

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Efeito Inibidor de Leucotrieno (MK 0476) em Modelo Experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) Induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)

Effects of leukotriene inhibitor (MK 0476) in a experimental model of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) induced by lipopolysaccharide (LPS)

Aluno: Jaime Eduardo Davino Chiovatto

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo

São Paulo, Agosto de 2015

Jaime Eduardo Davino Chiovatto

Efeito Inibidor de Leucotrieno (MK 0476) em Modelo Experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) Induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho
para obtenção do título de
Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo

São Paulo, Agosto de 2015.

FICHA CATALOGRÁFICA

Chiovatto, Jaime Eduardo Davino.

Efeito Inibidor de Leucotrieno (MK 0476) em Modelo Experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) Induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)./ Jaime Eduardo Davino Chiovatto. 2015.

43 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

Co-orientador (a): Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo

*I. Inflamação pulmonar. 2. SDRA. 3. MK0476.
I. Vieira, Rodolfo de Paula. II. Título*

CDU 616

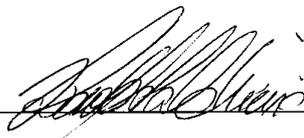
São Paulo, 28 de agosto de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): **Jaime Eduardo Davino Chiovatto**

Título da Dissertação: **“Efeito Inibidor do Leucotrieno (MKO 176) em modelo experimental da síndrome do desconforto agudo (SDRA) induzida por lipopolissacáúdio (LPS).”**

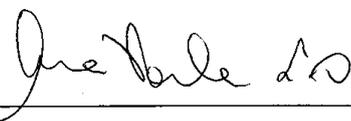
Presidente: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROFA. DRA. BEATRIZ MANGUEIRA ROMANHOLO



Membro: PROFA. DRA. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Rodolfo por ter me orientado com muita paciência e sabedoria.

A Universidade Nove de Julho pela bolsa de Mestrado, a Diretoria de pós-graduação em Medicina e a Profa. Fernanda Marciano Consolim Colombo pela oportunidade de ingresso no Mestrado.

Agradeço ao nosso grupo de pesquisa: Ana Roberta, Jefferson, Adilson, Manoel e aos colegas de curso, principalmente nas duas vezes que pensei em desistir e a todos os Profs. que passaram na minha vida acadêmica passando seus conhecimentos com total competência.

As técnicas do laboratório Ângela e Samara pela paciência e pelos ensinamentos das técnicas que me foram úteis para desenvolvimento deste projeto, meus singelos agradecimentos. E principalmente a Deus por me dar forças e paciência para completar mais este objetivo de vida.

Resumo

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) apresenta altas taxas de mortalidade, podendo ser resultante tanto de infecções pulmonares como extrapulmonares sendo caracterizada pela insuficiência respiratória proveniente da resposta inflamatória que cursa com alteração de permeabilidade alvéolo-capilar, edema e hipoxemia refratária aos altos fluxos de oxigênio. Um dos mais importantes mecanismos que determinam a severidade desta injúria é a magnitude da lesão da barreira epitélio alveolar. A possibilidade de reparação do epitélio em um estágio precoce é o maior determinante da recuperação. Muitas das modalidades terapêuticas permeiam na tentativa de diminuição da inflamação pulmonar para minimizar a lesão inicial, a qual se deve em grande parte ao processo inflamatório mediado pela ativação local e sistêmica de citocinas como TNF- α e IL-8. Nesse sentido, pretendemos avaliar os efeitos do inibidor de leucotrienos (MK0476) na inflamação pulmonar e sistêmica. Para isso, camundongos C57Bl/6 (n=35) adultos machos foram distribuídos em 5 grupos: Controle 24 horas (n=7; não manipulado), Controle 48 horas (n=7; não manipulado), LPS IT Controle 24 horas (n=7; LPS intratraqueal; 10 μ g/camundongo), LPS IT Controle 48 horas (n=7; LPS intratraqueal; 10 μ g/camundongo), LPS IT + MK0476 (n=7; LPS intratraqueal; 10 μ g/camundongo + MK0476). Os animais foram eutanasiados vinte e quatro horas após a administração de LPS e MK0476 sendo avaliada a contagem de células totais, diferenciais e os níveis de proteínas totais no lavado bronco alveolar (LBA), já os níveis de citocinas (IL-6, CXCL-1/KC, IL 10, IL-17 e TNF- α) dosados no soro e no sobrenadante do LBA e a densidade de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no parênquima pulmonar. Foram avaliados ainda os níveis de VEGF no homogenato pulmonar, e a expressão do NF-kB e do LTB4R pelos leucócitos no parênquima pulmonar através de imunohistoquímica. Além disso, os níveis de IL-8 no sobrenadante dos neutrófilos de humanos estimulados *in vitro* com LPS (1,5 μ g/ml de meio) e tratados com MK0476 (10 μ M) também foi avaliado. Os resultados demonstraram que o MK0476 foi capaz de diminuir o número de células totais (p<0.05), macrófagos (p<0.05), neutrófilos (p<0.01) e linfócitos (p<0.001) no LBA, além dos níveis de proteínas totais (p<0.05), IL-6 (p<0.05), CXCL1/KC (p<0.05), IL-17 (p<0.05) e TNF- α (p<0.05). A densidade de neutrófilos (p<0.001), linfócitos (p<0.001) e macrófagos (p<0.01) no parênquima pulmonar também foi diminuída através do tratamento com o MK0476. Os níveis de VEGF no homogenato pulmonar (p<0.01) foram reestabelecidos pelo tratamento com o MK0476. Por fim, o tratamento

com o MK0476 foi capaz de reduzir a expressão de NF- κ B e de LTB₄R pelos leucócitos no parênquima pulmonar, sugerindo um possível mecanismo de ação do MK0476 na inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. Portanto, concluímos que o MK0476, no modelo utilizado, apresenta significativa melhora nos níveis de proteínas totais e citocinas, melhorando tanto os níveis sistêmicos quanto local.

Palavra chave: Inflamação pulmonar, SDRA, MK0476.

Abstract

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) has high mortality rates and may be the result both of lung infections such as extra pulmonary being characterized by respiratory failure from the inflammatory response that leads to alteration of alveolar-capillary permeability, edema and hypoxemia refractory to high flows oxygen. One of the most important mechanisms that determine the severity of this injury is the magnitude of the alveolar epithelial barrier injury. The possibility of epithelial repair at an early stage is the major determinant of recovery. Many of the therapeutic approaches in attempts to permeate decreased pulmonary inflammation to minimize the initial injury, which is largely due to the inflammatory process mediated by local and systemic activation by cytokines such as TNF- α and IL-8. In this sense, we aimed to evaluate the effects of leukotriene inhibitor (MK0476) on pulmonary and systemic inflammation. For this purpose, C57BL / 6 mice (n = 35) adults male were distributed into five groups: (1) Control 24 hours (n = 7; unhandled), (2) Control 48 hours (n = 7; unhandled) (3) Control IT LPS 24 hours (n = 7; intratracheal LPS; 10 mg / mouse) (4) Control IT LPS 48 hours (n = 7; intratracheal LPS; 10 mg / mouse), (5) IT + LPS MK0476 (n = 7; intratracheal LPS; 10mg / mouse + MK0476) .The animals were euthanized twenty-four hours after the LPS administration and evaluated the total cell and differential count in broncho alveolar lavage (BAL) protein levels in total BAL cytokine levels (IL-6, CXCL-1 / KC, IL-10, IL-17 and TNF- α) in serum and BAL supernatant and the density of neutrophils, lymphocytes and macrophages in the lung parenchyma. They also assessed the levels of VEGF in lung homogenate, and the expression of NF-kB and LTB4R leukocytes in the pulmonary parenchyma through imunohistochemistry. Moreover, IL-8 levels in the supernatant of human neutrophils stimulated in vitro with LPS (1.5 ug / ml of medium) and treated with MK0476 (10uM) was also evaluated. The results showed that the MK0476 is capable of decreasing the number of total cells (p <0.05), macrophages (p <0.05), neutrophils (p <0.01) and lymphocytes (p <0.001) in BAL, in addition to total protein levels (p <0.05), IL-6 (p <0.05) CXCL1 / KC (P <0.05), IL-17 (p <0.05) and TNF- α (p <0.05). The density of neutrophils (p <0.001), lymphocytes (p <0.001) and macrophage (p <0.01) in the lung parenchyma was also reduced by treatment with the MK0476. VEGF levels in lung homogenate (p <0.01) were re-established by treatment with the MK0476. Finally, treatment with the MK0476 is capable of reducing the expression of NF-kB and LTB4R leukocytes in the pulmonary parenchyma, suggesting a possible mechanism of action

of MK0476 in acute lung inflammation induced by LPS. We therefore conclude that the MK0476, the model used, presents significant improvement in the levels of total proteins and cytokines, improving both systemic levels and local.

Key words: Lung inflammation, ARDS, MK0476.

