

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

ALINE MORÁS BORGES

**PORTO ALEGRE
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA - FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS**

**DESAFIOS E PERSPECTIVAS DO MODELO PORCINO
DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR ÁCIDO OLEICO**

ALINE MORÁS BORGES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Cristiano Feijó Andrade

**PORTO ALEGRE
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Borges, Aline Morás

Desafios e perspectivas do modelo porcino de lesão pulmonar induzida por ácido oleico / Aline Morás Borges. -- 2018.

49 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. lesão pulmonar. 2. ácido oleico. 3. experimento animal. I. Andrade, Cristiano Feijó, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Adelita e Jorge, os quais sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as minhas escolhas e decisões. Deram-me todo apoio e amor incondicional, nunca medindo esforços para que eu realizasse todos os meus objetivos e sonhos. Obrigada por me inspirarem todos os dias a ser a minha melhor versão.

A minha irmã Francine pelo maior presente que me deu, nossa pequena e abençoada Helena. A dinda te ama!

Ao Tássio pelo companheirismo nesta jornada e na vida! Obrigada por acreditar e nunca desistir de mim e pelas incansáveis viagens para diminuir a distância física entre nós.

A Bela, minha filha de quatro patas. Obrigada por tornar meus dias menos solitários e obrigada pelo amor incondicional.

A todos, meu muito obrigada. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cristiano Feijó Andrade, meu orientador, por ter me recebido tão bem no grupo de pesquisa, pela grandiosa paciência desde a concepção deste trabalho até a sua redação final, pelo incentivo e por acreditar no meu potencial.

A professora Elaine Aparecida Félix, por todo o suporte no início da fase experimental do projeto.

A Renata Sallati Ferrari, uma amiga com a qual a vida me presenteou. Sou imensamente grata por todo o suporte dado em todas as fases deste trabalho.

Ao Leonardo Rocha pelo incansável trabalho na fase experimental deste trabalho. Agradeço o seu trabalho exemplar e a sua dedicação.

A Marta e a toda a equipe da Unidade de Experimentação Animal durante os experimentos e pelo pronto auxílio sempre que necessário.

A Jane pelo auxílio fundamental nas análises histológicas.

A Daiane por todo o suporte durante a análise estatística, pela paciência e por todos os ensinamentos passados nessa fase. Você foi fundamental para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA).....	16
3. MODELOS DE LESÃO PULMONAR.....	20
4. ÁCIDO OLEICO	23
4.1 LESÃO PULMONAR E ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELO AO.....	23
4.2 ALTERAÇÕES A NÍVEL CELULAR	24
5. CASPASES.....	25
6. JUSTIFICATIVA	26
7. OBJETIVOS.....	27
7.1 OBJETIVO GERAL.....	27
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
9. ARTIGO	31
10. CONCLUSÃO.....	49
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AO – Ácido Oleico

ATP – Adenosina Trifosfato

cmH₂O – centímetros de água

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”

FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio

FR – Frequência Respiratória

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 – Interleucina-10

ivpm – incursões ventilatórias por minuto

LPS - Lipopolissacarídeo

mg – miligramas

mL – mililitros

mmHg – milímetros de mercúrio

Kg – quilograma

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PaCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PaO₂/FiO₂ – Pressão parcial de oxigênio arterial/fração inspirada de oxigênio

PCV: Ventilação controlada a pressão, do inglês “pressure control ventilation”

PEEP – Pressão expiratória positiva final, do inglês “positive and-expiratory pressure”

P_{ET}CO₂: Pressão expiratória final do dióxido de carbono

Relação I:E – Relação inspiração/expiração

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

VT – Volume corrente, do inglês “Tidal volume”

LISTA DE TABELAS

Table 1: Hemodynamic and ventilatory variables, data of gas exchange during experiment.	41
--	----

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1. Fisiopatologia da SDRA- Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.....	19
Figura 2. Mediadores inflamatórios envolvidos na SDRA induzida pelo ácido oleico.....	24

ARTIGO

Figure 1. Survival curves of time free-events after induction acute lung injury by oleic acid.....	43
Figure 2. Expression of histological changes in different regions of pulmonary parenchima. RUL, right upper lobe; RLL, right lower lobe; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe.....	44
Figure 3. Representative microscopic findings of histological changes in lung injury are placed below each graph.....	45
Figure 4. Expression of IL-6 and IL-8 in lung tissue. RUL, right upper lobe; RLL, right lower lobe; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe. The top bar graphs (A and B) represent the samples of each pulmonary lobe compared to healthy control. The botton bar graphs (D and E) represent the samples from upper lobes and lower lobes.....	46
Figure 5. Figure 5: Expression of Caspase 3 in lung tissue by the immunohistochemistry. Healthy control lung (A). There was an increase in Caspase 3 in macrophage (B) and respiratory epithelium (C).....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais semelhanças, diferenças e questões técnicas dos modelos de SDRA.....	21
---	----

RESUMO

Introdução: A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma doença pulmonar grave decorrente de vários insultos locais ou sistêmicos que acarretam lesão da estrutura alvéolo-capilar. Vários modelos animais de lesão pulmonar foram desenvolvidos na tentativa de simular a SDRA humana com o objetivo de estudar seu mecanismo e potenciais tratamentos. O modelo de ácido oleico (AO) reproduz as características básicas da SDRA de forma precoce com alterações da permeabilidade capilar e comprometimento na troca gasosa e na mecânica pulmonar, produzindo uma lesão pulmonar que é morfológicamente heterogênea.

Objetivo: Descrever o modelo de lesão pulmonar em suínos após administração de AO, avaliar os efeitos sobre mecânica respiratória, alterações hemodinâmicas, histologia e troca gasosa, bem como determinar os desafios no seu desenvolvimento.

Métodos: Foram utilizados 10 porcos da raça Large White, os quais foram anestesiados e colocados em ventilação mecânica, sendo submetidos a lesão pulmonar através da infusão endovenosa de AO na artéria pulmonar. A lesão pulmonar foi definida quando a relação PaO_2/FiO_2 ficasse entre 200-300mmHg e houvesse queda de 40% na complacência pulmonar. Durante o procedimento foram coletadas amostras sanguíneas para gasometria arterial e os dados de mecânica ventilatória e hemodinâmica. Amostras de tecido pulmonar de ambos os pulmões foram coletadas para avaliação de lesão pulmonar através da análise histológica onde foram submetidos à coloração com Hematoxilina – Eosina e classificados em forma semiquantitativa conforme escore de injúria pulmonar (edema, inflamação, hemorragia alveolar, atelectasia e necrose), dosagem de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF α e estudo imunohistoquímico para dosagem da Caspase 3.

Resultados: A mortalidade do modelo foi de 50%, devido a intensa instabilidade hemodinâmica durante a infusão do AO mesmo com o uso precoce de drogas vasoativas. Três animais necessitaram de doses adicionais de AO para atingir os critérios estabelecidos para lesão pulmonar. A histologia mostrou achados

consistentes com lesão pulmonar em todas as amostras pulmonares de ambos os pulmões. Entretanto, foi observado mais edema pulmonar nos segmentos inferiores em relação aos segmentos superiores em ambos os pulmões ($p = 0,01$). A produção de IL-6 e IL-8 estava significativamente aumentada em comparação a pulmões normais ($p < 0,05$), e IL-6 mostrou-se com níveis maiores nos segmentos superiores em relação aos segmentos inferiores ($p = 0,03$). Células positivas para Caspase 3 estavam presentes em todas as amostras estudadas localizando-se principalmente em células do epitélio respiratório e macrófagos.

Conclusão: Embora este modelo produza achados histológicos de lesão pulmonar e resposta inflamatória semelhantes a SDRA clínica, ele apresenta alta mortalidade, dificuldade de reprodutibilidade e alterações hemodinâmicas muitas vezes difíceis de serem controladas, mesmo com diferentes drogas vasoativas.

ABSTRACT

Introduction: Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a severe pulmonary disease resulted of local or systemic insults that result in damage to the alveolar-capillary structure. Several animal models of lung injury have been developed in an attempt to mimic human ARDS with the objective of studying the mechanism and potential treatments. The oleic acid (OA) model reproduces the early characteristics of ARDS with changes in capillary permeability and impairment in gas exchange and pulmonary mechanics, producing a lung lesion that is morphologically heterogeneous.

Objective: To describe the lung injury model in pigs after administration of OA, to evaluate the effects on respiratory mechanics, hemodynamic changes, histology and gas exchange, as well as to determine the challenges in its development.

Methods: Ten Large White pigs were used, were anesthetized and mechanically ventilated, and were submitted to lung injury through the endovenous infusion of OA into the pulmonary artery. Pulmonary lesion was defined when the PaO₂ / FiO₂ ratio was between 200-300mmHg and there was a 40% decrease in lung compliance. During the procedure blood samples were collected for arterial blood gas analysis and data on ventilatory and hemodynamic mechanics. Pulmonary tissue samples from both lungs were collected for evaluation of pulmonary lesions through histological analysis where they were submitted to Hematoxylin - Eosin staining and classified in semiquantitative form according to pulmonary injury score (edema, inflammation, alveolar hemorrhage, atelectasis and necrosis), cytokine dosage as IL-6, IL-8 and TNF α and immunohistochemical study for Caspase 3 dosage.

Results: Mortality of the model was 50%, due to an intense hemodynamic instability during the administration of OA, even with the early use of vasoactive drugs. Three animals required additional doses of OA to achieve criteria for lung injury. Histology showed findings consistent with lung injury in all pulmonary samples from both lungs. However, more pulmonary edema was observed in the lower segments in relation to the upper segments of both lungs ($p = 0.01$). IL-6 and IL-8 production were significantly increased compared to normal lungs (p

<0.05), and IL-6 showed higher levels in the upper segments compared to the lower segments ($p = 0.03$). Positive cells for Caspase 3 were present in all samples, localized mainly in respiratory epithelial cells and macrophages.

Conclusion: Although this model produces histological findings of lung injury and inflammatory response similar to clinical ARDS, it presents high mortality, inconsistent reproducibility and hemodynamic instability of difficult control.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma síndrome que compreende insuficiência respiratória com hipoxemia aguda e dano alveolar secundário a uma intensa resposta inflamatória pulmonar(1) decorrente de vários insultos locais ou sistêmicos que acarretam lesão da estrutura alvéolo-capilar, com aumento da permeabilidade capilar(2). Caracteriza-se por edema inflamatório pulmonar, colapso heterogêneo dos espaços aéreos com predominância nas regiões dependentes, e alterações graves da troca gasosa(2, 3).

