



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

XXIV CICLO

**STUDIO DEI MECCANISMI COINVOLTI NEL
“VENTILATOR-INDUCED LUNG INJURY”**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d’indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore: Ch.mo Prof. Carlo Ori

Dottorando: Matteo Parotto

ABSTRACT

Introduzione. La ventilazione meccanica (MV) ha rappresentato un fondamentale passo avanti nell'assistenza dei pazienti sia in terapia intensiva sia in anestesia. Purtroppo però essa può esacerbare, o addirittura iniziare, un danno polmonare acuto. Molti pazienti con Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ventilati meccanicamente sviluppano fibrosi polmonare. Abbiamo ipotizzato che la MV possa contribuire mediante diversi meccanismi allo sviluppo di tale fibrosi.

Materiali e metodi. In vitro. Cellule epiteliali alveolari umane BEAS-2B sono state sottoposte ad allungamento meccanico ciclico per 24 o 48 ore, e quindi si è analizzata l'espressione di marcatori epiteliali e mesenchimali in esse. *In vivo.* Topi C57 Bl/6 sono stati randomizzati verso 4 trattamenti: controlli sani; inalazione di acido cloridrico (HCl); inalazione di soluzione di controllo seguita dopo 24 ore da MV; inalazione di HCl seguita dopo 24 ore da MV. Gli animali trattati sono stati quindi seguiti per periodi di 3, 8 e 15 giorni dopo l'inalazione. Si sono analizzate le meccaniche polmonari, l'istologia polmonare, i fibrociti circolanti, i quantitativi di idrossiprolina così come l'espressione di marcatori epiteliali e mesenchimali nei polmoni.

Risultati. In vitro. L'allungamento meccanico ciclico ha determinato nelle cellule BEAS-2B una riduzione nell'espressione dei marcatori epiteliali citocheratina 8, E-caderina e pro-proteina del surfattante B (proSPB), ed un aumento dell'espressione di TGF- β 1 e β -catenina e dei marcatori mesenchimali α -SMA e vimentina A. *In vivo.* La MV, da sola o in associazione all'inalazione di HCl, ha determinato alterate meccaniche polmonari, un aumento del contenuto di idrossiprolina e dell'espressione di TGF- β 1 e

β -catenina e dei marcatori mesenchimali α -SMA e vimentina A, ed una diminuita espressione dei marcatori epiteliali citocheratina 8, E-caderina e proSPB. I fibrociti circolanti non sono stati influenzati dalla MV. L'istologia polmonare ha mostrato aumentata fibrosi negli animali trattati e potenziale transizione epitelio-mesenchimale dopo inalazione di HCl seguita da MV.

Conclusioni. Lo stress meccanico determina fibrosi polmonare, e il fenomeno della transizione epitelio-mesenchimale potrebbe giocare un ruolo in questo processo. Se i risultati del nostro lavoro saranno confermati, la modulazione della risposta fibrotica nei pazienti che necessitano di MV potrebbe rappresentare un nuovo, importante bersaglio terapeutico da investigare.

ABSTRACT

Introduction. Mechanical ventilation (MV) represented a fundamental step forward in the care of patients in both intensive care and anesthesia. Unfortunately, it can exacerbate, or even initiate, acute lung injury. Many mechanically ventilated patients with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) go on to develop pulmonary fibrosis. We hypothesized that the MV may contribute to the development of this fibrosis through different mechanisms.

Materials and methods. In vitro. Human alveolar epithelial cells BEAS-2B were subjected to cyclic mechanical stretch for 24 or 48 hours, and then the expression of epithelial and mesenchymal markers was analyzed. *In vivo.* Mice C57 BL/6 were randomized to 4 treatments: healthy controls; inhalation of hydrochloric acid (HCl) inhalation of control solution followed 24 hours later by MV; inhalation of HCl followed 24 hours later by MV. Treated animals were then followed for periods of 3, 8 and 15 days after inhalation. We analyzed lung mechanics, lung histology, circulating fibrocytes, the quantities of hydroxyproline as well as the expression of epithelial and mesenchymal markers in the lungs.

Results. In vitro. The cyclic mechanical stretch in BEAS-2B cells resulted a in reduction in the expression of epithelial markers cytokeratin 8, E-cadherin and pro-surfactant protein B (proSPB), and increased expression of TGF- β 1 and β -catenin and of the mesenchymal markers α -SMA and vimentin A. *In vivo.* MV, alone or in combination with the inhalation of HCl, resulted in altered lung mechanics, an increase of hydroxyproline content and expression of TGF- β 1, β -catenin and the mesenchymal

markers α -SMA and vimentin A, and a decrease in the expression of the epithelial markers cytokeratin 8, E-cadherin and proSPB. The circulating fibrocytes count was not affected by MV. Histological examination showed increased pulmonary fibrosis in treated animals and potential epithelial-mesenchymal transition after inhalation of HCl followed by MV.

Conclusions. Mechanical stress causes pulmonary fibrosis, and the phenomenon of epithelial-mesenchymal transition may play a role in this process. If the results of our work are confirmed, the modulation of the fibrotic response in patients who require MV may represent an important new therapeutic target to investigate.

INTRODUZIONE

Il danno polmonare acuto (Acute Lung Injury, ALI) e la sua forma più severa, la sindrome da distress respiratorio acuto (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), consistono in condizioni cliniche complesse caratterizzate da un'insufficienza respiratoria ipossiémica acuta con infiltrati polmonari bilaterali, che si sviluppa in conseguenza di eventi patologici a carico del polmone o a carico di altri organi, in assenza di ipertensione atriale sinistra [1]. Tali condizioni affliggono ogni anno circa 190000 cittadini statunitensi, e dati simili riguardano anche l'Unione Europea [2]. Nonostante importanti passi avanti nei meccanismi fisiopatologici e nel trattamento, la mortalità nei pazienti affetti da ARDS rimane elevata (36-44%) [3]. La maggior parte dei pazienti supera la fase acuta, ma molti proseguono verso il decesso, spesso con evidenza di fibrosi polmonare [4]. Infatti, fibrosi polmonare è stata rinvenuta nel 53% dei pazienti ventilati meccanicamente che avevano ARDS per 5 giorni o più [5]. La biopsia trans-bronchiale ha rivelato che il 64% dei pazienti con ARDS ventilati per una media di 12 giorni sviluppa fibrosi polmonare, ed in essi il tasso di mortalità è stato del 57%, rispetto allo 0% nei pazienti senza fibrosi polmonare [6]. Sembra che l'esito dei pazienti con ARDS possa essere migliorato utilizzando informazioni da biopsie polmonari per guidare la terapia antifibrotica dopo 5 giorni di ARDS [4, 7], dimostrando così che l'andamento clinico della fibrosi polmonare è potenzialmente reversibile in questa patologia, un risultato diverso da pazienti con tipica fibrosi polmonare idiopatica, in cui la malattia è di solito irreversibile [8-10]. I meccanismi alla base della fase fibrotica dell'ARDS sono però in gran parte sconosciuti. Alcune indagini si sono incentrate sulla risposta delle cellule immunitarie nella fase acuta di ARDS come un fattore chiave nello sviluppo di fibrosi [11]. Un'altra possibilità riguarda il

ruolo dell'epitelio alveolare, che in passato è stato considerato come uno spettatore passivo nello sviluppo della fibrosi polmonare cronica. Tuttavia, studi recenti hanno suggerito come la continua apoptosi delle cellule epiteliali alveolari e la ritardata riparazione delle ferite possano svolgere un ruolo importante nella patogenesi della fibrosi polmonare [10, 12-15], mediata attraverso un fenomeno di transizione epitelio-mesenchimale (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT).

La ventilazione meccanica (Mechanical Ventilation, MV) è un trattamento salvavita fondamentale, e praticamente tutti i pazienti con ARDS ricevono ventilazione meccanica. Purtroppo, già poco dopo la sua introduzione nella pratica clinica è divenuto evidente come questo trattamento possa esacerbare, e addirittura a sua volta iniziare, un danno polmonare acuto, determinando il cosiddetto "Ventilator-induced lung injury" (VILI) [16]. La sovradistensione regionale alveolare che si osserva durante la ventilazione può indurre un eccessivo stress meccanico alla matrice extracellulare, che porta allo sviluppo di edema interstiziale, frammentazione della matrice extracellulare [17], lesioni epiteliali e biotrauma caratterizzato da infiltrazione dei neutrofili e produzione di citochine infiammatorie [18,19]. Questi meccanismi sono anche di diretta rilevanza per lo sviluppo della fibrosi. Pertanto, abbiamo ipotizzato che il danno polmonare indotto dal ventilatore, il VILI, possa giocare un ruolo nella fibrosi associata ad ARDS; in particolare, abbiamo considerato che il contributo del VILI a tale fibrosi potrebbe essere caratterizzato da cambiamenti nei marcatori di EMT, un meccanismo che potrebbe essere stato in precedenza trascurato [4-7, 19-21].