Sumário

Resumo	5
Introdução	26
1.1. Aspectos Históricos.....	26
Limitações da definição da Conferência de Consenso Americana-Europeia	31
Definição do Consenso de Delphi.....	33
Acurácia das definições existentes.....	33
A definição de Berlim	35
Propostas da Definição de Berlim.....	36
Resultados da primeira avaliação prática da Definição de Berlim	37
Limitações da Definição de Berlim.....	37
Importância prática da nova definição	38
1.2. Definição	39
1.3. Etiologia	40
Lesão Direta:	41
Lesão Indireta:	41
1.4. Patologia	41
Patogênese.....	42
1.5. Fisiopatologia.....	42
1.6. SDRA e mediadores inflamatórios	51
1.7. Inibidores de Leucotrienos Cys.....	52
2. Objetivos.....	53
3. Materiais e Métodos	53
3.1. Animais	53
3.1.2 Manuseio dos Camundongos	54
3.2. Modelo de SDRA intrapulmonar usando Lipopolissacarídeo (LPS).....	56
3.4. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado bronco alveolar (LBA)	57
3.5. Avaliação dos níveis de citocinas no lavado bronco alveolar (LBA) e no soro por ELISA	57
3.7. Avaliação da expressão de LTB ₄ R e NF-κB nas proteínas dos pulmões.....	58
3.8. Avaliação de proteínas no LBA.....	58
3.9. Obtenção e purificação e neutrófilos de sangue periférico	58
3.10 Estimulação dos neutrófilos purificados para quantificação de IL-8.	59
3.11. Análises estatísticas	59

	10
4.1. Contagem Total e Diferencial em LBA 24horas com LPS 24 horas	60
4.2 Contagem Total e Diferencial em LBA CONTROLE 48h vs LPS 48h vs LPS 48h + MK 0476	84
.....	86
.....	86
6. Referências.....	98
ANEXO I – Termo de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	110

LISTA DE ABREVIATURAS

VEF1 VOLUME EXPIRATORIO NO TEMPO DE 1 SEGUNDO

PMN POLIMORFONUCLEARES

μg – Micrograma

μl - Microlitro

5-LO 5-lipoxygenase

ARDS LEUCOTRIENO B 1

CCAE

AECC Conferência de Consenso Americana-Europeia

Csr Escore De Complacência Do Sistema Respiratório

CSR - Complacência do sistema respiratório

CysLt₁ CISTENIL LEUCOTRIENO 1

CysLt₂ CISTENIL LEUCOTRIENO 2

EDTA Acido Etilenodiamino Tetra-acético

FiO₂ - Fração inspirada de oxigênio

HE Hematoxilina E Eosina

IFN- γ Interferon gama

IL 1

INTERLEUCINA 1

IL	1	β	INTERLEUCINA	1	BETA
----	---	---------	--------------	---	------

IL	10		INTERLEUCINA		10
----	----	--	--------------	--	----

IL	6		INTERLEUCINA		6
----	---	--	--------------	--	---

IL	8		INTERLEUCINA		8
----	---	--	--------------	--	---

IO - Índice de Oxigenação

IT - Intratraqueal

LBA Lavado broncoalveolar

LIS - "Lung Injury Score" – Escore de lesão pulmonar aguda ou Escore de Murray

LPA Lesão Pulmonar Aguda

LPS

-

Lipopolissacarideo

LT - Leucotrieno

LTB4

LEUCOTRIENO

B

4

LTB4R Leucotrieno B 4 Receptor

LTC4		LEUCOTRIENO	C	4
------	--	-------------	---	---

LTD4		LEUCOTRIENO	D	4
------	--	-------------	---	---

LTE4		LEUCOTRIENO	E	4
------	--	-------------	---	---

MCP	1	PROTEINA	QUIMIOATRATIVA	DE	MONÓCITOS	1
-----	---	----------	----------------	----	-----------	---

MK	0476		INIBIDOR	DE	LEUCOTRIENO	0476
----	------	--	----------	----	-------------	------

mmHg MILIMITRO DE MERCURIO

NF-kB Fator Nuclear Kappa Beta

PaO₂ Pressão Parcial de oxigênio

PAO₂ - Pressão alveolar de oxigênio

PaO₂ - Pressão arterial parcial de oxigênio

Paw Pressão Média De Vias Aéreas

PBS – Phosphate Buffered Saline – Tampão Fosfato Salino

PCP - Pressão capilar pulmonar

PEEP Pressão Positiva no Final da Expiração

PLA₂ Fosfolipase A₂

POAP - Pressão de oclusão da artéria pulmonar

RPM Rotação Por Minuto

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

TF - Tissue Factor

TNF α FATOR DE NEGROSE TUMORAL ALFA

VPM ventilação pulmonar mecânica

FCgamaR Receptor de Imunoglobulina na membrana dos fagócitos

gG Imunoglobulina G

RER Reticulo Endoplasmatico Rugoso

PAF Fator de Ativação Plaquetária

Células NK K Células Natural Killer

PGE₂ Prostaglandina E 2

CD 4 Grupamento de Diferenciação 4

CSF Fator de estimulação de Colonias de Granulócitos

ACTH Hormônio Adrenocorticotrófico

PCR Reação em Cadeia de Polimerase

TGF- β Fator de Transformação de Crescimento

MHC-I Complexo Principal de Histocompatibilidade

sTNF-R1 Receptores Solúveis de Fator de Necrose Tumoral

GM-CSF Factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos

MA β -CAM-1 Anticorpo Monoclonal que Bloqueia o sistema Seletivo das Células do Sistema imunitário

ELAM-1 Molécula De Adesão De Leucócito Endotelial

VCAM Moléculas de Adesão Celular Vascular

TRAF Fator associado ao TNF

c-IAP1 inibidor Apoptico De Proteina

Lista de Graficos

Gráficos

Gráfico 1 Total de Células

Gráfico 2 Macrófagos

Gráfico 3 Neutrófilos

Gráfico 4 Linfócitos

Gráfico 5 Interleucina 1 β

Gráfico 6 Interleucina 6

Gráfico 7 Interleucina 10

Gráfico 8 Interleucina 17

Gráfico 9 TNF α

Gráfico 10 Fator Nuclear Kappa Beta

Gráfico 11 Leucotrieno B 4 Receptor

Gráfico 12 Fluido Broncoalveolar com MK 0476

Gráfico 13 Avaliação dos Macrófagos , Neutrófilos e Linfócitos MK 0476

Gráfico 14 Interleucina 1 β e MK0476

Gráfico 15 Interleucina 6 e MK0476

Gráfico 16 Interleucina 10 e MK0476

Gráfico 17 Interleucina 17 e MK0476

Gráfico 18 Fator de Necrose Tumoral alfa e MK0476

Gráfico 19 Fator Nuclear Kappa beta e MK 0476

Gráfico 20 Leucotrieno B 4 Receptor

Gráfico 21 Fator de Crescimento Vascular Endotelial e MK 0476

Fator de Crescimento Vascular Endotelial e MK0476

Gráfico 22 Cultura Celular e IL 8 e MK 0476

Introdução

1.1. Aspectos Históricos

Existem muitos eventos históricos interessantes que se correlacionaram com a identificação e gestão de ARDS levando a conceitos mais atuais. Estes eventos prepararam o palco para a revolução de cuidados intensivos que ocorreu na última metade do século XX.

Os fatos começaram a ser observados em 1821, Século XIX, no que foi, provavelmente, a primeira descrição científica publicada. Laennec descreveu a patologia grave do coração e pulmões como anasarca idiopática dos pulmões e edema pulmonar sem insuficiência cardíaca em "Um Tratado sobre doenças do tórax"¹

Na década de 1950, o edema pulmonar havia se tornado um tema título pela Biblioteca Nacional de Medicina; no entanto, não foi feita distinção nesse momento entre causas cardíacas e não cardíacas. Mas, o que mudou claramente ARDS de uma forma quase universalmente fatal de "pneumonia dupla", foi o desenvolvimento de métodos para estabelecer o acesso seguro das vias aéreas utilizando tubos que poderiam ser ligados a ventiladores mecânicos para administrar pressões adequadas de distensão pulmonares²

Estas técnicas melhoravam a vida desses pacientes de algumas horas a vários dias ou mesmo semanas de duração, em alguns casos suficiente para se recuperar. Como este novo tipo de paciente começou a internar nas unidades de cuidados intensivos recém-criadas, sua condição rapidamente tornou-se reconhecida como um dos processos clínicos agudos mais difíceis de tratar. E estes, inclusive infiltrados bilaterais agudos e difusos observados em pacientes que necessitavam de ventilação mecânica prolongada, porém sem causa, daí o termo "pulmão respirador"³

Em 1954, Clark desenvolve um eletrodo para medição de PO₂, refletindo o nível de O₂ no sangue⁴. Ainda em 1954, Ibsen utiliza pela primeira vez tubos endotraqueais para ventilação com pressão positiva⁵.

Em 1959 Avery e Mead descobriram que alguns pulmões de recém-nascidos não produziam surfactante (Doença da Membrana Hialina, mais tarde chamada Síndrome da Angústia Respiratória Neonatal)⁶

Em 1960, Moss e colaboradores descobriram os benefícios da compressão torácica para atingir a circulação artificial⁷

Por um período de tempo ARDS atendia pelo nome de lesões, incitando, por exemplo, pulmão de choque, lesão pulmonar pós-traumático, etc.

