in peritonitis. The adverse effect of overfeeding. *Ann Surg* **209**, 334–340 (1989).
 83. Lourenço, A. P., Fontoura, D., Henriques-Coelho, T. & Leite-Moreira, A. F. Current pathophysiological concepts and management of pulmonary hypertension. *Int. J. Cardiol.* **155**, 350–61 (2012).
 84. Xiao, H., Siddiqui, J. & Remick, D. G. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect. Immun.* **74**, 5227–35 (2006).
 85. Freezer, N. J., Lanteri, C. J. & Sly, P. D. Effect of pulmonary blood flow on measurements of respiratory mechanics using the interrupter technique. *J Appl Physiol* **74**, 1083–1088 (1993).
 86. Peták, F., Habre, W., Hantos, Z., Sly, P. D. & Morel, D. R. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. 169–178 (2013).
 87. Peták, F. *et al.* Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. 169–178 (2011).
 88. Peták, F., Habre, W., Hantos, Z., Sly, P. D. & Morel, D. R. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* **92**, 169–178 (2002).
 89. Peták, F. *et al.* Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L879–L889 (2004).

-
90. Dumitrascu, R. *et al.* Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm. Med.* **8**, 25 (2008).
 91. Gava, P. L. Avaliação Cardiovascular e Respiratória de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida pela Monocrotalina. (2010).
 92. Polonio, I. B. Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar. (2012).
 93. Remick, D. G. Pathophysiology of Sepsis. *Am J Pathol* **170**, 10 (2007).
 94. Guo, R.-F. *et al.* Altered Neutrophil Trafficking During Sepsis. *J. Immunol.* **169**, 307–314 (2002).
 95. Summers, C. *et al.* Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* **69**, 623–629 (2014).
 96. Rose, F. *et al.* Increased neutrophil mediator release in patients with pulmonary hypertension - suppression by inhaled iloprost. *Thromb. Haemost.* **90**, 1141–1149 (2003).
 97. Miyauchi, T. *et al.* Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **73**, 887–897 (1993).
 98. Kanno, Y. *et al.* Does combined therapy of Ca-channel blocker and angiotensin converting enzyme inhibitor exceed monotherapy in renal protection against hypertensive injury in rats? *Clin Exp Hypertens* **18**, 243–256 (1996).
 99. Guo, Y., Cernacek, P., Giaid, a & Hussain, S. N. Production of endothelins by the ventilatory muscles in septic shock. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 470–6 (1998).
 100. Castiello, A., Paterson, J. F., Shelley, S. A., Haller, E. M. & Balis, J. U. Depletion of surfactant tubular myelin with pulmonary dysfunction in a rat model for acute endotoxemia. *Shock* **2**, 427–432 (1994).
 101. Carvalho, R., Pinho, AM., Andrade, AA., Augusto, C., Silva, M. E., Gaio, C. E. & Tavares, P. Análise da mecânica pulmonar em modelo experimental de sepsis. *J. Bras. Pneumol.* **32**, 316–321 (2006).
 102. Gillespie, M. N., Frederick, W. B., Altieri, R. J., Olson, J. W. & Kimmel, E. C. Pulmonary Mechanical, Ventilatory, and Gas Exchange Abnormalities in Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Exp Lung Res* **8**, 191–199 (1985).
 103. Hoelz, C. *et al.* Morphometric Differences in Pulmonary Lesions in Primary and Secondary ARDS: A Preliminary Study in Autopsies. *Pathol Res Pr.* **197**, 521–530 (2001).

-
104. Katzman, N. J. & Lai, Y. L. Capsaicin pre- and post-treatment on rat monocrotaline pneumotoxicity. *Chin. J. Physiol.* **43**, 171–8 (2000).
 105. Kögler, H. *et al.* Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* **93**, 230–237 (2003).
 106. Leineweber, K. *et al.* Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**, 333–342 (2003).
 107. Tomashefski, J. F. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* **11**, 593–619 (1990).
 108. Langleben, D. *et al.* Altered artery mechanics and structure in monocrotaline pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* **65**, 2326–2331 (1988).
 109. Rabinovitch, M., Gamble, W., AS, N., OS, M. & Reid, L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* **236**, H818–H827 (1979).

Apêndice A

FLUXOGRAMA



Anexo A

ARTIGO PUBLICADO