Per verificare questa ipotesi, abbiamo utilizzato un modello *in vitro* costituito da un sistema meccanico di stiramento di cellule epiteliali polmonari umane con lo scopo di esaminare specificamente gli effetti dello stress meccanico sullo sviluppo di fibrosi e di EMT, ed un modello *in vivo* costituito da un modello murino di danno polmonare acuto

indotto da aspirazione di acido cloridrico seguita da ventilazione meccanica.

MATERIALI E METODI

Cellule e sistema di stress meccanico. Cellule epiteliali polmonari umane (BEAS-2B; ATCC, Manassas, VA) sono state seminate in piastre di cultura a sei pozzetti BioFlex (Flexcell International Corporation, Hillsborough, North Carolina) ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) contenente il 10% di siero fetale bovino per 30 ore e in Dulbecco's Minimal Essential Medium contenente l'1% di siero fetale bovino per 24 ore. Le cellule sono state poi sottoposte ad allungamento ciclico del 30% per 24 e 48 ore ad una frequenza di 30 cicli / min (FX 4000; Flexcell international Corporation, Hillsborough, NC).

Modello di aspirazione di acido e di ventilazione meccanica. Il protocollo di studio è stato approvato dal comitato istituzionale per l'utilizzo degli animali del St. Michael's Hospital, "Animal Care and Use Committee of St. Michael's Hospital" (Toronto, Ontario, Canada), ove gli esperimenti sono stati condotti. Topi C57 Bl/6 di età compresa tra 8 e 12 settimane sono stati anestetizzati con iniezione intraperitoneale di una miscela contenente Ketamina 200mg/kg e Xylazine 10mg/kg, e quindi randomizzati in 3 gruppi: 1) instillazione intratracheale di acido idrocloridrico (HCl), gruppo HCl, n = 24; 2) instillazione intratracheale di soluzione di controllo + ventilazione meccanica, gruppo MV, n = 24; 3) instillazione intratracheale di HCl + ventilazione meccanica, gruppo HCl + MV, n = 24. Gli animali hanno ricevuto l'instillazione intratracheale di HCl (pH 1.2, 2ml/kg) oppure di un volume equivalente di soluzione di controllo (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4). Dopo l'instillazione, si è atteso che gli animali si risvegliassero dall'anestesia e quindi essi sono stati riportati nella housing facility per la permanenza, con libero accesso ad acqua e cibo. Dopo 24h, gli animali

dei gruppi MV e HCl+MV sono stati anestetizzati e sottoposti ad intubazione endotracheale, seguita da ventilazione meccanica per 2 ore con i seguenti parametri: frazione inspiratoria di ossigeno (FiO₂) 0.4; pressione di picco inspiratorio 22 cmH₂O; pressione positiva di fine espirio (PEEP) 2 cmH₂O; frequenza respiratoria 120/min. Al termine del periodo di ventilazione meccanica gli animali, estubati, sono stati inviati nuovamente nella housing facility per la permanenza, con libero accesso ad acqua e cibo, ed osservati per i 3, 8 o 15 giorni successivi all'instillazione endotracheale di HCl o di soluzione di controllo. Un gruppo aggiuntivo di animali sani (n = 6) è stato sottoposto ad eutanasia mediante overdose di anestesia e utilizzato come gruppo di controllo. Al completamento degli esperimenti, il polmone destro è stato congelato in azoto liquido e conservato a - 80°C per le misurazioni di mRNA e proteine.

Meccanica Respiratoria. Ai “time-points” sopra indicati, 8 animali sono stati anestetizzati, curarizzati e tracheostomizzati per procedere alla misurazione della meccanica polmonare (FlexiVent rodent ventilator system; Scireq, Montreal, Canada). La misura dell'elastanza polmonare è stata effettuata secondo il metodo precedentemente descritto “multifrequency forced oscillation technique and a constant phase model fit” [22].

Istopatologia ed immunoistochimica del polmone. Il polmone sinistro è stato trattato con colorazione tricromica di Masson per l'identificazione del collagene. La valutazione istologica dei preparati è stata effettuata da un patologo “cieco” rispetto agli esperimenti eseguiti. Il danno polmonare è stato quantificato mediante un punteggio precedentemente descritto, il quale attribuisce un grado da 0 a 4 a ciascuno dei seguenti parametri: atelettasie, enfisema, edema perivascolare, edema alveolare, congestione,

emorragia alveolare, emorragia perivascolare, infiltrazione alveolare e interstiziale di leucociti polimorfonucleati, e formazione di membrane ialine [23]. La fibrosi è stata valutata in modo quantitativo secondo una scala numerica precedentemente descritta [24].

Si è effettuata una duplice colorazione fluorescente per citocheratina ed α – actina del muscolo liscio (α -SMA). Per fare ciò, si è proceduto a bloccare le sezioni di polmone con una miscela di frammenti Fab di IgG di capra anti-topo (Jackson ImmunoResearch) e albumina da siero bovino (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Quindi si è proceduto ad incubazione di una notte con anticorpi monoclonali murini anti-citocheratina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) seguita da Alexa 484 di capra anti-topo (Invitrogen). Dopo accurato lavaggio è stato applicato un anticorpo monoclonale murino anti- α -SMA coniugato con Cy3 (Sigma). I preparati sono stati contrastati con diamidino fenil indolo (Sigma Chemical Co.) se necessario. I preparati sono stati analizzati utilizzando un microscopio laser confocale (Zeiss510, Oberkochen, Germany).

Misurazione dell'idrossiprolina. Il polmone destro è stato omogeneizzato in 2ml di PBS, ed un'aliquota di 1 mL è stata lasciata essiccare ed idrolizzata in HCl 6 N a 110°C per 12 h. Aliquote di 25 μ L sono state aggiunte a 1 mL di buffer a pH 6.0 contenente 1.4% cloramina T (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10% *n*-propanololo, e 0.5 M sodio acetato, pH 6.0 e incubate per 20 minuti a temperatura ambiente. La soluzione di Erlich (1 M *p*-dimethylaminobenzaldeide [Sigma-Aldrich] in 70% *n*-propanololo, 20% acido perclorico) è stata quindi aggiunta e si è proceduto ad incubazione per 15 min a 65°C. La curva standard dell'idrossiprolina è stata preparata utilizzando diluizioni

seriali da una soluzione stock di 1 mg/mL (Sigma-Aldrich). L'assorbanza è stata misurata a 550 nm.

Rilevazione dei fibrociti. Buffy-coat è stato ottenuto dal sangue intero raccolto utilizzando sodio citrato come anticoagulante. Le cellule sono state seminate su piastre a 96-pozzetti (Falcon; BD Biosciences) a 100 μ L /pozzetto e ad una densità di 1×10^6 cellule per pozzetto e colorate per il marker di superficie CD45 (PerCP anticorpo di ratto anti-CD45 murino; BD Pharmingen) a 5 μ g/mL o anticorpi di controllo isotipo (IgG1, BD Biosciences) per 30 minuti, seguiti da lavaggi. Le cellule sono state permeabilizzate con 0,25% Triton X-100 e poi incubate con anticorpi di coniglio anti-collagene 1 murino (Millipore, Billerica, MA) o anticorpi di controllo IgG isotipo (R & D Systems, Minneapolis, MN) per 30 minuti e lavate, seguito da anticorpo secondario (anticorpo secondario policlonale di capra per IgG di coniglio, Dy- Luce 488; Abcam, Cambridge, MA) con diluizione 1:20.000 e fissazione. Citometria a flusso è stata effettuata con software FACSCanto e FACSDiva (BD Biosciences). Cellule gated per CD45 sono state analizzate per espressione di collagene 1. Un corrispondente isotipo IgG di controllo è stato utilizzato per impostare le soglie di controllo negativo [25]. Il numero di fibrociti è espresso come percentuale della conta dei leucociti totali.

Reazione a catena della Polimerasi - Trascrittasi inversa (RT-PCR). Il tessuto polmonare è stato omogeneizzato e le cellule BEAS-2B sono state lisate, e l'RNA totale è stato estratto utilizzando il ISOL-RNA Lysis Reagent (5 PRIME, Markham, Ontario, Canada). I prodotti della PCR sono stati posti su un gel di agarosio 1%, colorati con etidio bromuro, ed il tutto fotografato sotto illuminazione a raggi ultravioletti. L'intensità della banda è stata quantificata mediante il software Image J 1.42q (Scion

Corporation, Frederick, MD). I primers e le condizioni utilizzate per la RT-PCR sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Tabella 1. Primers umani (per l'analisi su campioni da cellule BEAS-2B) e condizioni della RT-PCR.