As lesões ao endotélio e epitélio capilar alveolar resultam em ruptura da barreira levando a extravazamento de proteínas plasmáticas e formação de edema. Além da ativação das outras células efectoras, como neutrófilos, macrófagos, endotélio e ativação do epitélio, as plaquetas também contribuem para o dano alveolar na lesão pulmonar. Na fase aguda, as citocinas e os lipídios são liberados, levando à perda de barreira alveolar-capilar e formação de membrana hialina(4, 5).

Os modelos animais mais utilizados para a indução da SDRA são a lavagem pulmonar com solução fisiológica, a administração intraperitoneal de paraquat, a isquemia e reperfusão da artéria pulmonar e a administração de ácido oleico (AO) no sistema venoso. Inicialmente o AO foi utilizado como modelo animal de embolia pulmonar e, posteriormente, avaliou-se a lesão inflamatória por ele causada, que é semelhante àquela naturalmente encontrada na lesão pulmonar. O modelo de AO produz as características básicas da SDRA de maneira muito precoce com alterações da permeabilidade capilar e comprometimento na troca gasosa e na mecânica pulmonar(6). A infusão venosa do AO produz lesão no endotélio capilar, pouco altera as propriedades de relaxamento e contração oferecidas pelo endotélio, respeita zonas dependentes da gravidade e é dose-dependente(7-9).

Quando o animal sobrevive ao insulto inicial, o desenvolvimento de lesão pulmonar é relativamente imprevisível. Semelhante a SDRA clínica, o AO produz uma lesão pulmonar que é morfológicamente heterogênea com áreas de dano

pulmonar mínimo justaposta a áreas de lesão grave. As alterações morfológicas na fase inicial da lesão pulmonar induzida pelo AO ocorrem rapidamente em poucos minutos, com necrose das células endoteliais seguida de necrose das células epiteliais alveolares com ambos os tipos de células destacando-se das suas membranas basais, congestão capilar grave e edema intersticial / intraalveolar também estão presentes(10).

Embora a SDRA seja principalmente um distúrbio respiratório, ela leva a insuficiência multisistêmica e morte. O desenvolvimento de edema pulmonar, insuficiência de surfactante, inflamação e lesão tecidual que levam a oxigenação insuficiente do sangue (hipoxemia) atuam sinergicamente, culminando na falha de múltiplos órgãos e na morte. Assim, as alterações produzidas no sistema respiratório, sistema cardiovascular, morfologia pulmonar e conteúdo de líquido extravascular pulmonar devem ser considerados para a compreensão da patofisiologia da SDRA (11).

Apesar de haver muitos trabalhos publicados com OA no estudo da lesão pulmonar, não existe um protocolo bem descrito na literatura e poucos relatos sobre os desafios deste modelo em diferentes espécies de animais. Além disso, não há consenso quanto a melhor forma e tempo de administração, relatando os efeitos adversos e a mortalidade (11-18). Por esta razão, o presente estudo visa descrever o protocolo de administração do AO em modelo de lesão pulmonar em suínos, avaliar os efeitos sobre mecânica respiratória, alterações hemodinâmicas, histologia e troca gasosa, bem como determinar os desafios no seu desenvolvimento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA)

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma doença pulmonar grave decorrente de vários insultos locais ou sistêmicos que acarretam lesão da estrutura alvéolo-capilar, com aumento da permeabilidade capilar. O desenvolvimento da SDRA é caracterizado pela perda sequencial da integridade da membrana capilar alveolar, acúmulo de líquido no espaço extravascular e

perda de volume de troca gasosa pulmonar, mais proeminente nas áreas dependentes dos pulmões. As anormalidades resultantes de áreas com baixa relação ventilação/perfusão e atelectasia ou consolidação franca conduzem a manifestações clínicas de insuficiência respiratória - hipoxemia arterial e insuficiência mecânica do pulmão (2, 3, 19).

A SDRA tem sido redefinida várias vezes desde a sua primeira descrição a fim de melhorar a precisão do diagnóstico clínico. A primeira descrição conhecida da síndrome ocorreu em 1821, quando Laennec descreveu o "edema pulmonar idiopático". Em 1967, Ashbaugh e colegas utilizaram o termo "síndrome da angústia respiratória do adulto" para descrever um quadro agudo de insuficiência respiratória grave que evoluía com elevada taxa de mortalidade. Publicaram uma série de casos com 12 pacientes onde a síndrome foi caracterizada por edema pulmonar não cardiogênico que cursava com taquipnéia, dispneia, cianose refratária à administração de oxigênio, presença de infiltrado alveolar bilateral ao exame radiológico do tórax e diminuição da complacência pulmonar, fornecendo a primeira descrição sistemática desta condição(20, 21).

Em 1994, a Conferência de Consenso Americano-Europeu (AECC) definiu a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (22). Com efeito, devido a algumas questões críticas desta definição, a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva convocou um painel internacional de peritos em 2011 em Berlim, para desenvolver uma nova definição da síndrome, o que levou à chamada "definição de Berlim" da SDRA, com foco na viabilidade, confiabilidade, validade, e avaliação objetiva de seu desempenho (23).

De acordo com esta nova definição, a SDRA é uma forma aguda de lesão pulmonar difusa que ocorre em pacientes com fator de risco predisponente, atendendo aos seguintes critérios: (1) início dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido ou sintomas respiratórios novos / agravantes; (2) presença de opacidades bilaterais na radiografia de tórax, não totalmente explicada colapso lobar / pulmonar ou nódulos; (3) diagnóstico de insuficiência respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga de líquidos; (4) presença de hipoxemia, definida por um limiar específico da relação PaO_2 / FiO_2 medida com um requisito mínimo de PEEP ≥ 5 cm H_2O , identificando três categorias de gravidade: leve (PaO_2 / FiO_2 entre 200 mm Hg e 300 mm Hg),

moderada ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ entre 100 mm Hg e 200 mm Hg) e grave ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100$ mm Hg) (23).

As características patológicas da SDRA têm sido descritas classicamente por três fases sobrepostas: 1) primeiramente aguda-exsudativa ou inflamatória, onde as lesões ao endotélio e epitélio capilar alveolar resultam em ruptura da barreira levando a vazamento de proteínas plasmáticas e formação de edema, 2) fase subaguda, onde há obstrução capilar e alveolar devido à inflamação e lesão tecidual devido ao desequilíbrio entre coagulação e fibrinólise e há uma produção reduzida de surfactante com possibilidade de lesão do parênquima pulmonar por ventilação mecânica e 3) fase fibrótica ou pós-reparação tardia quando se pode encontrar uma remodelação do parênquima pulmonar e alterações fibroproliferativas. No entanto, algumas variáveis, como a ocorrência de pneumonia nosocomial ou lesão pulmonar induzida pelo ventilador, podem complicar essa sequência. O acúmulo inicial de líquido é seguido, dentro de 72 horas, por uma quantidade variável de proliferação de células alveolares de tipo II, fibroblastos e remodelação da matriz celular (21, 24).

A lesão da membrana alvéolo-capilar ocorre independente da causa desencadeante da lesão pulmonar, com extravasamento de líquido rico em proteínas para o espaço alveolar. A lesão epitelial alveolar envolve a membrana basal e os pneumócitos tipo I e tipo II, levando à redução da quantidade e à alteração da funcionalidade do surfactante, com conseqüente aumento da tensão superficial alveolar, ocorrência de atelectasias e redução da complacência pulmonar. A lesão do endotélio capilar é associada a numerosos eventos inflamatórios, como recrutamento, sequestro e ativação de neutrófilos, formação de radicais de oxigênio, ativação do sistema de coagulação, que leva à trombose microvascular e recrutamento de células mesenquimais com a produção de pró colágeno (25).

À medida que o comprometimento pulmonar progride, as anormalidades hemodinâmicas ficam evidentes. A pressão da artéria pulmonar aumenta devido à elevação da resistência vascular pulmonar e do débito cardíaco, o que muitas vezes leva à hipertensão pulmonar (10).

A SDRA pode ser classificada em primária (pulmonar) ou secundária (extrapulmonar) de acordo com a origem do insulto pulmonar. Os danos

primários, com um impacto direto nas células pulmonares, podem ser: aspiração, infecções pulmonares difusas, afogamento, inalação tóxica ou contusão pulmonar. Os danos secundários, com um impacto indireto, afetando um órgão distante e levando a uma resposta inflamatória sistêmica, pode ocorrer em virtude de choque, sepse, síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), politraumatismo sem lesões torácicas primárias, transfusão maciça, trauma de queimadura, pancreatite, circulação extracorpórea, intoxicação sistêmica, coagulação intravascular disseminada, malignidade ou eclampsia (24, 26). Na SDRA pulmonar, o envolvimento do parênquima pulmonar é multifocal, enquanto na extrapulmonar a alteração é mais difusa e uniforme devido à distribuição hematogênica dos mediadores inflamatórios (27).

A inflamação é um componente fundamental na patogênese da SDRA e as mudanças nos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF) $-\alpha$, interleucina 6 (IL) -6 e IL-10 desempenham papéis críticos no processo inflamatório da SDRA. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio intracelular e extracelular pode induzir a hiperativação de células imunes inatas (macrófagos e neutrófilos), estimular a expressão e liberação de citocinas inflamatórias e causar disfunção endotelial vascular, o que posteriormente promove o desenvolvimento da SDRA (Figura 1) (28).

As estratégias ventilatórias utilizadas nos pacientes com SDRA passaram por uma grande transformação ao longo dos últimos anos. De uma abordagem inicial na qual os ventiladores mecânicos eram ajustados buscando-se parâmetros de mecânica respiratória e de troca gasosa os mais próximos possíveis dos dados fisiológicos encontrados em pulmões saudáveis, passaram a ter como objetivo principal evitar os efeitos deletérios da ventilação mecânica enquanto se tenta fornecer a melhor ventilação possível. Esta mudança de paradigma é baseada no crescente entendimento de que a ventilação mecânica pode piorar uma lesão pulmonar preexistente, ou pode produzir lesão pulmonar aguda em pulmões previamente saudáveis(3).