E finalmente, em 1967, um artigo publicado no Lancet pelos cirurgiões Ashbaugh, Bigelow, Petty, e Levine descrevia pela primeira vez a entidade clínica que eles chamavam de "angústia respiratória aguda em adultos"⁸ Este artigo reconhecia pela primeira vez que a SDRA era uma constelação de anormalidades patofisiológicas comum para um número relativamente grande de doentes, mas que foram iniciadas por uma ampla variedade de lesões não relacionadas, por exemplo, aspiração gástrica, sepse, trauma sem corte, quase-afogamento, etc.

A dificuldade em fazer o diagnóstico permaneceu evidente, e pelo menos cinco dos pacientes estudados poderia ter tido ARDS secundárias ou complicadas por sobrecarga de líquidos como edema pulmonar. Também foi observado neste relatório de 1967, a ARDS denominada como síndrome do desconforto respiratório "aguda". No entanto, em 1971, Petty e Ashbaugh mudaram para síndrome do desconforto respiratório com o termo "adulto" e em outra publicação⁹, provavelmente para tratar a percepção da SDRA como uma versão adulta da síndrome de dificuldade respiratória infantil anteriormente descrita.

Em 1976, Bone et al.,¹⁰ descrevendo a associação entre coagulação intravascular disseminada e SDRA, utilizaram como critério diagnóstico da síndrome a presença de pressão arterial parcial de oxigênio (PaO_2) ≤ 70 mmHg com uma fração inspirada de oxigênio (FiO_2) $\geq 0,5$ e emprego de pressão expiratória final positiva (PEEP), cujo valor não foi especificado. Posteriormente, em 1982, Pepe et al.,¹¹ estudando preditores clínicos da síndrome em 136 pacientes adultos, definiram a doença quando havia $\text{PaO}_2 < 75$ mmHg com $\text{FiO}_2 \geq 0,5$, presença de infiltrado difuso bilateral ao exame radiológico do tórax, com envolvimento de todos os campos pulmonares, pressão capilar pulmonar (PCP) < 18 mmHg, não provocada falência cardíaca, derrame pleural ou pneumonia bacteriana. No ano seguinte, Fowler et al.,¹² em estudo de vários centros avaliando 68 pacientes com SDRA, utilizaram como critérios diagnósticos os seguintes elementos: início agudo de infiltrado pulmonar bilateral; $\text{PCP} \leq 12$ mmHg;

complacência pulmonar ≤ 50 mL/cmH₂O; e relação entre a PaO₂ e a pressão alveolar de oxigênio (PaO₂/PAO₂) $\leq 0,2$.

Diante da diversidade de critérios utilizados para o diagnóstico de SDRA e procurando expandir a definição da síndrome, Murray et al.,⁹ em 1988, incorporaram à definição os fatores de risco, a relativa brevidade do processo de doença e medidas de gravidade. Quanto aos fatores de risco, os autores apontaram para a necessidade de identificar se a síndrome é causada por pneumonia aspirativa, medicamentosa, inalação de gases tóxicos ou se está associada a eventos sistêmicos como sepse, politraumatismo ou pancreatite aguda. A gravidade foi avaliada utilizando um escore de lesão pulmonar (*Lung Injury Score – LIS*), incorporando dados fisiológicos indicadores de oxigenação, valores de PEEP, complacência e distribuição radiológica da lesão (**tabela 1**). O escore incluiu a avaliação de quatro critérios:

- 1) exame radiológico do tórax;
- 2) escore de hipoxemia (relação PaO₂/FiO₂;
- 3) nível da PEEP; e
- 4) escore de complacência do sistema respiratório (Csr) (quando disponível).

Embora o escore de Murray continue sendo utilizado, ele ainda não foi validado, ou seja, não foi estabelecido se pacientes com escores de mesmo valor correspondem a graus similares de lesão pulmonar e, portanto, têm o mesmo prognóstico. Além disso, o LIS apresenta vários problemas, como: não considera o efeito do tempo sobre a gravidade da lesão (evento agudo ou crônico); o escore não é específico de SDRA, sendo que pacientes com edema pulmonar cardiogênico podem ser identificados como tendo SDRA; pacientes com discreta sobrecarga de volume, por qualquer motivo, podem ser diagnosticados como tendo SDRA, já que não é regra obter os níveis de PCP para descartar edema cardiogênico^{13,14,15}.

Tabela 1 O escore de lesão pulmonar aguda - escore de Murray

<i>1. Escore de exame radiológico do tórax</i>	
Sem consolidação alveolar	0
Consolidação alveolar confinada a um quadrante	1
Consolidação alveolar confinada a dois quadrantes	2
Consolidação alveolar confinada a três quadrantes	3
Consolidação alveolar confinada a todos os quatro quadrantes	4
<i>2. Escore de hipoxemia</i>	
PaO ₂ /FiO ₂ > 300 mmHg	0
PaO ₂ /FiO ₂ 225-299 mmHg	1
PaO ₂ /FiO ₂ 175-224 mmHg	2
PaO ₂ /FiO ₂ 100-174 mmHg	3
PaO ₂ /FiO ₂ < 100 mmHg	4
<i>3. Escore da PEEP em cm H₂O (quando em ventilação pulmonar mecânica)</i>	
PEEP < 5	0
PEEP 6-8	1
PEEP 9-11	2
PEEP 12-14	3
PEEP >15	4
<i>4. Escore de complacência do sistema respiratório mL/cm H₂O (se disponível)</i>	
Complacência > 80	0
Complacência 60-79	1
Complacência 40-59	2
Complacência 20-39	3
Complacência < 19	4

PEEP, pressão expiratória final positiva.

O escore final é obtido dividindo-se os valores obtidos da análise inicial pelo número de elementos utilizados para a análise. Quando o valor do escore for igual a zero, não há lesão pulmonar; de 1 a 2,5, a lesão pulmonar é considerada leve a moderada; e quando maior do que 2,5, o diagnóstico de síndrome do desconforto respiratório agudo é estabelecido.

Fonte: J. Pediatr. (Rio J.) vol.89 no.6 Porto Alegre Nov./Dec. 2013

Em 1992, a Conferência do Consenso Euro - Americano (AECC) foi encarregada de desenvolver uma definição padronizada para ARDS para ajudar com a investigação clínica e epidemiológica. A AECC recomendou uma nova designação: lesão pulmonar aguda (LPA) poderia ser definida como uma síndrome de inflamação e aumento da permeabilidade que está associada com uma constelação de achados clínicos, radiológicos e anomalias fisiológicas que não pode ser explicado, mas pode coexistir com a disfunção atrial esquerda ou hipertensão capilar pulmonar e está associada mais frequentemente com sepse, aspiração gástrica, pneumonia primária ou politrauma e, menos comumente, com circulação extracorpórea, múltiplas transfusões, embolia gordurosa, pancreatite e outros. A síndrome da angústia

respiratória aguda foi definida como um subconjunto de pacientes com LPA com defeito de oxigenação mais grave. LPA e SDRA são patologias agudas no início e persistentes, associadas com um ou mais fatores de risco conhecidos, e são caracterizados por hipoxemia arterial resistente à terapia de oxigênio por si só e infiltrados radiológicos¹⁶.

Tabela 2 Definição da Conferência de Consenso Americana-Europeia de lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo

Critério diagnóstico de lesão pulmonar aguda

Tempo: começo agudo

Oxigenação: $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg
(independentemente do nível da PEEP utilizada)

Radiografia de tórax: infiltrados bilaterais evidenciados no exame em posição frontal

Pressão capilar pulmonar: ≤ 18 mmHg quando medida ou sem evidência clínica de hipertensão atrial esquerda

Critério diagnóstico de síndrome do desconforto respiratório agudo

Iguais aos critérios de lesão pulmonar aguda, exceto por:

Oxigenação: $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg
(independentemente do nível da PEEP utilizada)

PEEP, pressão expiratória final positiva; FiO_2 , fração inspirada de oxigênio; PaO_2 , pressão arterial parcial de oxigênio.

Fonte: J. Pediatr. (Rio J.) vol.89 no.6 Porto Alegre Nov./Dec. 2013

E por esses motivos apresenta as três definições mais utilizadas.

Dispneia intensa, taquipneia, cianose refratária a oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar alveolar, difusos infiltrados na radiografia de tórax, atelectasia, congestão vascular, hemorragia, edema pulmonar e membranas hialinas na necrópsia⁸.

Quatro pontos pelo sistema de pontuação para lesão pulmonar de específica causa clínica, com base em: Oxigenação, Pressão expiratória final positiva, Complacência do sistema respiratório e envolvimento radiográfico^{9,17} Início agudo, infiltrados bilaterais na radiografia de tórax, pressão da artéria pulmonar <19 mmHg ou ausência de clínica evidência de hipertensão atrial esquerda.

A lesão pulmonar aguda é considerada presente se $PaO_2 / FIO_2 \leq 300$ e subconjunto SDRA foi definido com um déficit de oxigenação mais grave, $PaO_2 / FIO_2 \leq 200$ ¹⁸.