Primer	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Annealing Temperature (°C)	Cycles (n)
β-Catenin	TGGACCACAAGCAGAGTGCTGA	CCCTGTACCAGCCCAAGG	55	35
TGF-β	AGGAGGTCACCCGCGTGCTA	CAGCGGGGTGGCCATGAGAA	55	35
Vimentin	GAGGAGATGCGGGAGCTGCG	ACGTACGTCACGCAGGGCAG	55	35
α-SMA	GCGGGGTCAGCACTTCGCAT	GCTCTGTGCTTCGTCACCCACG	55	35
Pro-SP-B	TGGGGACATGTGGGAGCCGA	GAGCCCTGCAGAGCCAGCAA	37	50
Cytokeratin-8	AGCCGGCTCCAGGCTGAGAT	TGCATAGCCGCTGGTGGTCT	55	35
E-Cadherin	TGCACCGGTCGACAAAGGACA	GGGGTGTGTCAGCTCCTTGGC	55	35
β-Actin	GTCCGGCATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT	55	35

Tabella 2. Primers murini (per l'analisi su campioni dagli esperimenti *in vivo*) e condizioni della RT-PCR.

Primer	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Annealing Temperature (°C)	Cicli (n)
β-Catenin	TCTCACCACCGCGAGGGCTT	AAGGCTTGGGGTCCACCACTG	55	35
TGF-β	GTGCCCGAACCCCATTTGCT	GTGCAGGTGCTGGGCCCTTT	55	35
Vimentin	ACCTCACTGCTGCCCTGCGT	CTCATCTGCAGGCGGCCAA	55	35
α-SMA	AGCGTGGCTATTCTTCGTGACT	CATGGTGCCTGGGTGCGAGGG	55	35
SP-B	AGGACTTCTCTGAGCAACAG	ATGGCATCCTCAGGAAGA	60	35
Cytokeratin-8	ATGCAGGGCCTGGTGGAGGA	GCCTCAGCTCGGCTGCGATT	55	35
E-Cadherin	CCAGTTTCTCGTCCGCGCC	GCTCCTTGGCCGGTGATGCT	60	35
β-Actin	TGTTACCAACTGGGACGACA	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	55	35

Sodio Dodecilsolfato-poliacrilammide Gel Elettroforesi e Western Blotting. Il tessuto polmonare è stato omogeneizzato e le cellule BEAS-2B sono state staccate in un buffer di lisi, e quindi si sono posti in 10% sodio dodecilsolfato-poliacrilamide gel elettroforesi con un Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a 150 V, 100 mAmp per 1 ora, e trasferiti su di una membrana di polivinil fluoruro (Bio-Rad). La membrana è stata lavata e bloccata con Trisbuffered NaCl contenente 0,1% di Tween-20 e 10% di non fat dry milk prima dell'incubazione per una notte con gli appropriati anticorpi primari (ad esempio, citocheratina-8 [Santa Cruz Biotechnology], Caderina-E [Santa Cruz], vimentina [Santa Cruz], e α-SMA [Abcam, Cambridge, UK]) nel blocking buffer a 4 ° C. Gli anticorpi secondari sono stati poi utilizzati con un titolo 1:6000 di goat antimouse IgG-horseradish peroxidase per citocheratina-8, caderina E, vimentina, o 1:6000 di goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase per α-SMA (Pierce, Thermo Scientific, Ottawa,

Ontario, Canada) in blocking buffer per 1 ora a temperatura ambiente. Le bande sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (reagenti di rilevamento Amersham ECL Western Blotting; GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Anticorpi anti-actina umana (Santa Cruz Biotechnology Inc.) sono stati utilizzati come controlli di carico.

Immunoistochimica. Sono state eseguite duplici colorazioni fluorescenti per citocheratina e α -SMA.

Analisi statistica. I dati sono riportati come media \pm errore standard della media (SEM). Un test non parametrico è stato utilizzato per confrontare le cellule con e senza stress meccanico negli esperimenti *in vitro*. Un'analisi della varianza a 2 vie per comparazioni multiple con fattori gruppo e tempo seguita da test post-hoc di Bonferroni è stata utilizzata per gli esperimenti *in vivo*. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) è stato utilizzato per l'analisi. Le differenze sono state considerate statisticamente significative se $p < 0.05$.

RISULTATI

In vitro

Abbiamo esaminato il contributo dell'effetto diretto dello stiramento meccanico sullo sviluppo di EMT *in vitro* utilizzando cellule epiteliali polmonari umane BEAS-2B. Le cellule trattate con stress meccanico hanno espresso alti livelli di mRNA di TGF- β 1 e β -catenina a 48 ore (Fig. 1) e una progressiva diminuzione dell'espressione di mRNA di citocheratina-8, caderina-E, e pro-SPB e un aumento di espressione a livello di mRNA e di proteina di α -SMA e vimentina A (Fig. 2 A e B). Il marker di cellule epiteliali polmonari caderina-E ed il marker miofibroblastico α -SMA sono stati evidenziati con colorazione immunofluorescente nelle cellule BEAS-2B sottoposte o meno ad allungamento meccanico. Si è osservata una ridotta espressione di caderina-E e un aumento dell'espressione di α -SMA, suggerendo un processo di EMT dopo stress diretto delle cellule epiteliali polmonari.

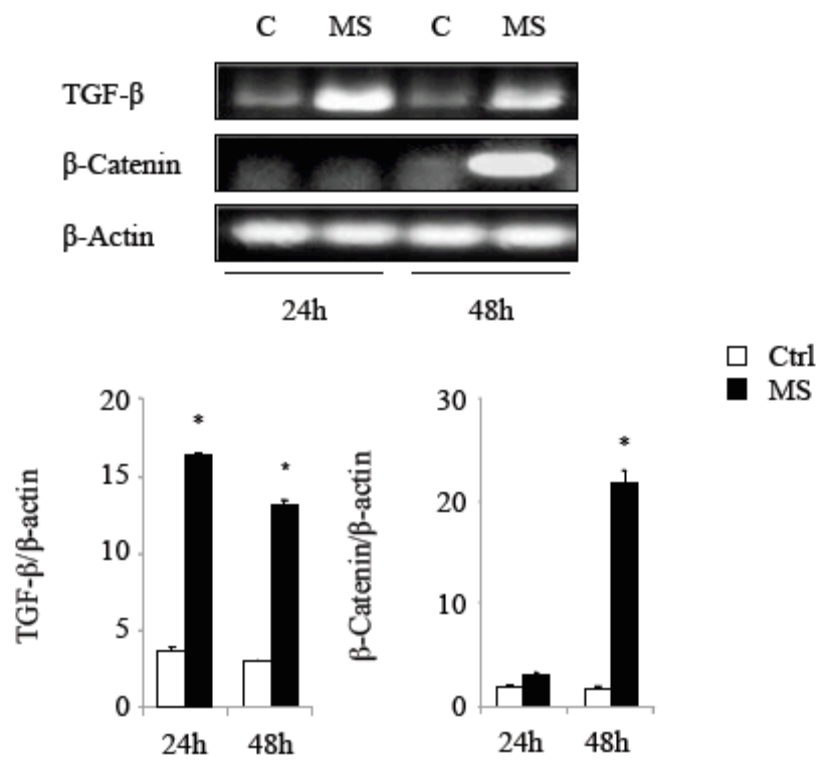


Figura 1. Espressione di mRNA di TGF-β e β-catenina in cellule BEAS-2B dopo stress meccanico. E' riportata nei grafici la densitometria relativa media rapportata alla β-actina. Ctrl = controllo. MS = stiramento meccanico. * = $p < 0.05$ vs Ctrl.