Apesar dos avanços nas últimas décadas no conhecimento e tratamento da SDRA, a mortalidade permanece alta, variando de 27% a 45%, sendo responsável por 10% a 15% de todas as internações em unidades de terapia intensiva (23, 29).

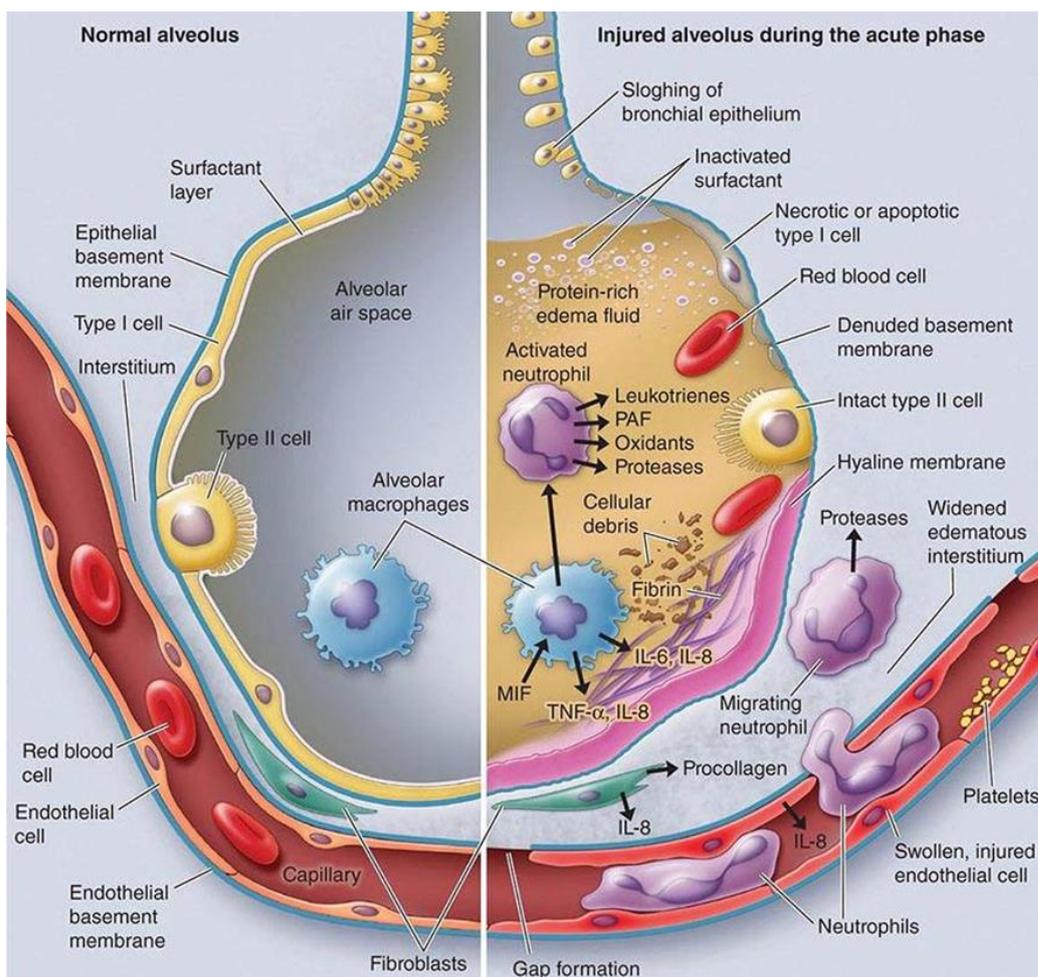


Figura 1. Fisiopatologia da SDRA- Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. O alvéolo normal (lado esquerdo) e o alvéolo lesionado na fase aguda da síndrome (lado direito). Copyright 2000 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.

3. MODELOS DE LESÃO PULMONAR

Modelos animais de lesão pulmonar foram desenvolvidos na tentativa de simular a SDRA humana. Os modelos animais de SDRA podem ajudar-nos a compreender o mecanismo da síndrome. Infelizmente, nenhum modelo animal imita exatamente a SDRA humana. No entanto, os estudos em animais podem trazer elementos cruciais da lesão pulmonar em seres humanos e neste sentido podem servir como uma ponte entre pacientes e laboratório de investigação (1).

Hipóteses baseadas em observações clínicas podem ser testadas diretamente em modelos animais. Para imitar de forma segura a SDRA humana, um modelo animal deve reproduzir a lesão aguda das barreiras epiteliais e

endoteliais nos pulmões juntamente com a resposta inflamatória aguda. Idealmente, a lesão deve evoluir ao longo do tempo se os animais são observados por períodos prolongados. Um dos aspectos mais difíceis de um modelo de SDRA é que os pulmões dos seres humanos podem ser afetados pelos mecanismos envolvidos na doença primária (por exemplo, sepse) e / ou podem ser afetados pelas modalidades terapêuticas usadas para cuidados de suporte (por exemplo, ventilação mecânica). Isso aumenta a complexidade do modelo animal ideal de lesão pulmonar, uma vez que requer a incorporação de modalidades de tratamento específicas em protocolos experimentais, adicionando variáveis ao desenho experimental (6).

Vários são os modelos animais utilizados atualmente (Quadro 1). Inicialmente o AO foi utilizado como modelo animal de embolia pulmonar e, posteriormente, avaliou-se a lesão inflamatória por ele causada, que é semelhante àquela naturalmente encontrada na lesão pulmonar. O modelo de AO produz as características básicas da SDRA de forma precoce com alterações da permeabilidade capilar e comprometimento na troca gasosa e na mecânica pulmonar (6). A infusão venosa do AO produz lesão no endotélio capilar, pouco altera as propriedades de relaxamento e contração oferecidas pelo endotélio, respeita zonas dependentes da gravidade e é dose-dependente (7-9).

Embora nenhum modelo animal descreva completamente os achados em humanos, estudos utilizando modelos de SDRA em animais podem ser uma ferramenta biológica vital para estudar a fisiopatologia e testar novas intervenções terapêuticas. (1, 30).

Modelo	Semelhanças com SDRA	Diferenças com SDRA	Questões técnicas
Ácido oleico (9)	Fase aguda e de reparação com achados histopatológicos e fisiológicos semelhantes à SDRA humana.	Em humanos, a embolia gordurosa é uma causa rara de SDRA. Não representa modelo de fisiopatologia de SDRA por sepse.	Boa reprodutibilidade. Exige injeção intravenosa de ácido oleico, o que pode ser difícil em pequenos animais.
LPS (31)	Resposta inflamatória neutrofílica com aumento de citocinas intrapulmonares.	Alterações leves na permeabilidade alvéolo-capilar	Muito reprodutível.
Aspiração ácida (32)	Ruptura da barreira alvéolo-capilar com infiltrado neutrofílico.	Humanos aspiram conteúdo gástrico, não é ácido puro.	Muito reprodutível. Estreita diferença entre doses lesivas e não lesivas.
Hiperóxia (33)	Fase aguda da lesão epitelial e infiltrado neutrofílico seguidos de proliferação de células tipo II e cicatrização.	Em pulmões humanos normais, 100% de oxigenação não induziu lesão pulmonar, não é claro se a hiperóxia está envolvida na patogênese da SDRA.	Boa reprodutibilidade. Demanda equipamentos especiais para administrar e monitorar a concentração de gás desejada.
Bleomicina (34)	Lesão inflamatória aguda seguida de fibrose reversível.	Não há formação de membrana hialina. Relevância fisiopatológica não está muito clara.	Boa reprodutibilidade.
Lavagem salina (35, 36)	Depleção de surfactante. Redução de complacência pulmonar. Troca gasosa afetada.	Sem estímulo adicional há uma lesão mínima da permeabilidade e pouco recrutamento de PMN.	Animais precisam ser anestesiados, intubados e ventilados durante todo o procedimento e após.

Quadro 1 Principais semelhanças, diferenças e questões técnicas dos modelos de SDRA. Fonte: Adaptado de Matute-Bello (2008) (6)

4. ÁCIDO OLEICO

O AO é um ácido graxo insaturado em plantas e animais. É o ácido graxo mais comum e abundante no corpo de indivíduos saudáveis e está presente no plasma humano, nas membranas celulares e no tecido adiposo (1, 37). O modelo de AO foi desenvolvido pela primeira vez para imitar a SDRA causada por embolia gordurosa, visto que o ácido oleico é o ácido graxo mais prevalente na embolia pulmonar (9, 10).

Quando o animal sobrevive ao momento inicial, o desenvolvimento de lesão pulmonar é relativamente imprevisível. Semelhante a SDRA clínica, o AO produz uma lesão pulmonar que é morfológicamente heterogênea com áreas de dano pulmonar mínimo justaposta com áreas de lesão grave (10).

4.1 LESÃO PULMONAR E ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELO AO

A lesão pulmonar induzida pelo AO ocorre rapidamente em poucos minutos. Apresenta uma fase precoce de necrose e trombose microvascular, seguida de uma fase de reparo com proliferação de células tipo II e focos fibróticos em áreas subpleurais. Apresenta um aumento acentuado na pressão da artéria pulmonar, necrose do endotélio e epitélio pulmonar e edema pulmonar considerável (1).

Microscopicamente, a lesão é multifocal e heterogênea, variando de pequenas áreas de edema à infiltração hemorrágica com deposição de fibrina. As alterações histológicas da lesão pulmonar induzida por ácido oleico estão associadas a mudanças funcionais marcadas. A permeabilidade microvascular pulmonar é marcadamente aumentada, com acúmulo extravascular de líquido pulmonar rico em proteínas nos espaços aéreos. A formação de edema pulmonar pode representar uma situação potencialmente fatal se não for devidamente tratada (1, 6, 10, 17, 38).

A resposta hemodinâmica à infusão de AO é rápida, com hipoxemia grave ocorrendo em horas. A hipertensão pulmonar com aumento da pressão arterial pulmonar e resistência vascular pulmonar e a insuficiência cardíaca

direita com diminuição da pressão arterial média e do débito cardíaco podem levar à morte súbita como complicação deste modelo (10, 24).