Limitações da definição da Conferência de Consenso Americana-Europeia

Embora a definição da Conferência de Consenso Americana-Europeia (CCAIE) tenha tido o mérito de formalizar os critérios diagnósticos de SDRA e seja de simples aplicação na prática do dia a dia, ela tem sido questionada ao longo dos anos em vista do aumento dos conhecimentos sobre a doença^{19,20}.

1) *Heterogeneidade*: A definição da CCAIE transforma múltiplos processos fisiopatológicos e grupos de pacientes muito diferentes em uma síndrome única.²¹ Contribuem grandemente para a questão da heterogeneidade a causa desencadeante, o mecanismo de lesão pulmonar²²⁻²⁴, a fase da doença²⁵ e o tempo de início da ventilação pulmonar mecânica^{26,27} (VPM). As implicações práticas desses problemas são óbvias, pois uma terapêutica administrada para um grupo de pacientes com resultados positivos pode não ter o mesmo efeito em outro.

2) *Tempo de doença*: A definição da CCAIE excluiu falência respiratória crônica e não explicitou a definição de “agudo”, gerando subjetividade²⁸.

3) *Avaliação da hipoxemia*: A definição da CCAIE utilizou a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ para avaliação da hipoxemia. Porém, há inconsistência da utilização dessa relação devido ao efeito da PEEP e da FiO_2 ^{20,28,29-31}. Apesar de os valores da relação serem explicitados para diagnosticar LPA (≤ 300) e SDRA (≤ 200), é preciso considerar que os valores desse índice variam consideravelmente de acordo com a FiO_2 utilizada, particularmente em $\text{FiO}_2 < 0,5$ e $\text{PaO}_2 > 100$ mmHg ou quando a fração do *shunt* intrapulmonar é baixa.³⁰ Além disso, muitos pacientes que inicialmente preenchem o critério da CCAIE podem apresentar aumento da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ acima de 200 depois da aplicação de curto período de PEEP ou aumento da FiO_2 . Adicionalmente, a hipoxemia pode estar relacionada à presença de atelectasia, baixo débito cardíaco e desvio de sangue pelo forame oval pérvio^{32,33}. Não há estudos sobre a capacidade da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ predizer mudanças estruturais da membrana alvéolo-capilar, uma vez que a SDRA representa a via comum de diversos eventos e doenças¹⁵. Vários outros fatores interferem com a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, independentemente de haver doença pulmonar. Por exemplo, em uma dada condição pulmonar, variando o

débito cardíaco ou a diferença arteriovenosa do conteúdo de oxigênio, ocorre importante modificação da relação³⁴.

A relação PaO_2/FiO_2 também é influenciada pelo nível de pressão inspiratória utilizado durante a VPM. Por essa razão, muitos médicos introduziram o uso da pressão média de vias aéreas (Paw) e do índice de oxigenação³⁵ (IO), que leva em consideração para seu cálculo a Paw . O IO é obtido pela fórmula $IO = Paw \times FiO_2 \times 100/PaO_2$. Esse índice tem sido associado com o prognóstico em adultos e crianças por analisar a oxigenação. Em comparação com a relação PaO_2/FiO_2 , já foi demonstrado que, quando a relação permanece baixa, a mortalidade aumenta em adultos e crianças^{36,37}. Da mesma forma que a definição da CCAE, o IO não leva em conta a PEEP utilizada, a complacência e os dados radiológicos, e não exclui doença cardíaca.

4) *Categoria da LPA*: Na definição da CCAE, todos os pacientes com relação $PaO_2/FiO_2 < 300$ são diagnosticados como tendo LPA. Há problemas na distinção de pacientes com relação de 201 a 300, se devem ser classificados como LPA ou SDRA.

5) *Exame radiológico do tórax*: Apesar da definição da CCAE indicar como critério a presença de infiltrados bilaterais no exame radiológico do tórax em posição frontal, há uma baixa confiabilidade na interpretação desse exame, principalmente em crianças de menor idade, havendo acordo entre intensivistas e radiologistas, ao acaso, em apenas metade das radiografias.^{38,39} Além disso, as opacidades pulmonares podem ser alteradas pela aplicação de Paw mais elevada.

6) *Pressão capilar pulmonar*: Para diferenciar edema pulmonar inflamatório de edema pulmonar cardiogênico, a definição da CCAE requer que a PCP seja ≤ 18 mmHg ou que não haja evidência clínica de hipertensão atrial esquerda. É preciso considerar, no entanto, que aumentos da PCP e a SDRA podem coexistir^{40,41}, sendo que até 50% dos pacientes com SDRA têm PCP > 18 mmHg por aumentos da pressão intratorácica ou por sobrecarga de volume^{41,42} e que há pouca confiabilidade na medida da PCP e na avaliação clínica de hipertensão atrial esquerda.⁴³

7) *Fatores de risco*: Não foram formalmente incluídos na definição da CCAE.

Definição do Consenso de Delphi

Como não houve acordo entre as definições desenvolvidas até então, Ferguson et al.,^{44,45} em 2005, desenvolveram outra definição clínica de SDRA, utilizando a técnica Delphi. Nessa definição, foram incorporadas variáveis adicionais, como nível da PEEP ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ com $\text{PEEP} \geq 10$ cmH_2O) e uma definição precisa do início agudo (dentro de 72 horas), uma avaliação subjetiva do envolvimento cardíaco (sem evidência clínica de insuficiência cardíaca congestiva) e outra objetiva ($\text{PCP} \leq 18$ mmHg ou fração de ejeção $\geq 40\%$), avaliação da complacência pulmonar (complacência estática < 50 cmH_2O com volume corrente de 8 mL/Kg) e quantificação do critério radiológico para doença em dois ou mais quadrantes.

Apesar de, aparentemente, solucionar os problemas apresentados pelas definições anteriores, os mesmos investigadores relataram que, embora a Definição de Delphi seja mais específica que o critério da CCAE, ela é menos sensível quando achados de necrópsia de dano alveolar difuso foram escolhidos como padrão ouro para o diagnóstico de SDRA.⁴⁶

Acurácia das definições existentes

Esteban et al.,⁴⁷ em 2004, realizaram estudo retrospectivo com o objetivo de comparar achados de necrópsia e características clínicas de adultos com diagnóstico clínico de SDRA, e observaram que a acurácia da CCAE foi apenas moderada (sensibilidade de 75% e especificidade de 84%), apresentando comportamento melhor para pacientes com fatores de risco extrapulmonares. A concordância entre a CCAE e o Escore de Murray também foi estudada, sendo demonstrado que a mesma é moderada.⁴⁸

Além disso, três estudos mostraram graus variados de concordância entre CCAE e o escore de LPA.^{46,48,49}

As limitações podem ser agrupadas quanto a alguns fatores:

Na década de 1970 a ARDS tornou-se cada vez mais reconhecida, mas as causas hidrostáticas (por exemplo, sobrecarga de volume) eram difíceis de se descartar. O potencial de confusão foi tão grande que as medições de pressão de oclusão da artéria pulmonar tornou-se uma forma muito comum de diagnóstico.⁵⁰

Esta medida, uma vez realizada na rotina é muito menos frequente com a percepção de que um valor superior arbitrário com pressões de oclusão da artéria pulmonar (POAP) não exclui o diagnóstico de LPA, e que há normalmente outros dados clínicos

e pistas históricas que permitem um diagnóstico bastante seguro de LPA além da sobrecarga de volume a ser feita. Mesmo quando a PAOP é inferior a 18 mmHg, não se pode estar certo de que o edema é o resultado da permeabilidade alterada. Pressão coloidosmótica reduzida, como observado em estados hipoalbuminêmicos, promove edema na ausência de alterações da permeabilidade^{51,52}

Disfunção pulmonar secundária para dirigir lesões ao pulmão, por exemplo, por aspiração (SDRA primários), pode ser diferente a partir de lesões do pulmão de origem extra-pulmonar, por exemplo, sepse (SDRA secundária). Este é um conceito interessante, e alguns marcadores clínicos que diferenciam os dois foram descritos. Mas o trabalho ainda está em andamento para determinar implicações para a gestão do paciente⁵³

O diagnóstico diferencial da SDRA utilizando a definição AECC é significativamente ampla e a lista resultante de outros potenciais diagnósticos é limitada a doenças que parecem semelhantes em relação a radiografia de tórax e alteração de oxigenação, mas são subagudas ou crônicas, sendo fibrose pulmonar intersticial idiopática, carcinoma linfangite, doença veno-oclusiva pulmonar; ou são devido ao aumento das pressões hidrostática, sendo estenose mitral, insuficiência ventricular esquerda, sobrecarga de volume intravascular⁵⁴

Assim, o diagnóstico de SDRA de fato pode coexistir com outros diagnósticos mais específicos, tais como pneumonia pneumocócica⁵⁵.