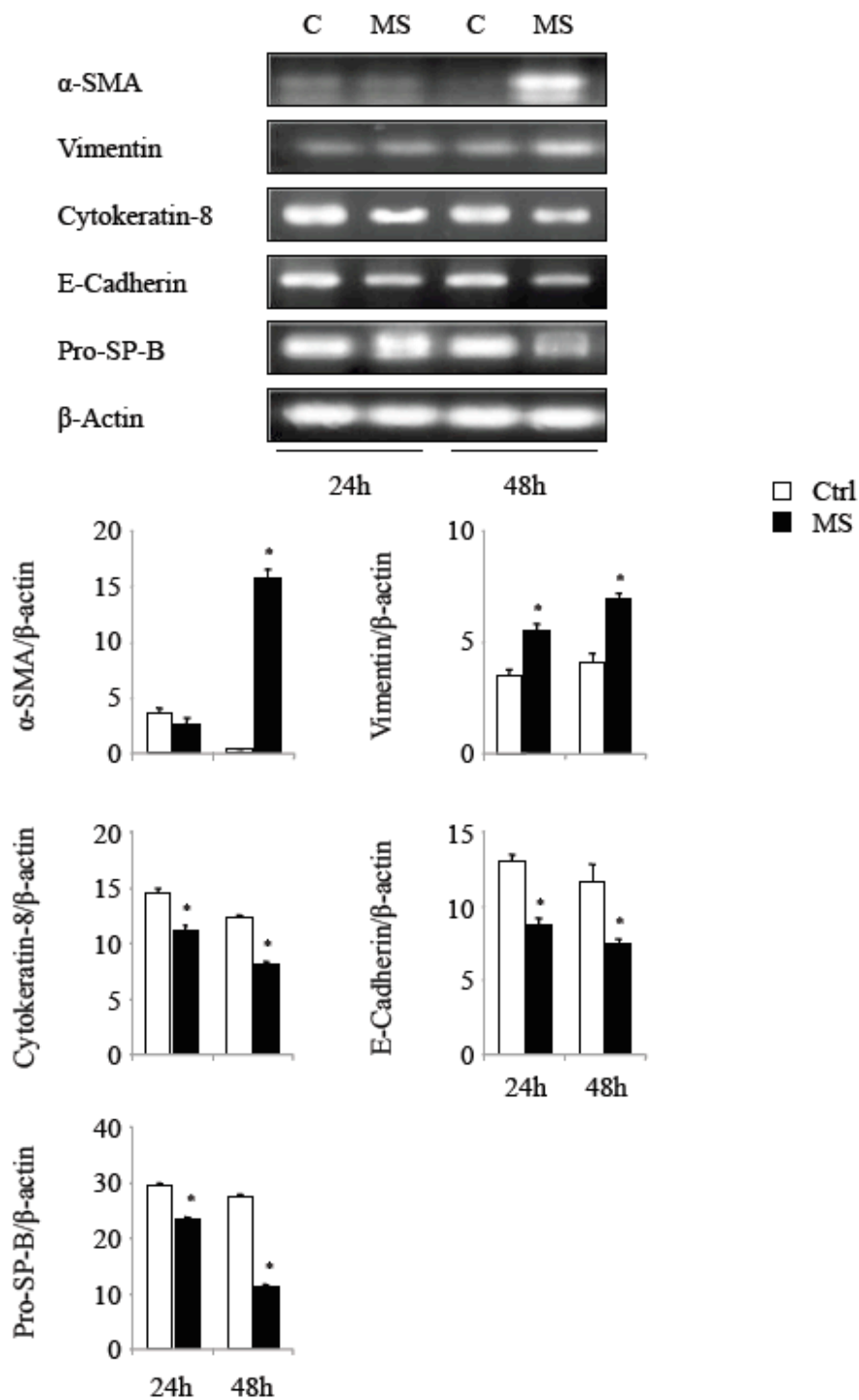


Figura 2 A). Espressione di mRNA di marcatori epiteliali e mesenchimali in cellule BEAS-2B dopo stress meccanico. E' riportata nei grafici la densitometria relativa media rapportata alla β -actina. Ctrl = controllo. MS = stiramento meccanico. * = $p < 0.05$ vs Ctrl.

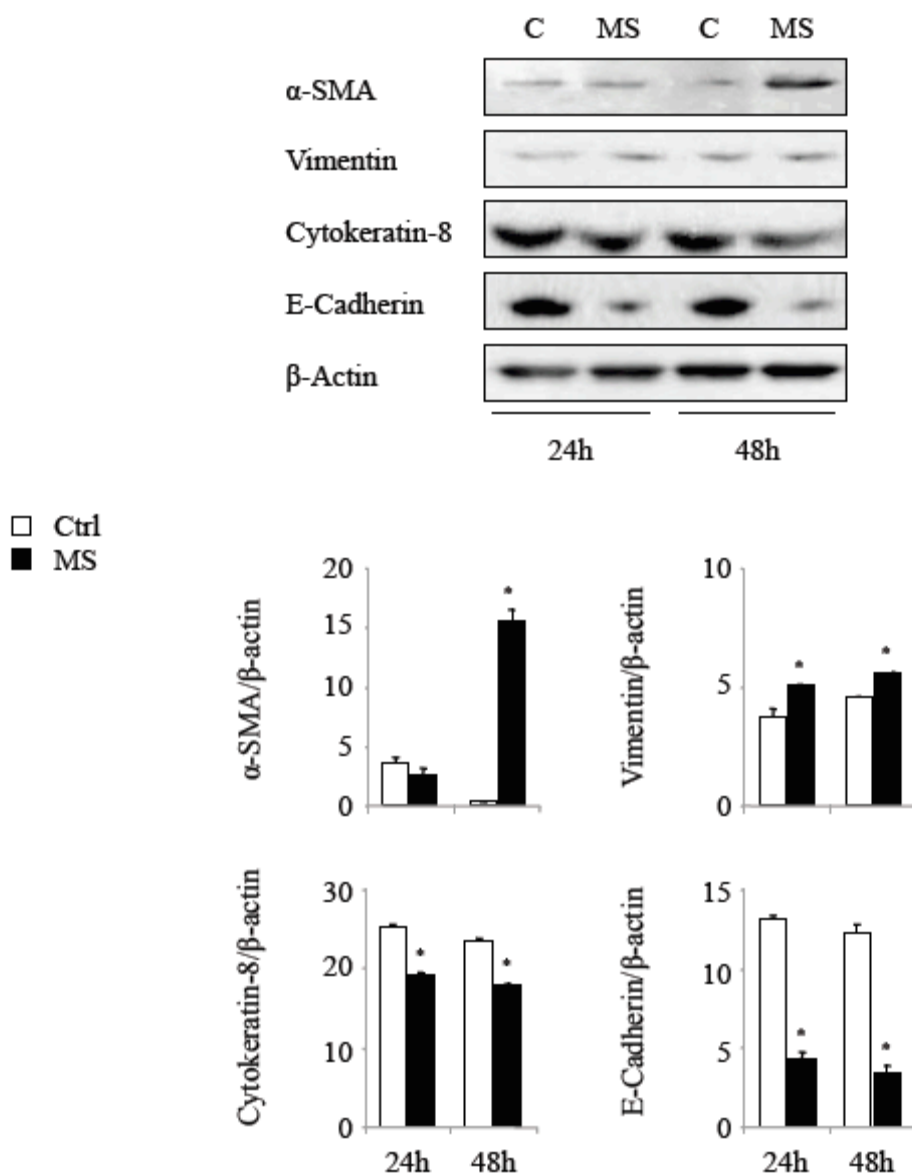


Figura 2 B). Espressione proteica di marcatori epiteliali e mesenchimali in cellule BEAS-2B dopo stress meccanico. E' riportata nei grafici la densitometria relativa media rapportata alla β -actina. Ctrl = controllo. MS = stiramento meccanico. * = $p < 0.05$ vs Ctrl.

In vivo

Meccanica del polmone e Idrossiprolina. Il volume corrente è stato di 11-13 ml/kg utilizzando ventilazione a pressione controllata. L'elastanza del polmone è risultata aumentata al giorno 3 nel gruppo HCl+MV e ai giorni 8 e 15 nei gruppi MV e HCl+MV rispetto al controllo (Fig. 3).

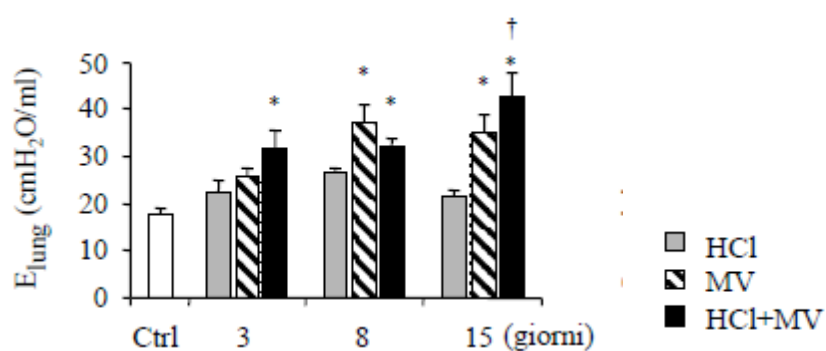


Figura 3. Elastanza del polmone (E_{lung}) negli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point.

I livelli di idrossiprolina nel polmone erano aumentati al giorno 15 nel gruppo MV rispetto ai gruppi HCl e controllo (Fig. 4).