4.2 ALTERAÇÕES A NÍVEL CELULAR

O dano celular causado pela ligação direta do AO às membranas biológicas pode ser crucial na lesão pulmonar induzida pelo mesmo. O AO induz apoptose ou necrose em células alveolares tipo I ou tipo II, dependendo da origem do insulto(1).

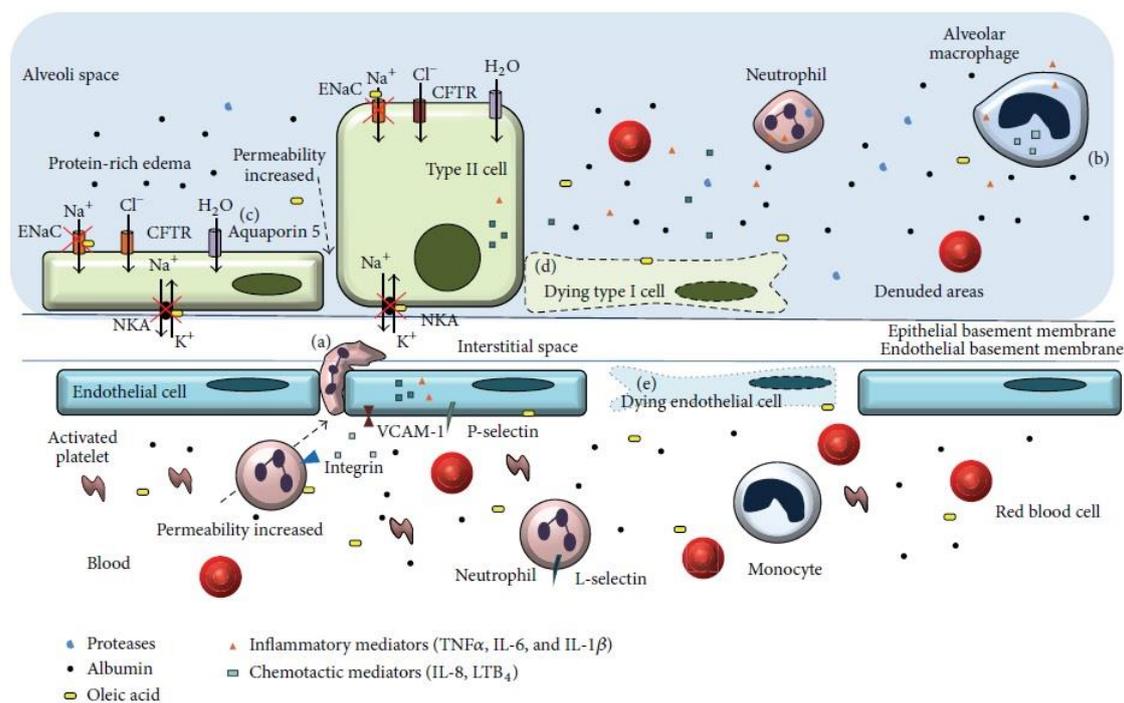
Estudos apontam níveis aumentados de TNF α e IL-8 após injeção de ácido oleico, bem como IL-6, IL-1 β e a quimiocina MIP-1 α . Assim, o AO induz a síntese dos principais mediadores inflamatórios envolvidos na SDRA clínica, quando injetado no pulmão também induz acúmulo de neutrófilos (6, 10, 38).

Os macrófagos alveolares atuam como sentinelas desencadeando a resposta imune e produzindo mediadores quimiotáticos e inflamatórios. Os mediadores quimiotáticos produzidos por macrófagos alveolares e células epiteliais e endoteliais induzem o aumento de moléculas de adesão como VCAM-1, seletinas e integrinas, favorecendo a infiltração de células inflamatórias (1).

Os neutrófilos são as primeiras células migrando para o pulmão e seu recrutamento excessivo contribui para o dano pulmonar através da produção e liberação de mediadores inflamatórios e outras moléculas tais como proteases e elastase. O AO desencadeia vias intracelulares que terminam na morte das células pulmonares. É diretamente tóxico para as células endoteliais no pulmão, causando necrose e induzindo congestão capilar e edema intersticial / intra-alveolar. Semelhante aos seres humanos, OA induz hemorragia pulmonar, inibe ENaC e NKA induzindo e / ou evitando a depuração do líquido de edema (1, 6).

O AO induz principalmente necrose, mas também provoca apoptose através de uma diminuição no marcador antiapoptótico Bcl-2 e um aumento acentuado do marcador pró apoptótico Bad. O AO também ativa as caspases 3 e 6, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio e induzindo uma significativa despolarização mitocondrial e apoptose nos leucócitos (1).

Figura 2. Mediadores inflamatórios envolvidos na SDRA induzida pelo ácido oleico



Efeitos do ácido oleico na síndrome do desconforto respiratório agudo. O ácido oleico induz danos nas células epiteliais e endoteliais, há uma maior permeabilidade vascular com edema rico em proteínas e formação de membrana hialina. O ácido oleico induz apoptose ou necrose em células alveolares tipo I ou tipo II (d), dependendo da origem do insulto. Os macrófagos alveolares (b) atuam como sentinelas desencadeando a resposta imune e produzem mediadores quimiotáticos e inflamatórios. Os neutrófilos (a) são as primeiras células que migram para o pulmão e seu recrutamento excessivo contribui para lesão pulmonar e com liberação de mediadores inflamatórios, proteases e elastase. Aquaporin 5 é (c) um canal de água responsável por mover a água dos alvéolos para o interstício pulmonar.

5. CASPASES

A apoptose é regulada por uma cascata de proteínas (caspases), sendo essas as proteínas executoras da apoptose e estão presentes em todas as células. Após a clivagem, caspases tornam-se ativas e iniciam vias que levam a apoptose (39). As caspases (proteases específicas de cisteinil aspartato) são uma família de moléculas de sinalização importantes com várias tarefas dependendo do subtipo e órgão envolvido (40).

São características da apoptose: a condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina à superfície da célula, encolhimento citoplasmático, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA(41). A apoptose é um

processo dependente de energia, diferentemente da necrose que também ocorre na ausência de ATP (42).

A caspase 3 tem sido implicada como uma caspase "efetora" associada ao início da "cascata de morte" e é, portanto, um marcador importante do ponto de entrada da célula na via de sinalização apoptótica. A caspase 3 é ativada pela caspase 8 e caspase 9, e uma vez que serve como um ponto de convergência para diferentes vias de sinalização é bem adequado como leitura num ensaio de apoptose. A detecção de caspase-3 ativa pode ser utilizada em diferentes linhas celulares ou células primárias (43).

A via de sinalização que leva à morte celular programada é mantida por reguladores positivos e negativos, esse equilíbrio entre tais fatores decide se a célula sofre apoptose ou sobrevive. As proteínas que podem alterar-se para a sobrevivência são as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, enquanto que as proteínas proapoptóticas Bax, Bad, Bak e Bis induzem à morte celular programada (44).

Um importante regulador de apoptose após a lesão do DNA é a proteína p53, que pode induzir a Bax e Bak, que regula a liberação de citocromo C da mitocôndria, iniciando assim a cascata que conduz à apoptose (45). O citocromo C liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1) ativando a Caspase 9, que por sua vez cliva as Caspases 3 e 6 (46, 47) levando à morte celular.

6. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos utilizam o AO como forma de indução a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, porém não há um consenso em relação a melhor forma e tempo de administração apropriados, onde muitos estudos não relatam os efeitos adversos e a mortalidade relacionada ao uso do ácido oleico. Diante disto, o presente estudo buscou relatar os principais desafios na realização de um modelo de lesão pulmonar utilizando o ácido oleico, bem como avaliar as respostas hemodinâmicas, mecânica pulmonar e troca gasosa, além de verificar alterações histológicas provocadas pelo ácido oleico, resposta inflamatória através da IL-6 e IL-8 e morte celular através da Caspase 3.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever o modelo de lesão pulmonar em suínos após administração de AO.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações histopatológicas no tecido pulmonar causada pela administração do AO;
- Mensurar as alterações hemodinâmicas, de mecânica respiratória e troca gasosa provocadas após administração de AO;
- Quantificar a apoptose através da caspase 3 no tecido pulmonar;
- Avaliar a resposta inflamatória tecidual decorrente da administração do AO através da dosagem de IL-6 e IL-8 em tecido pulmonar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:260465.
2. Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri VM, Quintel M, et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1775-86.
3. Schettino GPP, Borges Sobrinho JB. SDRA e ventilação. *Jornal de Pneumologia*. 1999;25(5):251-62.
4. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:147-63.
5. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2731-40.
6. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.
7. Kafi SA, Scillia P, Mélot C, Gevenois PA, Pagnamenta A, Naeije R. Abnormal pulmonary vascular tone in canine oleic acid lung injury. *Crit Care Med*. 2002;30(7):1565-9.
8. Suga K, Ogasawara N, Matsunaga N, Sasai K. Perfusion characteristics of oleic acid--injured canine lung on Gd-DTPA--enhanced dynamic magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2001;36(7):386-400.
9. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(1):245-60.
10. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB. Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Ann Thorac Surg*. 2012;93(4):1331-9.
11. Akella A, Sharma P, Pandey R, Deshpande SB. Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian J Exp Biol*. 2014;52(7):712-9.
12. Zhu YB, Liu DH, Zhang YB, Liu AJ, Fan XM, Qiao CH, et al. Total liquid ventilation reduces oleic acid-induced lung injury in piglets. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(22):4282-8.
13. Räsänen J, Gavriely N. Detection of porcine oleic acid-induced acute lung injury using pulmonary acoustics. *J Appl Physiol (1985)*. 2002;93(1):51-7.
14. Pfurtscheller K, Ring S, Beran E, Sorantin E, Zobel J, Ganster D, et al. Effect of body position on ventilation distribution during PEEP titration in a porcine model of acute lung injury using advanced respiratory monitoring and electrical impedance tomography. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3(1):38.
15. Hartmann EK, Bentley A, Duenges B, Klein KU, Boehme S, Markstaller K, et al. TIP peptide inhalation in oleic acid-induced experimental lung injury: a post-hoc comparison. *BMC Res Notes*. 2013;6:385.
16. Zhang JZ, Li LK, Zhang YB, Li G, Xu YL, Zhu YB. Effect of partial liquid ventilation on lung function in oleic acid-induced lung injury model of piglets. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(23):4536-9.
17. Bodenstein M, Boehme S, Wang H, Duenges B, Markstaller K. Hints for cyclical recruitment of atelectasis during ongoing mechanical ventilation in lavage and oleic acid lung injury detected by SpO₂ oscillations and electrical impedance tomography. *Exp Lung Res*. 2014;40(9):427-38.
18. Bian W, Chen W, ChaO Y, Wang L, Li L, Guan J, et al. A novel insight in exploring the positive end expiratory pressure for sustained ventilation after lung recruitment in a porcine model of acute respiratory distress syndrome. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):13954-61.
19. Räsänen J, Nemergut ME, Gavriely N. Effect of positive end-expiratory pressure on acoustic wave propagation in experimental porcine lung injury. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2015;35(2):134-41.

20. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-23.
21. Umbrello M, Formenti P, Bolgiagli L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2016;18(1).
22. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(3 Pt 1):818-24.
23. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
24. Otáhal M, Mlček M, Vítková I, Kittnar O. A novel experimental model of acute respiratory distress syndrome in pig. *Physiol Res*. 2016;65(Supplementum 5):S643-S51.
25. Amato MBP, Carvalho CRR, Alexandre Í, Vieira S, Rotman V, Mook M, et al. Ventilação mecânica na Lesão Pulmonar Aguda (LPA)/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007;33:119-27.
26. Rocco PR, Pelosi P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? *Curr Opin Crit Care*. 2008;14(1):50-5.
27. Garcia CSNB, Pelosi P, Rocco PRM. Síndrome do desconforto respiratório agudo pulmonar e extrapulmonar: existem diferenças? *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2008;20(2):178-83.
28. Wang C, Huang Q, Zhu X, Duan Y, Yuan S, Bai X. Hydroxysafflor yellow A suppresses oleic acid-induced acute lung injury via protein kinase A. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(3):895-904.
29. Phua J, Badia JR, Adhikari NK, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(3):220-7.
30. McGuigan RM, Mullenix P, Norlund LL, Ward D, Walts M, Azarow K. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Curr Surg*. 2003;60(4):412-7.
31. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest*. 1991;88(3):864-75.
32. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1450-6.
33. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;45(5):699-704.
34. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(2):L152-60.
35. Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol (1985)*. 2000;89(4):1645-55.
36. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1980;24(3):231-6.
37. Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, Jaramillo S, Varela LM, Ortega-Gomez A, et al. Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):1638-56.
38. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, de Moraes IM, Oliveira FM, Younes-Ibrahim M, et al. Oleic acid induces lung injury in mice through activation of the ERK pathway. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:956509.
39. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004;57(10):1009-14.
40. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2665-72.

41. van de Schepop HA, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer. *Clin Mol Pathol*. 1996;49(4):M214-7.
42. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol*. 2002;22(1):94-104.
43. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol*. 1996;133(5):1041-51.
44. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*. 1999;274(2):1156-63.
45. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292(5517):727-30.
46. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.
47. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(8):299-306.

9. ARTIGO

ARTIGO NAS NORMAS DO SHOCK JOURNAL

CHALLENGES AND PERSPECTIVES IN PORCINE MODEL OF LUNG INJURY USING OLEIC ACID

Aline Morás Borges¹, Renata Sallati Ferrari², Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz³, Daiane Silvello¹, Jane Maria Ulbrich², Elaine Aparecida Félix⁴, Cristiano Feijó Andrade⁵

Aline Morás Borges¹ - Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Renata Sallati Ferrari² - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz³ - Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Daiane Silvello¹ - Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Jane Maria Ulbrich² - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Elaine Aparecida Félix⁴ - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Cristiano Feijó Andrade⁵ - Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Corresponding author: Cristiano Feijó Andrade

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. CEP 90035-903
Porto Alegre-RS/Brasil.

e-mail: cristianofa@gmail.com

Phone Numbers: +55 51 9 97393215

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Abstract

Objective: To evaluate the protocol of administration of oleic acid in lung injury model, challenges in its development and its effects on respiratory mechanics, hemodynamic changes, histology, gas exchange and mortality.

Methods: Ten Large White pigs were anesthetized and mechanically ventilated, then submitted to lung injury through intravenous infusion of acid oleic in the pulmonary artery. Lung injury was defined as $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ between 200-300mmHg and a 40% decrease in lung compliance. During the procedure blood samples were collected for gas analysis, data on ventilatory mechanics and hemodynamics were stored. Pulmonary tissue sample from both lungs were collected for evaluation of lung injury, cytokine quantification and immunohistochemistry study.

Results: Mortality of the model was 50%, due to an intense hemodynamic instability during OA administration, even with early use of vasoactive drugs. Three animals required additional doses of OA to achieve criteria for lung injury. Histology showed findings consistent with lung injury in all pulmonary samples. However, more pulmonary edema was observed in the lower segments than the upper segments of both lungs ($p=0.01$). IL-6 and IL-8 were significantly increased compared to normal lungs ($p < 0.05$), and IL-6 showed higher levels in the upper segments compared to the lower segments ($p=0.03$). Positive cells for Caspase 3 were present in all samples, localized mainly in respiratory epithelial cells and macrophages.

Conclusion: Although this model shows histological findings of lung injury and inflammatory response similar to clinical ARDS, it has high mortality, inconsistent reproducibility and hemodynamic instability of difficult control.

Key Words: Acute Lung Injury, Oleic Acid, Animal Experimentation, Respiratory Mechanics, Hemodinamycs.

Introduction

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a syndrome that includes respiratory failure with acute hypoxemia and alveolar damage secondary to an intense pulmonary inflammatory response resulting from various local or systemic insults that lead to damage to the alveolar-capillary structure, with increased capillary permeability (1-3). It is characterized by pulmonary inflammatory edema, heterogeneous collapse of air spaces with predominance in the dependent regions, and severe gas exchange changes (2, 4).

Animal models of lung injury were developed in an attempt to mimic human ARDS and help in understanding the mechanism of this syndrome. Unfortunately, no animal model mimics human ARDS exactly. However, animal studies can bring crucial elements in the physiopathology of lung injury in humans and in this scenario they could act as a potential bridge from bench to bedside (1). The oleic acid (OA) model produces the basic characteristics of ARDS in its early onset, with changes in capillary permeability and impairment of gas exchange and pulmonary mechanics (5). When the animal survives the initial insult, the development of lung injury is relatively unpredictable. Similar to clinical ARDS, OA produces a lung lesion that is morphologically heterogeneous with areas of minimal pulmonary damage juxtaposed with areas of severe injury (6). Morphological changes in the early phase of OA induced lung injury occur rapidly within a few minutes, with necrosis of endothelial cells followed by necrosis of alveolar epithelial cells with both cell types standing out from their basal membranes, severe capillary congestion and interstitial/intraalveolar edema are also present (7).

Although there have been many published studies using OA as a model for lung injury, there is no well-described protocol in the literature and few report of challenges of this model in different animal species. Additionally, there is no consensus regarding the best form and time of administration, reports of adverse effects and mortality (3, 8-11). For this reason, the present study sought to report the main difficulties in the development of a porcine model of lung injury using OA, as well as to evaluate its histological changes, inflammatory response and cell death findings.

Materials and Methods

This study was performed in accordance with the Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 86-23, revised 1996). The Ethical Committee of the Hospital of Clinics of Porto Alegre, approved the experimental protocols (#150421).

Preparation of animals, anesthesia and ventilation

Experiments were performed on ten Large White pigs weighing 27.9 ± 2.19 Kg. The animals were premedicated by intramuscular administration of Ketamine (15mg / kg) and Midazolam (0.8mg / kg). After loss of consciousness, the marginal vein of the ear was punctured and anesthesia was induced with Propofol (1-3mg / kg). The pigs were intubated orotracheally with a 6.0 or 6.5 endotracheal tube and mechanically ventilated under controlled pressure mode (Evita XL, Dräger, Germany) with PEEP of 5 cmH₂O, VT of 8ml/kg, I:E ratio of 1:2, respiratory rate (RR) 20, FiO₂ of 1,0. Before intubation, 1 ml of 2% lidocaine in the arytenoids was instilled in order to avoid laryngospasm. Anesthesia was maintained with inhaled isoflurane (1.4-2%), fentanyl with an initial dose of 5-10 µg / kg (bolus) and after, infusion of 10-30 µg / kg / h and Propofol 8-20mg / kg / h. Muscle relaxation was performed with pancuronium 0.15mg / kg (bolus) followed by intermittent doses of 0.1mg / kg / h (12)

Cannulation of right femoral artery was performed for continuous monitoring of mean arterial pressure and for blood gas analysis. A Swan-Ganz catheter (Edwards Swan-Ganz, thermodilution catheter, 4 Fr, 50 cm) was passed through the right external jugular vein and correct positioning of the catheter was confirmed by analysis of the pulmonary arterial pressure curves.

Lung Injury Protocol

Pulmonary injury was performed by continuous infusion of 0.2 ml / kg of oleic acid (Labsynth, SP, BR) by infusion pump for 20 minutes through the proximal route of the Swan Ganz catheter. After 20 minutes of animal stabilization, a quarter of the dose was reapplied at the same manner for 20 minutes. Thirty minutes after the last OA dose, a blood gas analysis was performed. If the animal did not reach the levels considered for lung injury, a new quarter of the dose following the same protocol was applied until the lung lesion

was confirmed (9-11). The criteria for lung injury was defined by a $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ ratio between 200 and 300 mmHg and a decrease of at least 40% in static compliance. Arterial blood gas analysis was performed before and after AO administration and collected every 30 minutes until 180 minutes. The mechanics and ventilatory parameters were also analyzed.

Hemodynamic Parameters

In cases of hemodynamic instability (MAP <60 mmHg), drugs such as Noradrenaline at 0.01-0.3 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$ intravenously, Ephedrine 0.1-0.2 mg / kg (bolus), Atropine 0.02-0.04mg / kg (bolus) and Metaraminol 0.01mg / kg (bolus) were administered. Throughout the experiment the final expiratory pressure of carbon dioxide (petCO_2) was measured through capnography.