Ao longo dos 18 anos de prática, a precisão do diagnóstico da definição ARDS pelo Consenso euro americano tem sido questionada. Em uma série de 138 pacientes com SARA a definição teve especificidade relativamente baixa em torno de 51 % quando comparado com os resultados da necrópsia demonstrando dano alveolar difuso, tal como avaliado por dois patologistas diferentes⁵⁶. A confiabilidade dos critérios radiográficos da SARA tem sido demonstrado ser moderado, com variabilidade inter substancial^{28,57}. Além disso o critério de hipóxia ($PaO_2 / FiO_2 < 200$ mmhg) pode ser marcadamente afetado por ajuste do ventilador ou do paciente, especialmente o nível de PEEP utilizado¹⁰. Por fim, a pressão de oclusão pode ser de difícil interpretação. Com base nestas preocupações, a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva com o aval da American Thoracic Society e da Sociedade de Medicina Intensiva convocou um painel de especialistas internacionais para rever a definição de ARDS¹¹; o painel

reuniu-se em 2011, em Berlim, e, portanto a nova definição foi proposta e isto para melhorar a viabilidade, confiabilidade e validade preditiva¹².

Na definição de Berlim não há nenhum uso do termo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) pois este termo foi usada de forma inadequada em muitos contextos.

A definição de Berlim

Em trabalho iniciado em 2010, vários membros da Sociedade Europeia de Medicina Intensiva selecionaram outros profissionais da Europa e dos Estados Unidos da América do Norte com o objetivo de rever a Definição de SDRA.⁵⁸ O painel de discussão enfatizou a aplicabilidade, a confiabilidade, a validade (como os médicos reconhecem a doença) e a capacidade preditiva (habilidade de predizer a resposta ao tratamento, o prognóstico ou ambos) de uma nova definição. Determinou-se, também, que qualquer revisão da definição devesse ser compatível com a definição da CCAE para facilitar a interpretação de estudos prévios. Uma predefinição foi estabelecida⁵⁹ e empiricamente avaliada, utilizando meta-análise de dados de 4.188 pacientes com SDRA de quatro diferentes centros e dados fisiológicos de 269 pacientes com SDRA de três centros únicos. A predefinição propôs três categorias de SDRA mutuamente exclusivas, baseando-se no grau de hipoxemia:

SDRA leve ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$),

SDRA moderada ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) e

SDRA grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$);

e quatro variáveis auxiliares para a categoria de SDRA grave:

gravidade radiológica,

Csr ($\leq 40 \text{ mL/cmH}_2\text{O}$),

PEEP ($\geq 10 \text{ cm H}_2\text{O}$) e

volume expirado por minuto corrigido ($\geq 10 \text{ L/min}$).

No teste inicial da proposta, as quatro variáveis auxiliares não contribuíram para a validação da capacidade preditiva da SDRA grave quanto à mortalidade, e foram, então, removidas dos critérios finais da definição. Dessa forma, a definição final passou novamente por discussão e refinamento até ser publicada.

A literatura foi revisada para identificar estudos que preenchessem os seguintes critérios:

1) grandes estudos prospectivos que envolveram vários centros, incluindo pacientes consecutivos ou estudos randomizados ou, ainda, estudos prospectivos de um único centro com dados radiológicos ou fisiológicos de pacientes adultos com LPA/SDRA segundo os critérios da CCAE;

2) estudos para coletar dados necessários para aplicar tanto o rascunho da Definição de Berlin quanto a Definição da CCAE; e

3) os autores desses trabalhos foram convidados a participar e partilhar dados. Foram utilizadas as seguintes variáveis de análise: mortalidade hospitalar ou mortalidade com 90 dias; dias livre de VPM ao 28º dia depois do diagnóstico de LPA; duração da VPM em sobreviventes, utilizada como marcador indireto da gravidade da lesão pulmonar; progressão da gravidade da SDRA em sete dias avaliada a partir de dados longitudinais dos pacientes; radiologicamente, foram diferenciados pacientes com envolvimento mais extenso (3-4 quadrantes) daqueles com lesão mínima (dois quadrantes); complacência estática do sistema respiratório calculada como sendo o volume corrente (em mL) dividido pela pressão de platô (cmH₂O) subtraído da PEEP (cmH₂O); volume expirado por minuto corrigido calculado a partir produto da ventilação minuto pela PaCO₂ dividido por 40 mmHg⁶⁰; peso total do pulmão, calculado por imagens tomográficas⁶¹; *shunt* intrapulmonar calculado com relatado previamente a partir de um local.⁶²

Propostas da Definição de Berlin

Fioretto, JR e Carvalho, WB em 2013 apresenta as principais limitações da CCAE e a adoção da medida correspondente adotada pelo Consenso de Berlin para superar as dificuldades. A Definição de Berlin está apresentada na **tabela 3**.

Tabela 3 – Definição e Berlin para síndrome do desconforto respiratório agudo

Tabela 4 Definição de Berlim para síndrome do desconforto respiratório agudo

Síndrome do desconforto respiratório agudo	
<i>Tempo</i>	Dentro de uma semana de um evento clínico conhecido, ou novo evento, ou piora dos sintomas respiratórios
<i>Radiografia de tórax^a</i>	Opacidades bilaterais - não completamente explicadas por derrames pleurais, colapso lobar ou pulmonar ou nódulos
<i>Origem do edema</i>	Insuficiência respiratória não totalmente explicada por falência cardíaca ou sobrecarga de volume Necessidade de avaliação objetiva (ecocardiograma) para excluir edema hidrostático, se não houver fator de risco
<i>Oxigenação^b</i>	
Leve	200 mm Hg < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 mmHg com PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O ^c
Moderada	100 mm Hg < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 200 mmHg com PEEP ≥ 5 cm H ₂ O
Grave	PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 100 mmHg com PEEP ≥ 5 cm H ₂ O

CPAP, pressão positiva contínua em vias aéreas; FiO₂, fração inspirada de oxigênio; PaO₂, pressão arterial parcial de oxigênio; PEEP, pressão expiratória final positiva.

^a Radiografia ou tomografia de tórax.

^b Se altitude for maior do que 1.000 metros, um fator de correção deve ser utilizado como segue: [PaO₂/FiO₂ × (pressão barométrica/760)].

^c Pode ser liberado de forma não invasiva nos casos de síndrome do desconforto respiratório agudo leve.

Resultados da primeira avaliação prática da Definição de Berlim

Os critérios de SDRA leve foram preenchidos por 22% dos pacientes (IC 95%, 21%-24%), resultados esses comparáveis com o diagnóstico de LPA (não SDRA) da definição da CCAE. Destes, 50% (IC 95%, 48%-51%) preencheram os critérios de SDRA moderada e 28% (IC 95%, 27%-30%) SDRA grave. Os estágios leve, moderado e grave de SDRA associaram-se significativamente com aumento de mortalidade (27%; IC 95%, 24%-30%; 32%; IC 95%, 29%-34%; e 45%; IC 95% 42%-48%, respectivamente; $p < 0,001$).

Comparada à Definição da CCAE, a Definição de Berlim apresentou melhor validade preditiva para mortalidade, com área sob a curva de características de operação do receptor (AUROC) de 0,577 (IC 95%, 0,561-0,593) contra 0,536 (IC 95%, 0,520-0,553; $p < 0,001$). Também, a mediana de dias livres da VPM diminuiu significativamente, comparando-se as classes de SDRA leve, moderada e grave.⁵⁸

Limitações da Definição de Berlim

Evidentemente, todos os estudos para estabelecer critérios diagnósticos e definição de uma dada doença não estão livres de dificuldades inerentes à área biológica. Assim, também a definição ora apresentada tem limitações explicitadas pelos próprios autores,⁵⁸ quais sejam:

- 1) A capacidade da Definição de Berlim foi estatisticamente superior quando comparada com a definição da CCAE; entretanto, a diferença foi pequena e

não teria significado clínico se a primeira fosse desenhada apenas como instrumento clínico de predição, fato esse que não ocorreu.

- 2) Os resultados não podem ser generalizados. No entanto, os autores utilizaram dados de uma ampla população de pacientes, incluindo ensaios clínicos, centros acadêmicos e pacientes da comunidade. Não foram incluídas crianças.
- 3) Perda de dados: em alguns pacientes não foram obtidos dados a respeito da Csr e da PEEP. Entretanto, esse fato não parece ser importante, dada a robustez dos dados apresentados para sensibilidade das análises que excluíram grupos individuais.
- 4) Dificuldades na análise das variáveis auxiliares: as variáveis auxiliares não identificaram subgrupos de maior risco, pois o número de quadrantes na radiografia de tórax não pode ser avaliado de forma confiável, e a PEEP não foi utilizada de forma a ser fator preditor, da mesma forma que a Csr e o volume expirado por minuto corrigido não foram medidos de forma precisa. No teste da Definição de Berlim, ambos PEEP e Csr foram avaliados da forma como são utilizados na prática, e não como elementos pré-especificados.
- 5) O estudo não teve objetivo de desenvolver um modelo prognóstico de SDRA. Também, o entrecruzamento das categorias de SDRA, considerando as definições da CCAE e de Berlim, dificultou a comparação. É possível que o prognóstico e também a proporção relativa de pacientes dentro de cada categoria de SDRA modifique se a epidemiologia da síndrome evoluir por mudanças na prática clínica ou fatores de risco.