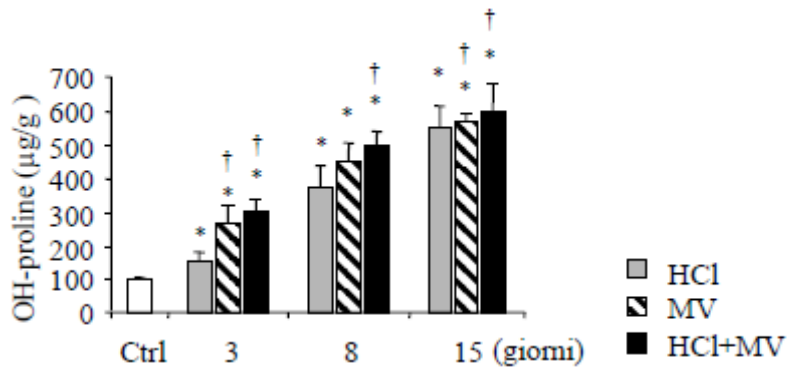


Figura 4. Livelli di Idrossiprolina (OH-proline) negli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point.

Analisi istologica del polmone. Danno polmonare e infiltrazione interstiziale di leucociti polimorfonucleati sono stati osservati al giorno 3 in tutti i gruppi sperimentali rispetto al controllo. Il punteggio di danno polmonare totale è stato maggiore in tutti i gruppi sperimentali, con il maggior danno registrato nel gruppo HCl+MV (Fig. 5).

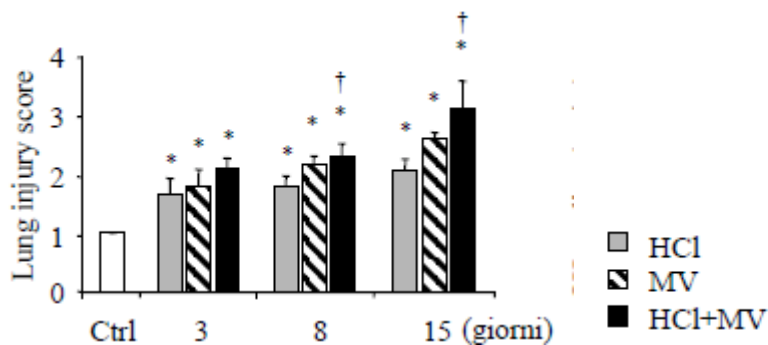


Figura 5. Punteggio di danno polmonare totale (lung injury score) negli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point.

Al giorno 15, la presentazione istologica classica di fibrosi polmonare era più evidente nel gruppo HCl+MV rispetto ai gruppi HCl o MV, con aree più ampie di deposizione di collagene nell'epitelio alveolare associata a ispessimento delle pareti alveolari e patch di tessuto. L'aumentata colorazione del collagene è stata associata ad un maggior numero di miofibroblasti positivi per α -SMA nelle pareti alveolari dei gruppi MV e HCl+MV. Il muscolo liscio che circonda le pareti vascolari è servito come controllo positivo endogeno. In contrasto, i campioni istologici di controllo sono risultati privi delle regioni con concentrazione di colorazione blu, fatto indicativo della mancanza di deposizione di collagene nel polmone sano. I punteggi di fibrosi polmonare (fibrosis score) sono stati superiori in tutti e tre le condizioni sperimentali al giorno 3 e ulteriormente aumentati nel tempo. I punteggi di fibrosi polmonare erano maggiori nel gruppo HCl+MV che negli altri due gruppi (Fig. 6).

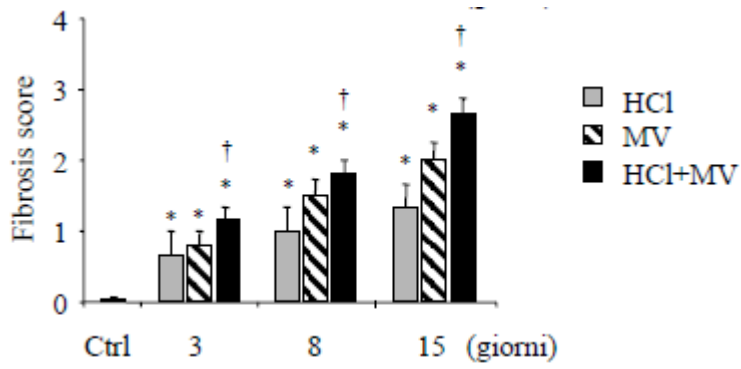


Figura 6. Punteggi di fibrosi polmonare (fibrosis score) negli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point.

Mediatori fibrotici e markers di EMT in condizioni di ventilazione meccanica in vivo.

L'espressione di mRNA del transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) era drammaticamente aumentata al giorno 3 ed al giorno 8; i livelli sono tornati alla linea di base il giorno 15. L'espressione di mRNA di β -catenina è risultata elevata in tutti i time-points nel gruppo HCl+MV, indicando un effetto moltiplicativo dei due stimoli (Fig. 7).

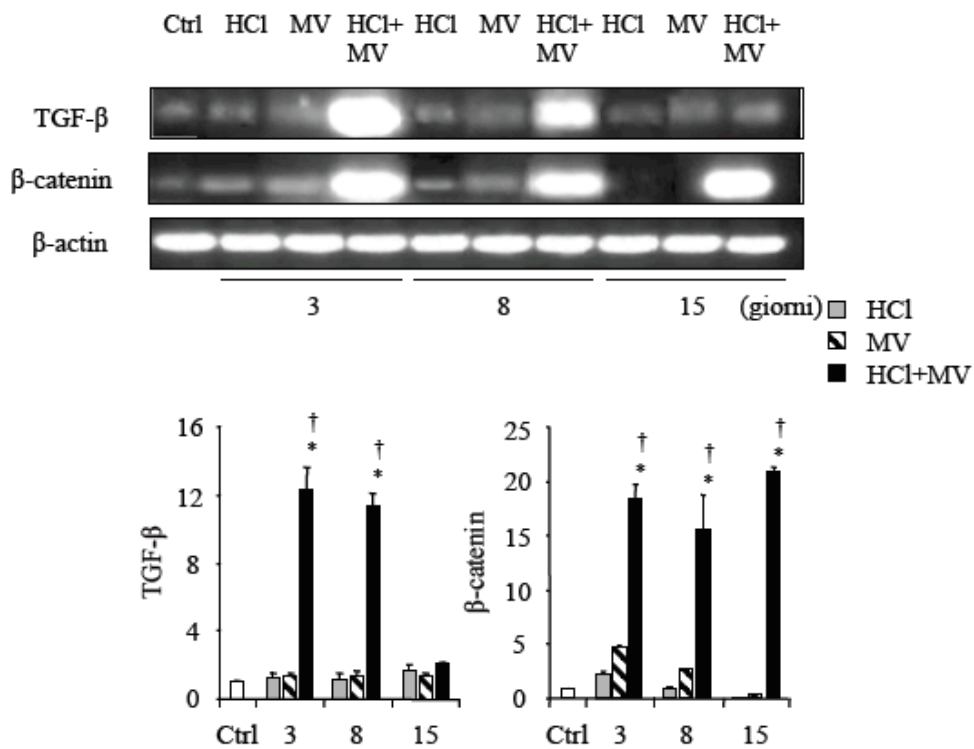


Figura 7. Espressione di mRNA di TGF- β e β -catenina nei polmoni degli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point. E' riportata nei grafici la densitometria relativa media rapportata alla β -actina.

L'espressione di citocheratina-8, E-caderina e pro-SP-B è diminuita, mentre l'espressione di α -SMA e vimentina è aumentata, sia a livello di mRNA (Fig. 8) che di proteine; questi cambiamenti sono stati più pronunciati nel gruppo HCl+MV in confronto ai gruppi HCl e MV. Nel loro insieme, i nostri risultati dimostrano aumento dei marcatori fibrotici e diminuzione dei marcatori epiteliali quando i due tipi di danno sono stati combinati, suggerendo un effetto additivo.