At the end of the experiment, animals were euthanized by deepening the anesthesia with 40mg / kg of Propofol until the animal showed no more reflexes, followed by lethal injection of 1ml / kg of potassium chloride. After euthanasia, a median sternotomy was performed to remove pulmonary fragments of the anterior part of the upper lobes and of the posterior part of the lower lobes for histological analysis and measurements of inflammatory mediators.

Cytokines

Tissue levels of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 were measured by Multiplex Bead Immunoassay, using MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine and Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) by the Luminex system 200 (Invitrogen by Life Technologies, MD, USA). All analyses were performed in duplicate, using commercial assays and in accordance with the specifications of their respective manufacturers. Lungs from healthy animals (no injury) were used as control.

Lung Histology

Lung tissue specimens were fixed in formalin and dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Specimens were cut into 8- μm serial sections and stained with hematoxylin-eosin (HE). One blinded pathologist to the experimental protocol and the region of sampling performed quantitative analysis by light

microscopy. Each sample was examined under both low and high power fields. At least four sections were obtained from each block, and 20 fields were randomly selected and analyzed for each section. The severity of histological lesions was assessed using a score (HIS - Histological Score) based on six parameters: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, recruitment of granulocytes into the air spaces, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation/necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semi quantitatively using the following scale: 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = prominent. In addition, the percentage of the involved area of each histological specimen was estimated (0 to 100%) to quantify the histological changes (13). One pathologist blinded to this study evaluated the pathologic changes.

Caspase 3 – immunohistochemistry

Active caspase-3 was performed utilizing an EnVision visualization system (Dako). Briefly, immunolocalization was performed on paraffin embedded, formalin-fixed rat lungs. After paraffin removal in xylene, the sections were rehydrated and submitted to heat-steam treatment for 30 min in a 10 mM citric acid monohydrate solution. The endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the specimen for 5 min with Peroxidase Block. The specimens were then incubated with anti-active caspase-3 rabbit primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA) overnight at 4°C followed by incubation with the labeled 61 polymer for 30 min. Staining was completed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB+) substrate-chromogen, which results in a brown colored precipitate at the antigen site. Measurements of active caspase-3-positive cells were performed on 10–15 images/slide captured by an independent blinded observer and normalized to total cell count by DAPI staining.

Statistical Analysis

The results of hemodynamic, ventilatory variables and data of gas exchange are presented as mean \pm standard deviation (SD). The model of Generalized Estimating Equations (GEE) was used for the variables with normal distribution with identity function, with a correlation matrix AR(1), with a covariance matrix

with robust estimator and when statistical significance was used the post test - hoc of Bonferroni. A p value of <0.05 was considered to be significant (14). Continuous variables of pulmonary histology and cytokine results were expressed as mean \pm SD. Categorical variables were reported as absolute number and percentage. The Chi-square test (or the exact Fisher test) was used to compare categorical variables and t test to numerical variables with Gaussian distribution. Comparison of survival free-events curves were performed by Kaplan Meier with Log-rank (Mantel Cox) test. All statistical analyses were performed with the use of SPSS statistical package (version 18.0) for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

From the ten animals used in the study, five animals (50%) died before the end of the experiment due to severe hemodynamic and gas exchange instability (figure 1). All animals that died had MAP measurements below 55 mmHg that could not be reversed even with early administration of vasoactive drugs. In this study, all animals received vasoactive drugs throughout the experiment. Three animals needed to repeat additional quarter of OA dose until the establishment of pulmonary injury. CO₂ retention also occurred abruptly reaching levels greater than 85 mmHg in three of these animals within 30 minutes post-infusion of AO.

There were no statistical differences when compared the ten animals during all experiment ($p > 0.05$) regarding hemodynamics (Table 1). Static compliance and PaO₂/FIO₂ ratio showed a statistically significant difference between the pre-injury period and all time points after lung injury ($p < 0.05$). The results of hemodynamics, gas exchange and lung mechanics are described in table 1.

The histological findings associated with pulmonary damage caused by OA, such as edema, hemorrhage, atelectasis, presence of inflammatory cells and necrosis did not show any significant differences when compared samples from left and right lungs. However, when comparing upper and lower segments, the presence of pulmonary edema showed greater intensity in the lower segments ($p=0.01$) (figure 2). Hyaline membrane was not observed in any sample.

The presence of IL-6 and IL-8 in lung tissue was significantly higher than that found in healthy lung samples used as control ($p < 0.05$). The right and left upper segments had a higher presence of IL-6 when compared to the lower

fragments ($p = 0.03$) (figure 4). Caspase 3 positive cells were present in all samples from the ten animals of the study. The sites where the antibody showed the greatest intensity were in the respiratory epithelium and macrophages (figure 5).

Discussion

The OA models described in the literature are difficult to replicate because they vary in terms of animals species, OA doses, time for establishment of lung injury, different observation periods and settings of mechanical ventilation (15). Additionally, due to the few data on mortality, adverse events and detailed information about the model, our group seek to detail the challenges and provide more precise information regarding OA infusion for lung injury. One of them was the maintenance of hemodynamic stability during OA infusion and later. Li et al. showed 2 out 18 animals which had intense hemodynamic instability resulting in early death within the first 15 minutes after OA administration, similar to our study where three animals had important hemodynamic instability within the first 30 minutes after OA administration followed by early death (16). According to our study, the OA dose does not seem to be related to the severity of the lung injury, since animals that received additional OA doses survived until the end of the experiment while others with only one dose died rapidly.

Infusion of OA causes acute damage to the pulmonary endothelium and epithelium, which leads to a rapid influx of fluid and plasmatic proteins into the alveoli and a concomitant deterioration in gas exchange (17). The five animals that died in our study, four had abrupt and severe hypoxemia associated with elevated PCO_2 levels. The animals which survived until the end of the experiment, the PaO_2/FiO_2 ratio initially dropped to levels of lung injury, however it returned to values similar to pre OA infusion, showing a considerable variation in gas exchange. These findings are questionable if this model would be adequate for the study of lung injury, since the ideal model should not present this variation in the gas exchange, but rather make it remain stable or even worse during the observation period unless some kind of treatment would improve gas exchange.

The histological changes of the OA-induced lung injury are associated with marked functional changes (18). Gonçalves de Albuquerque et al, showed that

pulmonary lesion after infusion of OA is similar to ARDS because both present extravasation of fluid into the extravascular space and decreased fluid reabsorption, resulting in accumulation of extravascular pulmonary liquid. Akella et al, analyzed different doses of OA in rats and observed that pulmonary edema was present at all doses administered (3). Additionally, they reported that alveolar damage, venous congestion, presence of inflammatory cells and necrosis were related to OA dose. Differently from the literature, our study showed that most of the histological changes were well distributed, except for pulmonary edema which was significantly higher in the lower lobes.

OA-induced lung injury is characterized by an intense inflammatory response (19). Evidence from several studies indicates that a complex network of inflammatory cytokines plays an important role mediating, amplifying, and perpetuating the process of lung injury (8). Cytokines such as TNF α and interleukins (mainly IL-1 β and IL-6) are important mediators in the development of ARDS, contributing to increase vascular permeability and organ dysfunction (1). Roux et al showed that elevated levels of IL-8-induced pulmonary edema were associated with decreased clearance of alveolar fluid in ARDS patients, these findings corroborate with those found in our study where IL -6 and IL-8 levels differed significantly from the healthy lung (20). Clinical and experimental studies also show that elevated levels of IL-8, IL-6, TNF, IL-1 in the serum or bronchoalveolar lavage of patients/animals with lung injury (ARDS) confirm the relevance of cytokines in the amplification of the inflammatory cascade leading to multiorgan failure and increased mortality (21-23).

Pulmonary injury, inflammation, and oxidative stress caused by ARDS are closely associated with apoptosis, a programmed lung cell death process (17, 24). It is known that caspase 3 has been associated with the onset of the "death cascade" and is therefore an important marker of the entry point of the cell into the apoptotic signaling pathway (25). Wang, et al. showed that during lung injury, caspase 3 cascade leads to an increase in the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) leading to pulmonary dysfunction, damaged to the pulmonary epithelium and endothelium, and leakage of serum proteins into the alveoli (26). Our study also showed that the higher intensity of caspase 3 positive cells were from the respiratory epithelium followed by macrophages, suggesting relationship between lung injury and cell death pathway in this OA model.

In conclusion, the porcine model of OA-induced lung injury has high mortality and some limitations in terms of reproducibility, since the animals have different response to the OA dose, needing sometimes additional doses, which may result in animal death during this process. The model provokes an intense hemodynamic instability during OA infusion with the need of vasoactive drugs that may interfere with the results of a specific study for treatment of lung injury for instance. The histological alterations found in our study are consistent with pulmonary lesion similar to clinical ARDS. However, the criteria of $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ ratio below 300 alone during the OA administration may not be considered as the only parameter for lung injury since this relationship improved during the observation period without any changes in ventilatory parameters. Therefore, changes in pulmonary compliance should always be considered in association with $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ ratio in this model of lung injury.

References

1. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:260465.
2. Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri VM, Quintel M, et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1775-86.
3. Akella A, Sharma P, Pandey R, Deshpande SB. Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian J Exp Biol*. 2014;52(7):712-9.
4. Schettino GPP, Borges Sobrinho JB. SDRA e ventilação. *Jornal de Pneumologia*. 1999;25(5):251-62.
5. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.
6. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB. Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Ann Thorac Surg*. 2012;93(4):1331-9.
7. Motohiro A, Furukawa T, Yasumoto K, Inokuchi K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res*. 1986;18(1):50-7.
8. Zhu YB, Liu DH, Zhang YB, Liu AJ, Fan XM, Qiao CH, et al. Total liquid ventilation reduces oleic acid-induced lung injury in piglets. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(22):4282-8.
9. Räsänen J, Gavriely N. Detection of porcine oleic acid-induced acute lung injury using pulmonary acoustics. *J Appl Physiol (1985)*. 2002;93(1):51-7.
10. Hartmann EK, Bentley A, Duenges B, Klein KU, Boehme S, Markstaller K, et al. TIP peptide inhalation in oleic acid-induced experimental lung injury: a post-hoc comparison. *BMC Res Notes*. 2013;6:385.
11. Bian W, Chen W, ChaO Y, Wang L, Li L, Guan J, et al. A novel insight in exploring the positive end expiratory pressure for sustained ventilation after lung recruitment in a porcine model of acute respiratory distress syndrome. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):13954-61.
12. Madke GR, Pilla ES, Sanchez PG, Foernges R, Grün G, Vendrami G, et al. The effects of positive end-expiratory pressure in alveolar recruitment during mechanical ventilation in pigs. *Acta Cir Bras*. 2008;23(4):310-4.
13. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(2 Pt 1):650-7.
14. LSP G, VN H. Use of the Generalized Estimating

Equation Model in longitudinal data

analysis. *Revista HCPA*. 2012;32(4):503-11.