Importância prática da nova definição

A importância da divulgação de uma nova definição de SDRA justifica-se por si. Ou seja, partir de experiências de aplicação das outras definições e, conseqüentemente, do seu aprimoramento, a nova definição explicita outra forma de diagnosticar, estratificar a gravidade, aplicar as estratégias terapêuticas e de prognosticar com maior acuidade uma doença tão grave quanto a SDRA.

A definição do Consenso de Berlim apresenta importantes diferenças quando comparada às definições publicadas até o momento, característica esta que traz consigo aspectos práticos imediatos, destacando-se:

- 1) A condição antes denominada “lesão pulmonar aguda”, considerada de menor gravidade e sem importância clínica, foi excluída e reclassificada como SDRA leve. O trabalho que aplicou o consenso de Berlim⁵⁸ mostrou um dado alarmante: quase um quarto dos pacientes, considerando a definição anterior, foi diagnosticado como LPA, e não como SDRA leve (relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 200 e 300 mmHg). Ressalta-se que a mortalidade no grupo de pacientes com SDRA leve foi 27%. Certamente, os pacientes nesse estágio de gravidade da doença devem ser tratados prontamente, seguindo protocolos estabelecidos de ventilação mecânica não invasiva, ventilação mecânica invasiva protetora com aplicação de PEEP e devem merecer atenção das equipes de saúde para o acompanhamento e intervenção clínica terapêutica mais rigorosa. Destaca-se, também, que os pacientes com relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 200 e 300 mmHg não tinham diagnóstico estabelecido, SDRA ou LPA;
- 2) Utilização mais adequada das intervenções terapêuticas disponíveis. Assim, a ventilação mecânica não invasiva por pressão positiva está indicada nos casos de SDRA leve, assim como a aplicação de PEEP baixa a moderada (6 a 9 cm H_2O) e ventilação mecânica com volume corrente baixo (5-7 ml//Kg). Nos casos de SDRA moderada, além dos princípios de ventilação mecânica protetora, já pode ser preciso utilizar PEEP elevada (≥ 10 cm H_2O). Na SDRA grave, outras terapias, algumas coadjuvantes, podem ser introduzidas (ventilação oscilatória de alta frequência, óxido nítrico inalatório, posição prona, bloqueadores neuromusculares e membrana de oxigenação extracorpórea);
- 3) Melhor avaliação prognóstica da criança, possibilitando informar os familiares e responsáveis uma condição mais próxima da realidade, no que se refere à perspectiva da evolução clínica;
- 4) Outro aspecto importante para a prática de pesquisadores é que estudos futuros devem, necessariamente, agrupar os pacientes segundo a nova classificação da síndrome para, com isso, obter dados comparáveis entre si. Os pediatras que atuam na área de pesquisa clínica ou pesquisa básica precisam validar os novos dados em crianças com a máxima brevidade.

1.2. Definição

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é o termo utilizado para definir a insuficiência respiratória decorrente da resposta inflamatória que evolui com

alteração da permeabilidade alvéolo-capilar, acompanhada de hipóxia refratária aos altos fluxos de oxigênio e edema pulmonar (1, 2). Evidências específicas decorrentes ao insulto primário, podem determinar que diferentes causas de SDRA irão resultar em uma patologia parcialmente uniforme. Desta maneira, duas formas de SDRA têm sido descritas:

- SDRA com efeitos diretos nas células epiteliais pulmonares;
- SDRA refletindo um envolvimento pulmonar secundário para uma resposta inflamatória sistêmica apresentando, como centro da injúria, a célula endotelial pulmonar (1, 3).

A definição padrão de SDRA que tem sido usado na maioria dos ensaios clínicos, bem como para a investigação clínica observado ao longo dos últimos 15 anos foi recomendada pela Conferência do Consenso Europeu em 1994 (3). Esta definição identifica pacientes com SDRA como aqueles que têm infiltrado pulmonar bilateral com hipoxemia arterial, utilizando a concentração de oxigênio no sangue arterial dividido pela fração de oxigênio inspirada (isto é, uma proporção de menos de $300/PaO_2/FiO_2$). Se relação PaO_2/FiO_2 do paciente for inferior a 200, um diagnóstico de SDRA pode ser bem aceito. A hipoxemia arterial é causada por acúmulo de líquido e edema nos espaços aéreos distais do pulmão, resultando em defeitos de troca gasosa do sangue.

Dessa forma, tem sido reconhecido que as respostas a SDRA intra e extrapulmonar apresentam determinadas particularidades e a relação entre a inflamação local e a inflamação subsequente ainda é pouco conhecida. A mediação destas respostas ocorre por agentes agressores, que induzem a uma produção de mediadores pró-inflamatórios teciduais, resultando em uma crescente inflamação (1, 3).

1.3. Etiologia

A probabilidade de um paciente desenvolver a síndrome aumenta à medida que um ou mais fatores de risco estão presentes. Por esta razão, é de fundamental importância identificar o risco de desenvolver a síndrome pois, quanto mais precocemente se intervém na causa básica, melhor será o prognóstico. Os fatores de risco mais comumente relacionados à SDRA podem se dividir em lesão direta ou lesão indireta, sendo:

Lesão Direta:

- Aspiração
- Infecção pulmonar, difusa (bacteriana, viral, pneumocysti)
- Afogamento
- Inalação tóxica
- Contusão pulmonar
- Embolia gordurosa
- Toxicidade pelo oxigênio

Lesão Indireta:

- Síndrome séptica
- Politraumatizado
- Politransusão
- Choque
- Grandes queimaduras
- Pancreatite
- “By-pass” cardiopulmonar
- Intoxicação exógena
- Coagulação intravascular, disseminada
- Excesso de fluido

1.4. Patologia

Os achados patológicos característicos nos pulmões de pacientes com SDRA foram melhor descrito em um estudo clássico em 1977, que incluiu detalhes ultra-estruturais em diferentes pontos de tempo nas fases aguda e subaguda e as fases crônicas.(4)

A análise histológica e ultra-estrutural do pulmão lesado tem sido parte integrante de conceitos atuais da patogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo. Em SDRA secundária a sepse Gram-negativas pode demonstrar características-chave do dano alveolar difuso, incluindo membranas hialinas, inflamação, células vermelhas intra-alveolares e neutrófilos, e espessamento da membrana alveolo-capilar.

Patogênese

A patogênese de SDRA pode ser melhor compreendida, concentrando-se em:

- Os fatores que são responsáveis pela acumulação do edema pulmonar rico em proteína e neutrófilos no interstício pulmonar e nos espaços aéreos distais dos pulmões
- Os mecanismos que prejudicam a remoção de fluido do edema pulmonar e células inflamatórias do pulmão. O fluido de edema rico em proteínas na SDRA está associado com um grande número de neutrófilos; monócitos; células epiteliais desnudadas e marcadores pró-inflamatórios incluindo citocinas, proteases, oxidantes e fatores pró-coagulantes.

1.5. Fisiopatologia

Em um estudo realizado (5, 6) foram demonstradas algumas características da sua ultra estrutura em diferentes fases da doença como aguda, subaguda e crônica).

Essas três fases variam de acordo com o tempo e a sua evolução. A fase exsudativa apresenta edema e hemorragia, a fase proliferativa com organização e reparação e por último a fase de fibrose (7). No entanto, alguns estudos demonstram que a fibrose pode ocorrer precocemente, logo no início da doença (8).

A fase aguda ou também denominada exsudativa tem sua evolução em 1 a 6 dias. Nela ocorre um edema intersticial e alveolar com a presença de Polimorfonucleados (PMN) e hemácias no interior dos alvéolos podendo ocorrer uma lesão do endotélio vascular periférico ou dos pneumócitos tipo I (epitélio alveolar), caracterizando uma fase com a presença de uma membrana hialina (8, 9).

Com relação à fase subaguda ou também denominada proliferativa que ocorre entre 7 a 14 dias o edema é inicialmente reabsorvido, evidenciando uma tentativa de reparo com a proliferação das fibras colágenas do tipo II com uma infiltração de fibroblastos e colágenos (10).

A fase crônica é o estágio em que o tecido se encontra em fibrose. Ocorre após duas semanas, evidenciando a remissão de infiltrados neutrofílicos agudo com maior número de células mononucleares e macrófagos alveolares (que repararão o epitélio alveolar), retomando à origem fisiológica do tecido. Pode também ocorrer a remissão do edema e inflamação aguda, não havendo a fibrose (10).

Na SDRA podemos observar algumas peculiaridades acumuladas no exsudato levando ao edema neutrofílico no interstício pulmonar e também no espaço aéreo distal. A barreira das células do endotélio pulmonar entre o sangue e o espaço extrapulmonar respondem pela síntese de determinadas secreções que contribuirão para hemostasia deste tecido. Dentre essas funções neste ciclo estão as propriedades pró-coagulantes, antiplaquetárias, anticoagulantes, fibrinolíticas e metabólicas que vão regular o tônus vascular no fluxo sanguíneo e a resposta inflamatória e imunológica (10).