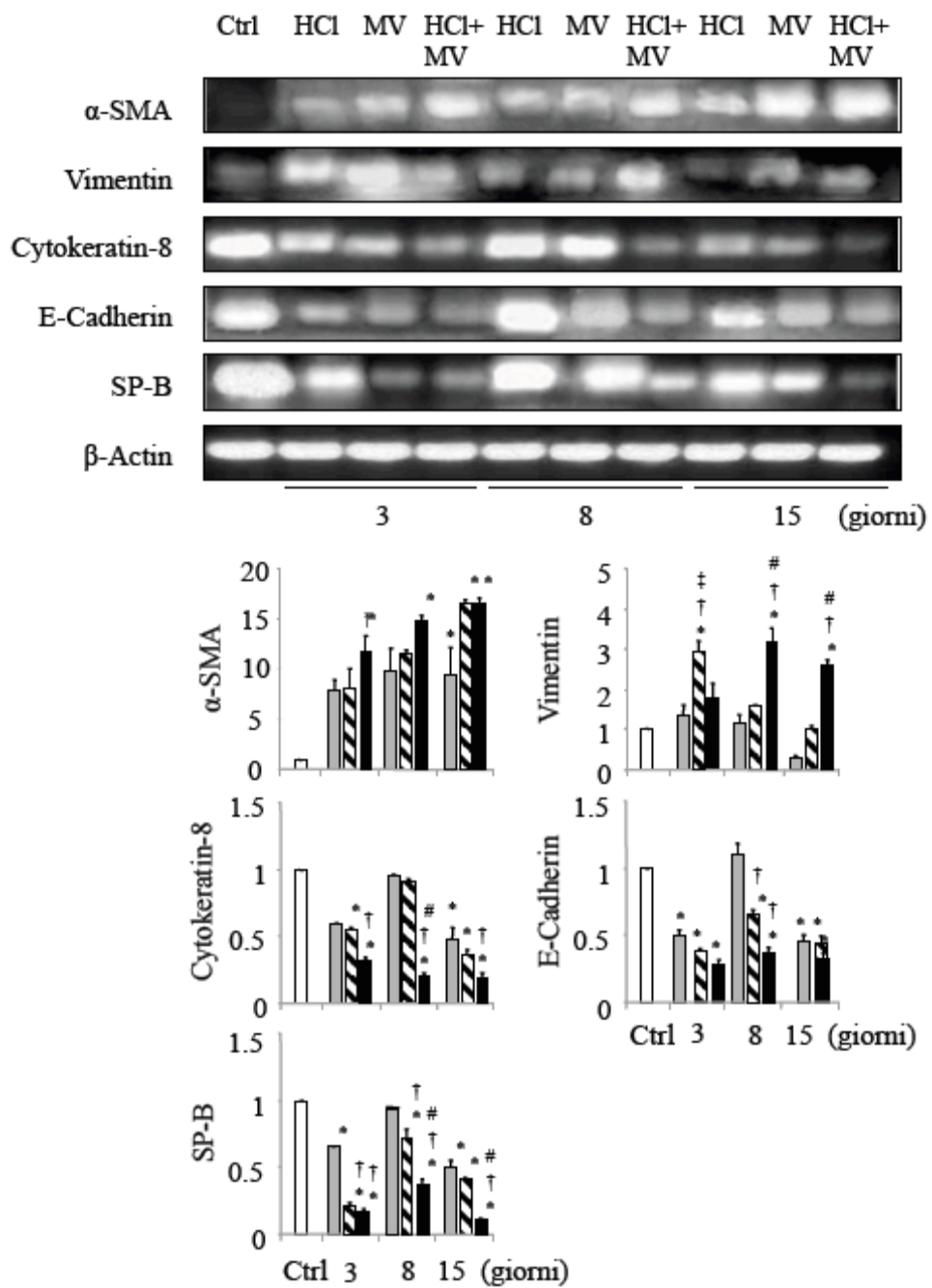


Figura 8. Espressione di mRNA di marcatori epiteliali e mesenchimali nei polmoni degli animali oggetto di studio ai diversi time-points. Ctrl = controllo. HCl = acido idrocloridrico. MV = ventilazione meccanica. * = $p < 0.05$ vs Ctrl. † = $p < 0.05$ vs HCL nel corrispondente time point. # = $p < 0.05$ vs MV nel corrispondente time point. E' riportata nei grafici la densitometria relativa media rapportata alla β -actina.

Analisi immunoistochimica. Abbiamo inoltre esaminato se cellule epiteliali polmonari si sono differenziate in miofibroblasti *in vivo* attraverso lo studio di colocalizzazione di marcatori di EMT. La doppia colorazione per il marcatore di cellule epiteliali polmonari citocheratina 8 ed il marcatore di miofibroblasti α -SMA ha dimostrato colocalizzazione in alcune cellule alveolari al giorno 15 dopo HCl+MV (Fig. 9).

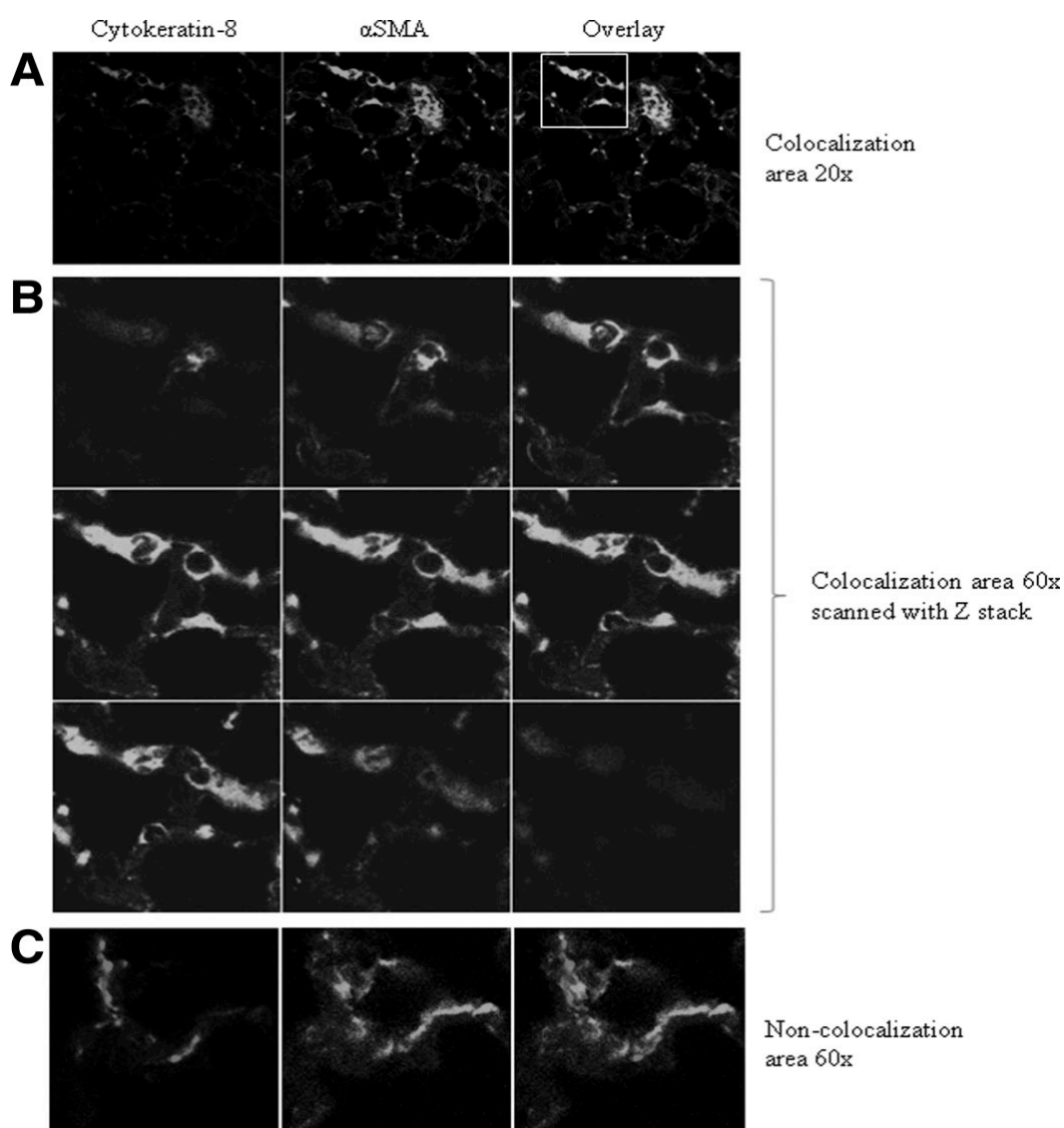


Figura 9. Analisi mediante microscopia confocale della colocalizzazione di citocheratina 8 e di α -SMA in alcune cellule alveolari dei polmoni animali del gruppo HCl+MV al giorno 15.

Questi dati suggeriscono che l'EMT possa essere coinvolta nel meccanismo sottostante alla fibrosi polmonare indotta dal ventilatore. Tuttavia, in alcune aree, la colorazione per la citocheratina e α -SMA non ha mostrato colocalizzazione, suggerendo la presenza di proliferazione di miofibroblasti α -SMA positivi.

Conta dei Fibrociti Circolanti. Il numero di fibrociti circolanti, definiti come cellule che esprimono CD45 e collagene 1, non è stato differente al giorno 15 dopo HCl, MV, o HCl+MV (Fig. 10).