15. Salman AE, Yetişir F, Kılıç M, Onal O, Dostbil A, Zeybek D, et al. The impact of pretreatment with bolus dose of enteral glutamine on acute lung injury induced by oleic acid in rats. *J Anesth*. 2014;28(3):354-62.
16. Li X, Liu Y, Wang Q, Zhu Y, Lv X, Liu J. A novel and stable "two-hit" acute lung injury model induced by oleic acid in piglets. *Acta Vet Scand*. 2009;51:17.
17. Altintas ND, Atilla P, Iskit AB, Topeli A. Long-term simvastatin attenuates lung injury and oxidative stress in murine acute lung injury models induced by oleic Acid and endotoxin. *Respir Care*. 2011;56(8):1156-63.
18. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, de Moraes IM, Oliveira FM, Younes-Ibrahim M, et al. Oleic acid induces lung injury in mice through activation of the ERK pathway. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:956509.
19. Blank R, Napolitano LM. Epidemiology of ARDS and ALI. *Crit Care Clin*. 2011;27(3):439-58.

20. Roux J, McNicholas CM, Carles M, Goolaerts A, Houseman BT, Dickinson DA, et al. IL-8 inhibits cAMP-stimulated alveolar epithelial fluid transport via a GRK2/PI3K-dependent mechanism. *FASEB J.* 2013;27(3):1095-106.
21. Alessandri F, Pugliese F, Ranieri VM. The Role of Rescue Therapies in the Treatment of Severe ARDS. *Respir Care.* 2018;63(1):92-101.
22. Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Dupré G, et al. AP301, a synthetic peptide mimicking the lectin-like domain of TNF, enhances amiloride-sensitive Na(+) current in primary dog, pig and rat alveolar type II cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(3):356-63.
23. Fudala R, Krupa A, Matthay MA, Allen TC, Kurdowska AK. Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(2):L364-74.
24. Mokra D, Kosutova P, Balentova S, Adamkov M, Mikolka P, Mokry J, et al. Effects of budesonide on the lung functions, inflammation and apoptosis in a saline-lavage model of acute lung injury. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67(6):919-32.
25. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol.* 1996;133(5):1041-51.
26. Wang C, Huang Q, Zhu X, Duan Y, Yuan S, Bai X. Hydroxysafflor yellow A suppresses oleic acid-induced acute lung injury via protein kinase A. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(3):895-904.

Table 1 - Hemodynamic and ventilatory variables, data of gas exchange during experiment

Variável	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	p
HR, beats/min	88±31.5	128.3±44.8	99.1±17.2	104.8±17.9	101.8±34.3	106.5±37.9	96.8±21.4	99±33.3	p<0.510
MAP, mmHg	92.1±14.7	79±27.4	76.2±20	86.7±19.7	86.1±24	80±24.7	73.8±32.5	81.8±15.6	p<0.909
Cst	33.1±11.6 *	13.8±5.3 *	17.9±5.3 *	18.5±5.7 *	18.8±5.3 *	18±5 *	17.5±7.02 *	18.3±5.6 *	p<0.00
Cdyn	19.9±5.1 *	9.61±3.6 *	12.2±2.2 *	11.6±1.9 *	12±2.07 *	12.3±0.5 *	10.8±2.3 *	10.9±2.1 *	p<0.00
PIP, cmH2O	17.5±4 *	26.9±6.3 *	28.1±6.8 *	29.1±6.7 *	28.2±5.5 *	27.3±4.8 *	28.5±6.3 *	27.2±4.9 *	p<0.00
Pplat, cmH2O	12.5±3.6 *	18.6±5 *	20.2±3.8 *	20.1±4.3 *	19.8±3.9 *	20.1±4.9 *	19.8±5.3 *	18.8±4 *	p<0.04
Resistance	16±4.8 *	31.3±11.2 *	26.8±8.2 *	27.7±9.7 *	27.4±9.3 *	28.3±9.3 *	27.5±7.3 *	24.1±4.5 *	p<0.00
PaCO2	43.9±5.3 **	62±14.2 **	52.1±7.5 **	49.1±3.7 **	50.1±7.4	53.2±5.7 **	59.9±20	51.5±8.4	p<0.00
PaO2/FiO2	405.2±61.1 ***	193±63.1 ***	222.4±84.4 ***	297.6±89.2 ***	288.1±85.7 ***	280.2±111.1	290.7±138.9 ***	304±100 ***	p<0.05

t1, before lung injury; t2, thirty minutes post administration of oleic acid; t3, thirty minutes after criteria for lung injury; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; Cest, static lung compliance; Cdyn, dynamic lung compliance; PIP, peak inspiratory pressure; Pplat, plateau pressure; PaCO₂, partial pressure of arterial dioxide; PaO₂/FiO₂, partial pressure of arterial oxygen inspiratory fraction of oxygen. *t1 difference for all other times; **difference of t1 for times 2,3,4,5 and 6; ***difference of t1 for times 2,3,4,5,7 and 8.

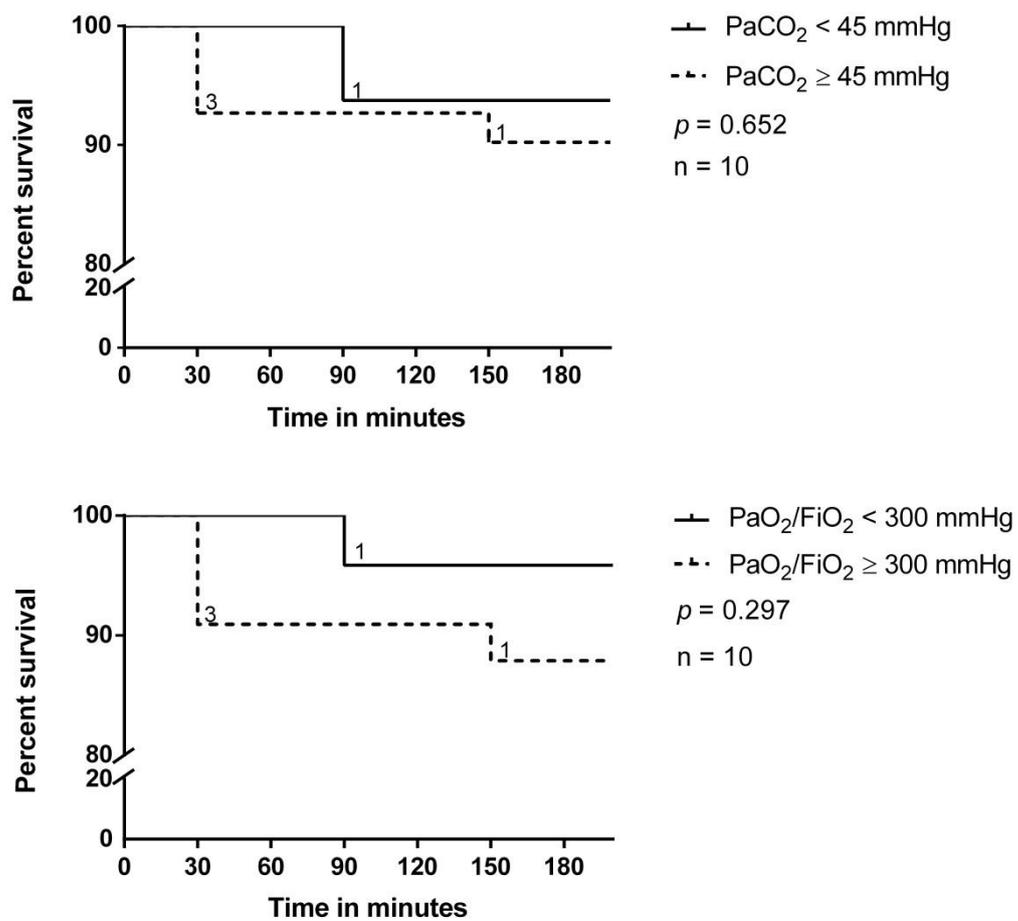


Figure 1: Survival curves of time free-events after induction of acute lung injury by oleic acid.