Dentre as características que promovem o aparecimento da SDRA é importante observar também o endotélio vascular pulmonar e o epitélio alveolar, pois o aumento da permeabilidade vascular ocorre na microcirculação acumulando exsudatos no interior do alvéolo, culminando em uma inflamação aguda.(10)

Em muitos modelos experimentais a lesão pulmonar é gerada pela degranulação do neutrófilo acumulado e ativado nas regiões microvasculares do pulmão levando a liberação de mediadores tóxicos como: proteases, espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-coagulantes que vão resultar no aumento da permeabilidade vascular e perda funcional na barreira endotelial. (11) Atualmente, demonstrou-se que as plaquetas podem desenvolver uma ação sinérgica com os neutrófilos causando lesão do endotélio e interação diretamente com os neutrófilos e monócitos que vão estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Ainda não se sabe como se manifesta a via mediadora da interação entre plaquetas e neutrófilos na lesão pulmonar aguda. No entanto há um recrutamento de neutrófilos que vai agir na interação do endotélio que se chama adesão por rolamento. (8) Provavelmente quando ocorre a detecção do lipopolissacarídeo no sangue vai ocorrer uma ligação plaquetária com os neutrófilos, ativando o endotélio que estimula a captura das bactérias. (13)

Posto isso observou -se que alguns mediadores inflamatórios atuam no endotélio pulmonar resultando no aumento da ação das citocinas e também no aumento da adesão dos leucócitos na membrana celular.

O alvéolo é a estrutura mais envolvida na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda em que ocorre a entrada de água e solutos pelo surfactante cuja atividade é o resultado da interação físico-química entre as moléculas de água e ar presentes no

interior dos alvéolos, resultando em uma força de intensidade variável, chamada de tensão superficial que varia de acordo com o diâmetro alveolar. Assim, com a redução do diâmetro observada no final da expiração, esta força aumenta de grandeza e tende a causar o colapamento alveolar. Desta forma, a tensão superficial do interior do alvéolo exerce grande influência sobre a mecânica pulmonar. A principal função do filme de surfactante (pneumócito tipo II), que se situa entre as camadas de água e o ar no interior do alvéolo, é a redução da tensão superficial no final da expiração, a fim de se evitar o colapamento alveolar. Através deste mecanismo, o filme de surfactante também modifica o balanço de líquidos entre o espaço vascular, o interstício e o interior do alvéolo (13).

A lesão do endotélio vascular pulmonar na SDRA atua para o desenvolvimento do edema exsudativo e tudo indica que a presença dos neutrófilos e seus produtos é o mecanismo responsável pela lesão epitelial. Os neutrófilos atravessam o epitélio alveolar por quimiotaxia e não altera sua permeabilidade do tecido, porém pode haver um quadro infeccioso ocorrendo esta migração.

A migração dos neutrófilos pode ocorrer em três estágios: adesão, migração e pós migração. Essa ativação neutrofílica pela exposição de citocinas promove um estímulo inflamatório havendo um efeito lesivo.

A adesão dos neutrófilos ocorre na superfície do epitélio através das integrinas beta 2 que são uma super-família de glicoproteínas envolvidas principalmente na fixação de células à matriz extracelular, apesar de alguns também estarem envolvidos na junção célula-célula. Eles estão presentes na superfície da célula em altas concentrações. Quando os neutrófilos atravessam o epitélio eles aderem ao espaço aéreo e se alojam na superfície apical das células, onde fagocitam e matam as bactérias (10).

Normalmente quando os neutrófilos atravessam as junções intercelulares elas se fecham mantendo a barreira epitelial e o espaço aéreo livres de líquido e quando há algum estado patológico um grande número de neutrófilos lesa o epitélio através de moléculas tóxicas que induzem a dissolução das junções intercelulares além de causarem necrose das células alveolares tipo I e II (10). Sabe-se que as células tipo I são bem vulneráveis às lesões, porém as do tipo II são resistentes e podem funcionar como progenitoras para regeneração do epitélio após a lesão (1).

Dentre as células tóxicas envolvidas nesse processo, temos:

- as proteases como a elastase e colagenase que estão relacionadas a agressão da membrana celular,
- espécies reativas de oxigênio que alteram a estrutura secundária de proteínas e lípidos na membrana celular, levando a lesão tecidual,
- peptídeos catiônicos como as defensinas que provocam a abertura de poros entre as células (12).

Sem dúvida alguma a lesão alveolar difusa é o principal fator dos pacientes com SDRA, independente da lesão intrapulmonar, como as pneumonias ou aspirações gástricas ou extra-pulmonar como sepsis ou traumas (14).

A barreira alveolar normal é composta de três diferentes estruturas: o endotélio capilar, o espaço intersticial, incluindo a membrana basal e a matriz extracelular, e o epitélio alveolar. O epitélio alveolar consiste de células alveolares tipos I e II. A superfície de células tipo I engloba cerca de 90 % da área alveolar. As células cubóides alveolares tipo II são células multifuncionais. Elas produzem surfactante que são importantes para ativar *clearance* do líquido alveolar e representam as células progenitoras que regeneram o epitélio alveolar após a injúria (1)

Em estudos histológicos de tecidos pulmonares provenientes de pacientes com SDRA, a primeira lesão aparece como edema intersticial seguido por lesão severa do epitélio alveolar. O epitélio alveolar usualmente exibe extensiva necrose das células alveolares tipo I deixando uma erosão, porém, mantendo a membrana basal recoberta com membranas hialinas. A célula epitelial tipo I é altamente vulnerável a lesões, entretanto, a tipo II é a célula mais resistente e pode funcionar como progenitora celular para regeneração do epitélio após a lesão.

A interleucina 8 (IL-8) é um forte fator quimiotático para neutrófilos nos pulmões e altas concentrações desta citocina e tem sido observada nos pacientes com SDRA. Nos fluidos broncoalveolares, os níveis de IL- 8 são significativamente mais altos em pacientes que desenvolveram SDRA que aqueles que não desenvolveram, podendo também ser utilizado como um fator prognóstico para a doença (15).

Estudos experimentais demonstram que em modelos de sepsis, a cascata de citocinas consiste em TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra, sTNF-R e IL-10 (16). As duas primeiras citocinas da cascata são TNF- α e a IL-1 β , sendo produzidas localmente. Essas

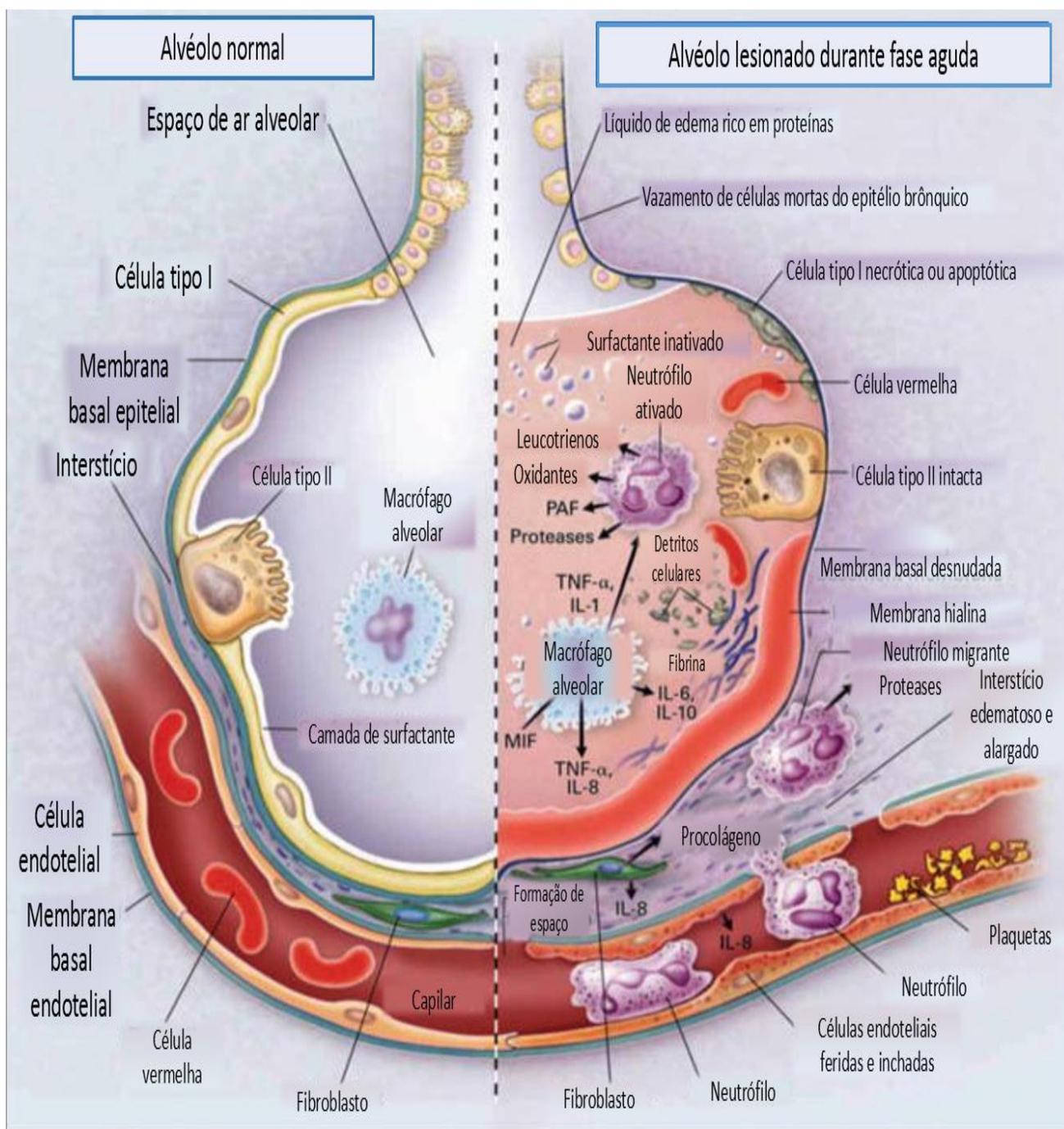
citocinas são usualmente referidas como pró-inflamatórias e tanto o TNF- α como a IL-1 β , estimulam a produção de IL-6 e ambas (IL-1 β e IL-6) podem apresentar papel tanto pró-inflamatório como antiinflamatório. O TNF- α tem sido reportado como um importante modulador na injúria pulmonar aguda (17). Estudos experimentais têm sugerido que os níveis plasmáticos de TNF- α aumentam durante a injúria pulmonar e, bloquear seus efeitos biológicos, através de anticorpos, induz a uma diminuição da severidade da lesão. Além disso, injeções intra-venosas de TNF- α induzem à injúria pulmonar aguda com sequestro de neutrófilos e aumento da permeabilidade microvascular (17,18).