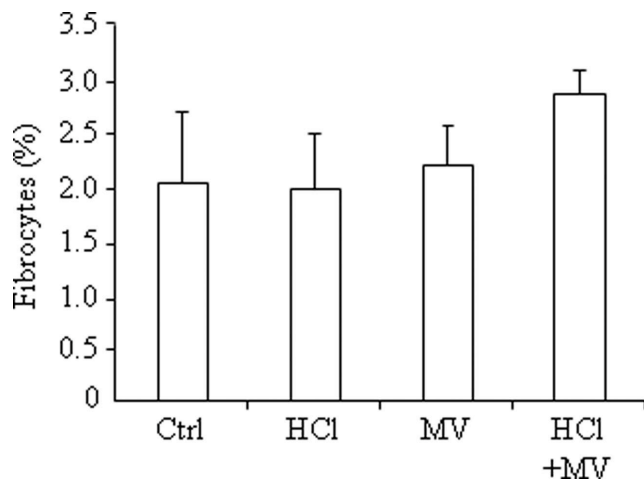


Figura 10. Conta dei fibrociti circolanti (espressi in relazione al numero di leucociti totali circolanti) negli animali dei vari gruppi sperimentali al giorno 15.

DISCUSSIONE

La fibrosi polmonare è un riscontro comune nei pazienti con ARDS nella fase post-acuta. Tuttavia, i meccanismi che mediano tale fibrosi sono in gran parte sconosciuti.

Poiché le sollecitazioni indotte dalla MV possono danneggiare l'epitelio alveolare [26-28], e possono causare biotrauma con rilascio di più mediatori, abbiamo ipotizzato che la MV giochi un ruolo importante nell'iniziare / propagare la fibrosi.

Il nostro studio *in vitro* ed *in vivo* indica che i meccanismi alla base di questi cambiamenti possono essere, almeno in parte, l'EMT ed il rilascio di mediatori profibrotici indotti da stiramento delle cellule e dalla MV.

Abbiamo utilizzato un modello clinicamente rilevante con duplice stimolo dannoso, ovvero con aspirazione acido e la ventilazione meccanica, che viene comunemente utilizzato. Abbiamo trovato che gli animali trattati in questo modo sviluppano un aumento dei livelli di idrossiprolina, una componente importante del collagene che è considerato un marker precoce che inoltre contribuisce alla fibrosi del polmone. Non abbiamo dati che indichino che ci sia qualcosa di specifico riguardo a questi due particolari stimoli dannosi, ed è possibile che qualsiasi combinazione di due o più agenti (per esempio, chimici, infettivi, meccanici) con la MV avrebbe portato ad una simile risposta. Aumento dei livelli di collagene di tipo 1 nei tessuti polmonari sono stati riportati nei pazienti con ARDS [29, 30]. Inoltre, già 24 ore dopo la diagnosi di ARDS, la porzione N-terminale del peptide III del procollagene è elevata nel liquido di lavaggio broncoalveolare e nel siero dei pazienti con ARDS rispetto ai soggetti di controllo [19]. Le concentrazioni della porzione N-terminale del peptide III del procollagene sono significativamente superiori a 24 ore e 7 giorni nei pazienti con ARDS deceduti rispetto ai sopravvissuti (67% vs 31%) [19].

Danno all'epitelio alveolare è stato documentato in circa il 90% dei pazienti con ARDS sui quali siano state eseguite biopsie polmonari [21]. Inadeguata riparazione e rimodellamento dell'epitelio alveolare possono avviare e / o accelerare la fibrosi con diversi potenziali meccanismi: 1) perdita di proliferazione epiteliale, ridotta capacità di migrazione epiteliale, e / o differenziazione inadeguata delle cellule epiteliali alveolari dai progenitori possono portare alla proliferazione di fibroblasti e cellule muscolari lisce. Per esempio, lesioni gravi e riparazione ritardata dell'epitelio alveolare in risposta all'iperossia hanno dimostrato di disturbare il normale bilancio epitelio-fibroblasti e sono sufficienti per promuovere la proliferazione fibrotica in associazione ad un'aumentata produzione di collagene nel tessuto polmonare; 2) cellule epiteliali alveolari agiscono come progenitori dei fibroblasti attraverso EMT, regolata in gran parte dalla matrice extracellulare durante riparazione e rimodellamento epiteliale alveolare [12]; e 3) cellule epiteliali del polmone secernono mediatori infiammatori (per esempio, TGF- β e Wnt / β - catenina) in risposta a vari stimoli, che possono contribuire alla attivazione persistente di mediatori pro-fibrotici [31-33]. Presi insieme, questi meccanismi di riparazione sregolati determinano la risoluzione di ARDS e possono portare a fibrosi polmonare.

Abbiamo trovato due meccanismi principali associati con fibrosi polmonare indotta dal ventilatore nel nostro modello. 1) EMT: abbiamo osservato colocalizzazione del marcatore epiteliale citocheratina-8 e del marcatore mesenchimale α -SMA nel tessuto polmonare dopo MV e dopo l'esposizione ad allungamento meccanico delle cellule epiteliali polmonari. La diminuita espressione di citocheratina-8, E-caderina, pro-SPB con una simultanea aumentata espressione di α -SMA e vimentina supporta ulteriormente lo sviluppo di EMT. L'aumentata espressione di TGF- β 1 e β -Catenina può aver avuto un ruolo nel processo di EMT [34-36]. Recente evidenza suggerisce che

l'epitelio polmonare svolga un ruolo chiave nel guidare la risposta fibrotica [37]. Il fallimento della riparazione epiteliale promuove la proliferazione dei fibroblasti derivati dall'epitelio [38] attraverso il processo di EMT. 2) Proliferazione di fibroblasti polmonari: in alcune regioni del polmone, abbiamo scoperto che dopo ventilazione meccanica, l'espressione di α -SMA aumenta senza colocalizzazione con marcatori proteici di cellule epiteliali polmonari, indicando una proliferazione in corso di miofibroblasti α -SMA positivi. La deposizione di collagene che risulta da un processo di riparazione e rimodellamento anormale gioca un importante ruolo nella fibroproliferazione. Abbiamo anche esaminato la possibilità che fibrociti, definiti come cellule che co-esprimono marcatori dei leucociti (CD45) e mesenchimali (collagene I) [39, 40], possano svolgere un ruolo nello sviluppo di fibrosi dato che studi precedenti hanno dimostrato che i fibrociti esprimono α -SMA, indicativa di differenziazione miofibroblastica [41] dopo stimolazione con TGF- β . E' stato anche osservato che i fibrociti possono rispondere alle citochine profibrotiche interleuchina-4 e interleuchina-13, e differenziarsi in cellule α -SMA positive [42]. Tuttavia, le conte di fibrociti circolanti non erano differenti tra i gruppi sperimentali nel nostro studio. E' stato in precedenza dimostrato che lo stiramento meccanico di cellule epiteliali alveolari di tipo 2 può alterare i filamenti di actina con associato un aumento di espressione di chemochine e di molecole di adesione [43-45]. Un'alto volume corrente nei modelli in vivo di ventilazione meccanica nel ratto porta a aumentata espressione di mRNA di vari componenti della matrice extracellulare [46-48]. Aumentata espressione genica di procollagene III e fibronectina, un fattore di crescita dei fibroblasti, e TGF- β è stata osservata in polmoni ventilati con alte pressioni delle vie aeree ed elevata pressione positiva di fine espirazione in vivo e in strisce di parenchima polmonare di ratto [47, 49-53]. Forze meccaniche possono anche tradursi in

modifiche dei proteoglicani in ratti sani ventilati con un basso volume corrente, fenomeno ingrandito con un più alto volume corrente [46, 54, 55]. La MV in topi sani provoca un danno polmonare associato con livelli più elevati di citochine proinfiammatorie e deposizione di fibrina [56]. Quindi, una carenza di riparazione del polmone è caratterizzata da persistente ed esagerata infiammazione, cambiamenti nella architettura della matrice extracellulare, e danno epiteliale alveolare dopo MV. I nostri risultati ampliano i dati precedenti, dimostrando che lo stress meccanico induce una diminuzione dell'espressione di marcatori epiteliali polmonari e un aumento dei livelli di idrossiprolina contenuta nel tessuto polmonare, con conseguente potenziamento della fibrosi polmonare. In un recente studio, Willis et al [34] hanno riportato che cellule epiteliali alveolari di tipo 2 di ratto esposte a TGF- β 1 per 6 giorni hanno mostrato aumentata espressione di marcatori cellulari mesenchimali e una morfologia fibroblasto-simile. Studi in vitro su colture di cellule epiteliali alveolari sottoposte ad allungamento ciclico suggeriscono come un allungamento del 25% corrisponda ad un distensione lineare dell'epitelio alveolare compresa tra l'8 ed il 12%, mentre un allungamento tra il 37 ed il 50% corrisponde ad una distensione lineare tra il 17 ed il 22%, rilevante rispetto alle condizioni fisiopatologiche prodotte dalla MV.