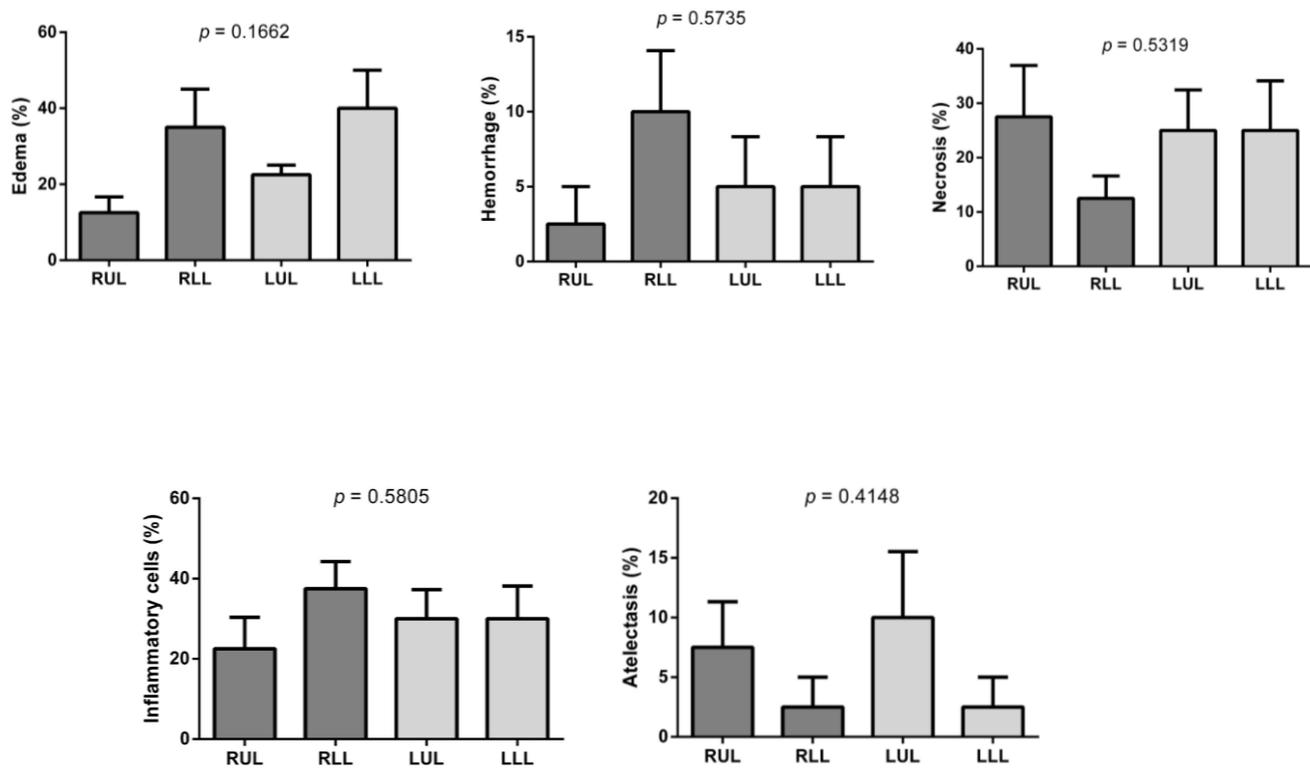


Figure 2 - Expression of histological changes in different regions of pulmonary parenchima. RUL, right upper lobe; RLL, right lower lobe; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe.

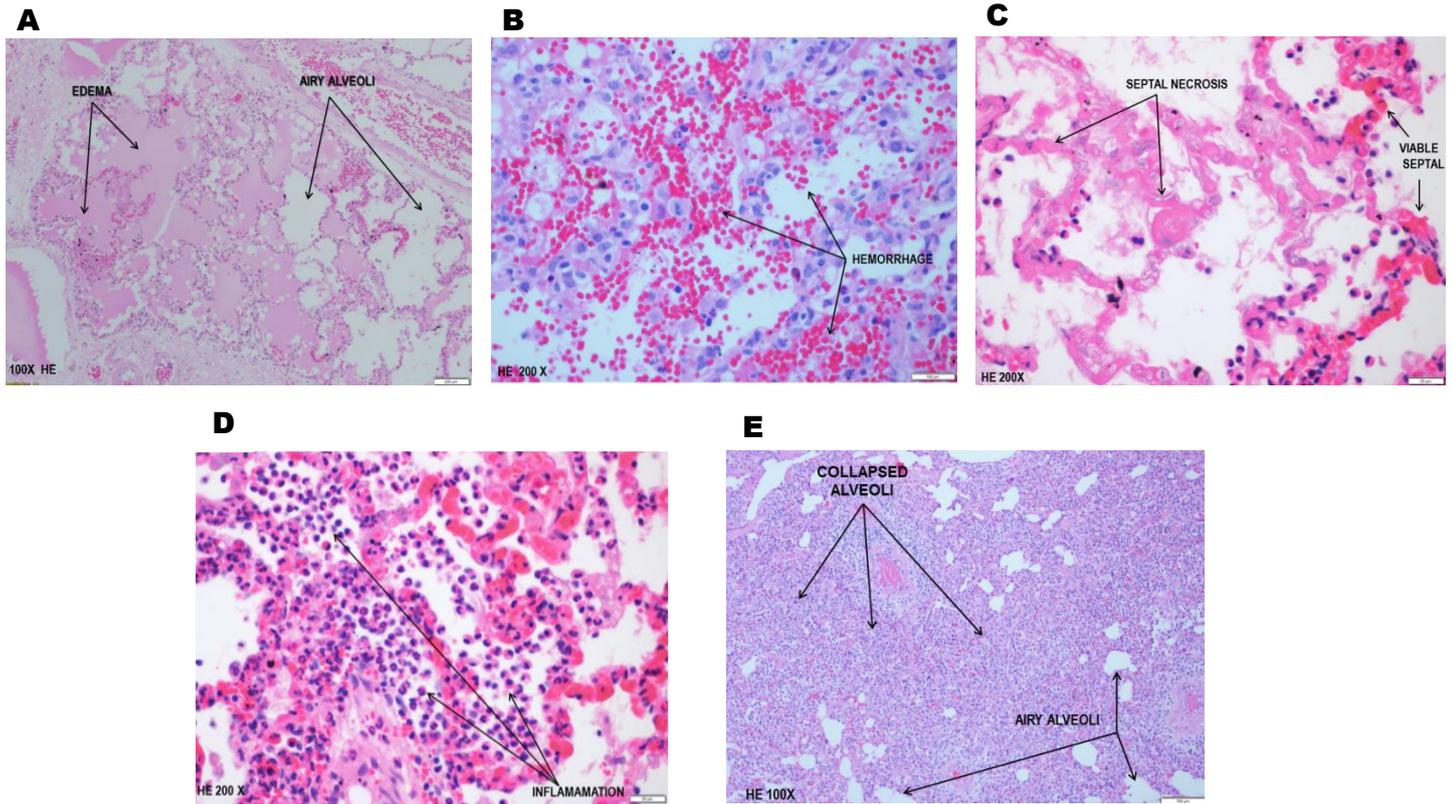


Figure 3 - Representative microscopic findings of histological changes (HE) in lung injury are placed below each graph. Figures A, B, C, D and E correspond to the fragment of the left lower lobe.

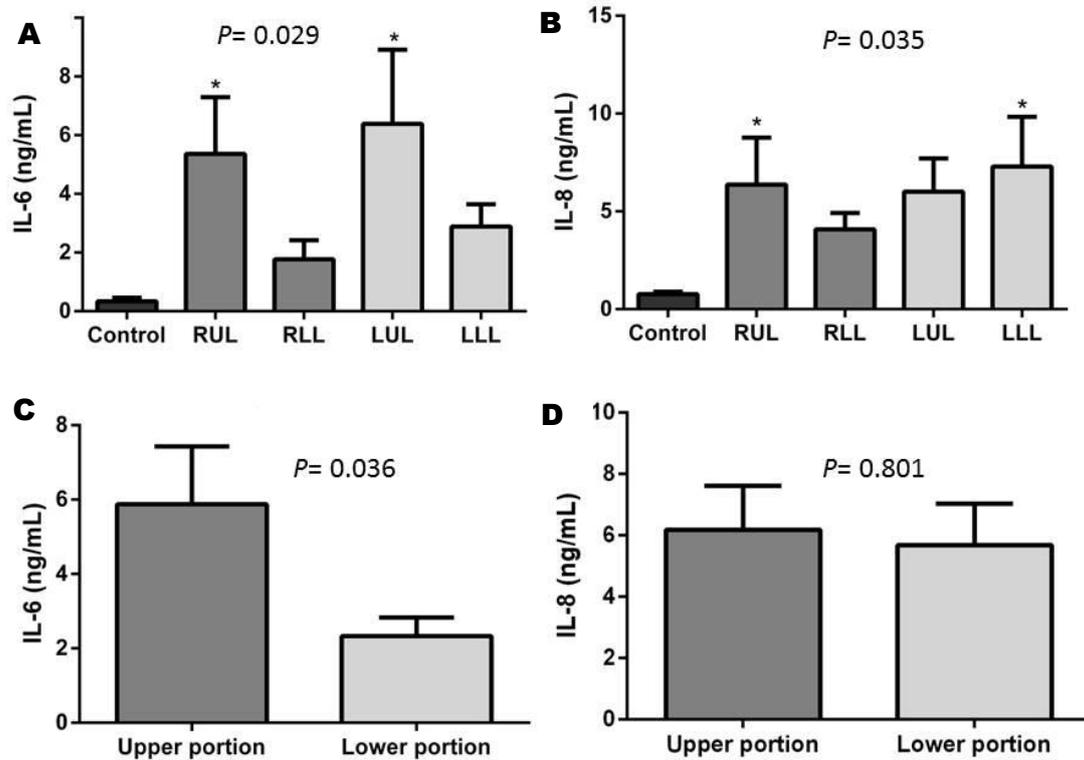


Figure 4 - Expression of IL-6 and IL-8 in lung tissue. RUL, right upper lobe; RLL, right lower lobe; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe. The top bar graphs (A and B) represent the samples of each pulmonary lobe compared to healthy control. The bottom bar graphs (C and D) represent the samples from upper lobes and lower lobes.



Figure 5: Expression of Caspase 3 in lung tissue by the immunohistochemistry. Healthy control lung (A). There was an increase in Caspase 3 in macrophage (B) and respiratory epithelium (C).

10. CONCLUSÃO

O modelo porcino de lesão pulmonar induzida por AO tem alta mortalidade, provoca uma intensa instabilidade hemodinâmica durante a sua infusão sendo necessário o uso drogas vasoativas de forma precoce. As alterações histológicas são consistentes com a lesão pulmonar com achados semelhantes a SDRA clínica. A falta de acurácia e reprodutibilidade no controle das trocas gasosas sugere ser este um modelo possa não ser o mais adequado para avaliação de protocolos de ventilação mecânica.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para avaliar a utilização do AO no desenvolvimento da SDRA administramos a dose utilizada em estudos publicados na literatura internacional. Utilizamos um protocolo de ventilação mecânica convencional para que o mesmo não interferisse nos parâmetros avaliados.

Apesar de todos os cuidados, percebemos que alguns parâmetros fogem rapidamente do controle, como por exemplo, a alteração hemodinâmica abrupta apresentada pelos animais mesmo com instituição rápida de drogas vasoativas e a falta de acurácia no controle das trocas gasosas, sugerindo ser este um modelo pouco confiável para avaliação de protocolos de ventilação mecânica. Além disso, a alta mortalidade nos desencoraja a realizar novos estudos com esse mesmo modelo de lesão pulmonar.

Acreditamos que o presente trabalho tenha auxiliado na identificação das principais dificuldades na realização de um modelo porcino de lesão pulmonar induzida por AO, contribuindo dessa forma para que futuros trabalhos identifiquem precocemente as dificuldades e estabeleça previamente um protocolo para manejo das mesmas.