Nel nostro studio, abbiamo usato un allungamento del 30% per 48 ore come stimolo in cellule BEAS-2B. Questa grandezza di stimolazione e la tempistica verosimilmente riflettono condizioni patologiche e potrebbero spiegare il rapido aumento osservato dei marcatori mesenchimali. Abbiamo usato la linea cellulare BEAS-2B derivata dall'epitelio bronchiale umano; idealmente i nostri risultati dovrebbero essere confermati anche in cellule epiteliali alveolari primarie di tipo 2 a svariate grandezze di allungamento meccanico.

Il nostro lavoro si concentra sui potenziali meccanismi di fibrosi nel contesto di ventilazione indotta dal danno polmonare. Il diretto contributo di ciascun marcatore fibrotico (TGF- β 1 e β -Catenina) e le possibili vie di trasmissione del segnale a valle sono ancora da chiarire.

CONCLUSIONI

Attualmente, la MV protettiva (a bassi volumi correnti e pressioni di ventilazione) è l'unico trattamento che ha dimostrato di diminuire la mortalità nei pazienti con ARDS. Fino ad oggi, questo è stato attribuito agli effetti acuti delle strategie di protezione del polmone su infiammazione e danno polmonare. Se la nostra ipotesi che la MV è un fattore chiave per la fibrosi polmonare associata a danno polmonare acuto / ARDS è corretta, questo concetto dovrà essere ridefinito. La nostra scoperta potrebbe spiegare l'osservazione che la separazione nelle curve di mortalità di Kaplan-Meier negli studi che utilizzano la ventilazione protettiva del polmone spesso non iniziano a separarsi per almeno 2 settimane [57-59]. Per esempio, nello studio che ha esaminato l'uso di bloccanti neuromuscolari nei pazienti con ARDS, le curve di mortalità non hanno cominciato a separarsi fino a circa 18 giorni, anche se l'intervento è stato limitato alle prime 48 ore [57, 58].

In molti pazienti, non sarà possibile fornire una strategia ventilatoria che è protettiva per tutte le unità polmonari a causa della gravità della sottostante malattia. In questi pazienti, una terapia in grado di modulare la risposta fibrotica potrebbe essere fondamentale.

Studi meccanicistici futuri suggeriranno nuovi approcci farmacologici per minimizzare specificamente la fibrosi polmonare associata alla ventilazione meccanica e, si spera, portare a migliori risultati nei pazienti affetti da ARDS.

BIBLIOGRAFIA

1. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1349
2. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005;353:1685-1693
3. Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:220–227
4. Meduri GU, Headley S, Kohler G, et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 1995;107:1062–1073
5. Papazian L, Doddoli C, Chetaille B, et al. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 2007;35:755–762
6. Martin C, Papazian L, Payan MJ, et al. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest* 1995;107:196–200
7. Meduri GU, Headley AS, Golden E, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA* 1998;280:159–165
8. American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*

2000;161:646–664

9. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias: This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277–304
10. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest* 2007;132:1311–1321
11. Lopez AD, Avasarala S, Grewal S, et al. Differential role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in inflammation and lung fibrosis associated with reovirus 1/L-induced bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2009;183:8244–8257
12. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2006;103:13180–13185
13. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cell Mol Immunol* 2007;4:419–429
14. Kuwano K. Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. *Intern Med* 2008;47:345–353
15. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:377–382
16. Baker AB. Artificial Respiration, the history of an idea. *Med Hist* 1971;15:336-351

17. Moriondo A, Mukenge S, Negrini D. Transmural pressure in rat initial subpleural lymphatic during spontaneous or mechanical ventilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H263–H269
18. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, et al. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; 99:944–952
19. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1783–1788
20. Meduri GU. Late adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1:563–577
21. Parambil JG, Myers JL, Aubry MC, et al. Causes and prognosis of diffuse alveolar damage diagnosed on surgical lung biopsy. *Chest* 2007; 132:50–57
22. Oostveen E, MacLeod D, Lorino H, et al. The forced oscillation technique in clinical practice: Methodology, recommendations and future developments. *Eur Respir J* 2003;22:1026–1041
23. Ko SC, Zhang H, Haitzma JJ, et al. Effects of PEEP levels following repeated recruitment maneuvers on ventilator-induced lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:514–521
24. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988;41:467–470
25. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit*

Care Med 2009;179:588–594

26. Hirsch J, Hansen KC, Sapru A, et al.: Impact of low and high tidal volumes on the rat alveolar epithelial type II cell proteome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1006–1013
27. Oeckler RA, Hubmayr RD. Cell wounding and repair in ventilator injured lungs. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;163:44–53
28. Muscedere JG, Mullen JB, Gan K, et al. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1327–1334
29. Last JA, Siefkin AD, Reiser KM. Type I collagen content is increased in lungs of patients with adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1983;38:364–368
30. Deheinzelin D, Jatene FB, Saldiva PH, et al. Upregulation of collagen messenger RNA expression occurs immediately after lung damage. *Chest* 1997;112:1184-1188
31. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax* 2009;64:770-777
32. Kuwano K, Hagimoto N, Hara N. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis and current treatment. *Curr Mol Med* 2001;1:551-573
33. Budinger GR, Chandel NS. The role of cell suicide or apoptosis in the pathophysiology of acute lung injury. *Intensive Care Med* 2001;27:1091-1093
34. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, et al. Induction of epithelial–mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*

2005;166:1321–1332

35. Kwong KY, Literat A, Zhu NL, et al. Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta1) in human epithelial alveolar cells: A pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sci* 2004;74:2941–2957
36. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, et al. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary
37. Sato M, Hirayama S, Lara-Guerra H, et al. MMP-dependent migration of extrapulmonary myofibroblast progenitors contributing to posttransplant airway fibrosis in the lung. *Am J Transplant* 2009;9:1027–1036
38. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L525–534
39. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994;1:71-81
40. Moore BB, Murray L, Das A, et al. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:175-178
41. Abe R, Donnelly, Peng T, et al. Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001;166:7556-7562
42. Shao DD, Suresh R, Vakil V, et al. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* 2008;83:1323-1333
43. Lodyga M, Bai XH, Mourgeon E, et al. Molecular cloning of actin filament-associated protein: a putative adaptor in stretch-induced Src activation.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L265-274

44. dos Santos CC, Han B, Andrade CF, et al. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNFalpha, LPS, and cyclic stretch. *Physiol Genomics* 2004;19:331-342

45. Mourgeon E, Isowa N, Keshavjee S, et al. Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L699-706

46. Al-Jamal R, Ludwig MS. Changes in proteoglycans and lung tissue mechanics during excessive mechanical ventilation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1078-1087

47. Berg JT, Fu Z, Breen EC, et al. High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1997;83:120-128

48. Foda HD, Rollo EE, Drews M, et al. Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:717-724

49. Caruso P, Meireles SI, Reis LF, et al. Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. *Intensive Care Med* 2003;29:1808-1811

50. de Carvalho ME, Dolhnikoff M, Meireles SI, et al. Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. *Crit Care* 2007;11(1):R23

51. Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, et al. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl*

Physiol 2005;98:53-61

52. Garcia CS, Rocco PR, Facchinetti LD, et al. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? *Respir Physiol Neurobiol* 2004;144:59-70

53. Parker JC, Breen EC, West JB. High vascular and airway pressures increase interstitial protein mRNA expression in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1997;83:1697-1705

54. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001;38:635-638

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

56. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 2009;13:R1

57. Papazian L, Forel JM, Gacouin A, et al: Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363:1107–1116

58. Slutsky AS: Neuromuscular blocking agents in ARDS. *N Engl J Med* 2010; 363:1176–1180

59. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342:1301.

RINGRAZIAMENTI

Ch.mo Prof. C. Ori, Università degli Studi di Padova, Italia

Proff. A.S. Slutski e H. Zhang, University of Toronto, ON, Canada

N.E. Cabrera-Benítez, M. Post, B. Han, P.M. Spieth, W.E. Cheng, M. Liu, M. Sato,
University of Toronto, ON, Canada

J. Villar, Hospital Universitario Dr. Negrin, Las Palmas de Gran Canaria, Spagna

F. Valladares, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spagna

Questo lavoro è in parte finanziato dal Canadian Institute of Health Research (CIHR), dal Ministero della Scienza della Spagna, dal FUNCIS, da uno specifico accordo tra l'Istituto de Salud Carlos III e il FUNCIS, e dalla McLaughlin Foundation.

Parte dei risultati di questo studio sono oggetto di un articolo in corso di pubblicazione sulla rivista Critical Care Medicine, al quale Nuria E. Cabrera-Benítez e Matteo Parotto hanno egualmente contribuito.