Após o início da lesão inicial, a produção de citocinas pelo parênquima pulmonar aumenta significativamente e são liberadas pelos macrófagos ativados via p38 MAPK (17).

A perda da integridade do epitélio alveolar gera conseqüências funcionais e patológicas severas, como o influxo de proteínas e edema para o espaço aéreo com deposição de membrana hialina na membrana basal lesada, hiperplasia da célula alveolar tipo II típica da fase proliferativa da SDRA, células alveolares tipo II migrando e iniciando a proliferação ao longo do septo alveolar na tentativa de recobrir a membrana basal lesada e restabelecer a continuidade do epitélio alveolar. Dentro da parede alveolar, fibroblastos proliferam e migram para a membrana basal através do exsudato fibroso intra-alveolar. Se o exsudato fibroso pode resolver esse processo lesivo, a restauração da arquitetura normal do pulmão pode ser alcançada. Entretanto, se a célula alveolar tipo II migrar sobre a superfície da organização tecidual granular, ocorre uma transformação de exsudato intra-alveolar para tecido intersticial, e a fibrose intersticial do pulmão pode se desenvolver (1).

A inflamação sistêmica está associada com a ativação da coagulação e o sistema fibrinolítico. (19). O maior iniciador da cascata de coagulação é o tissue factor (TF), sendo o receptor e cofator para o fator de coagulação VII no plasma. O TF é induzido por mediadores inflamatórios como a IL-6, IL-8, e MCP1 (19), onde normalmente o TF é expresso em células em contato direto com o sangue, mas pode ser expresso em células intravasculares principalmente monócitos e células endoteliais quando estimulados especialmente por estímulos inflamatórios incluindo o lipopolisacarídeo *Escherichia coli* (LPS). Quando aumentado, o TF pode ser o responsável pelas manifestações trombóticas em vários estados inflamatórios (19)

Modelo de Alvéolo - Fisiopatologia



Matthay MA; Zimmerman, GA., 2005

Na imagem observamos a dinâmica fisiológica do alvéolo ao lado esquerdo e o alvéolo lesado no lado direito da página. O processo inflamatório após instalação do fator predisponente, circulação extracorpórea prolongada ou por reação à administração de produtos sanguíneos ocorrerá a liberação dos fatores mediadores da inflamação e a consequente alteração da permeabilidade da membrana alveolocapilar.

Precocemente, grande afluxo de neutrófilos para o território pulmonar e uma série de reações:

a) Liberação de proteases (colagenase e elastase) relacionadas diretamente com a agressão à membrana celular.

b) Liberação de radicais superóxidos pelos polimorfonucleares, que alteram a estrutura secundária de proteínas e lípidos da membrana celular, levando à lesão tecidual.

c) A cicloxigenase e a lipoxigenase (liberadas pelos próprios neutrófilos) na presença de ácidos graxos livres resultantes da lesão das membranas produzem prostaglandinas e leucotrienos. Estes geram vasoconstrição e broncoconstrição. Os leucotrienos possuem também efeito quimiotático para neutrófilos (LTB-4) e alteram a permeabilidade da membrana alveolocapilar.

d) Os neutrófilos recrutados ao parênquima pulmonar são ativados e agregam-se a membrana do endotélio. Essa interação entre neutrófilo e membrana endotelial é fundamental para criar um ambiente em que radicais superóxidos e proteases, liberados pelo neutrófilo ativado, possam agir sem sofrer mediação por agentes normalmente presentes na corrente sanguínea. Essa interação é feita por moléculas de adesão, as selectinas, que são expressas na membrana, tanto no próprio neutrófilo (L-selectina) como na célula endotelial (E-selectina e P-selectina). A expressão das moléculas de adesão ocorre em resposta a um estímulo por citocinas (como, por exemplo, fator de necrose tecidual), e facilita a agregação dos polimorfonucleares. Essa interação é feita por moléculas de adesão, as selectinas, que são expressas na membrana tanto do próprio neutrófilo (L-selectina) como na célula endotelial (E-selectina, P-selectina), em resposta ao estímulo por citocinas (como, por exemplo, fator de necrose tumoral) ou mediadores da inflamação (como lipopolissacarídeos bacterianos — LPS). Além das selectinas, a família das integrinas tem papel importante nesse mecanismo de adesão dos neutrófilos. Uma vez ativadas por mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF), passam a expressar receptores de superfície CD11/CD18, que reconhecem as moléculas de adesão intercelulares ICAM-1 e ICAM-2 expressas na superfície do endotélio. Essa interação protéica torna ainda mais forte a adesão, permitindo que a reação inflamatória prossiga localmente.

e) Os neutrófilos ativados liberam citocinas como o fator de necrose tumoral e as interleucinas, principalmente IL-1, IL-4, IL-6 e IL-8, que têm papel determinante no desenvolvimento da SARA. Em resposta a esses mediadores, verifica-se aumento

da atividade pró-coagulante, com deposição de fibrina, aumento da degradação e liberação de produtos de degradação da fibrina e dímero D. Esses fenômenos ocorrem em toda a área lesada, mas principalmente no lado alveolar da barreira, contribuindo para a formação da membrana hialina, que é a marca histológica da síndrome.

f) A presença de fibrina contribui para a inativação do surfactante. Serve de matriz e estímulo para a proliferação e a ativação de fibroblastos, responsáveis pela fibrose e pela reparação do tecido alveolar. Produtos de degradação da fibrina podem aumentar a permeabilidade vascular e a vasoconstrição, uma associação que favorece a formação de edema. Níveis elevados de dímero D e de atividade pró-coagulante no lavado broncoalveolar de pacientes de risco são marcadores do desenvolvimento da síndrome.

A ocorrência da síndrome em indivíduos depletados de neutrófilos mostra que, além do neutrófilo, dois efeitos têm papel destacado em seu desenvolvimento: os macrófagos e as plaquetas.

Os macrófagos, células residentes no território pulmonar, contam com um arsenal lesivo semelhante ao dos neutrófilos e produzem grande quantidade de fator de necrose tumoral. Essa citocina é capaz de desencadear todo o processo da SARA.

As plaquetas, por sua vez, por meio de sua agregação intravascular e conseqüente formação de microtrombos, levam ao desequilíbrio na relação V/Q, que piora pela vasoconstrição secundária a liberação de prostaglandinas e serotonina. As plaquetas também estão envolvidas no processo de reparação que se segue a lesão do parênquima pulmonar, já que liberam grandes quantidades de PGDF, potente estimulante mitogênico para os fibroblastos.

Recentemente demonstrou-se a importância de um novo mediador da inflamação: o óxido nítrico. Liberado por endotélio, neutrófilos, macrófagos e plaquetas, participa diretamente da alteração da permeabilidade da membrana alveolocapilar.

Numa fase mais avançada, há uma certa organização do processo, com proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, culminando com o estabelecimento de fibrose. A fibrose pulmonar depende não somente da presença de mitógenos, como o PGDF, como também de uma matriz apropriada, que resulta da coagulação intra-alveolar da fibrina extravasada do plasma, em função da alteração da permeabilidade da membrana alveolocapilar.

A superfície epitelial dos alvéolos apresenta intensa atividade anticoagulante determinada pela presença de ativadores do plasminogênio. A perda desses ativadores é um dos eventos iniciais na SARA.

A surfactante sofre interferência em sua ação pelos produtos de degradação da fibrina e tem sua produção alterada, por causa do comprometimento dos pneumócitos do tipo II.

Essas alterações causam anormalidades na função pulmonar. Há diminuição da complacência pulmonar e estabelecimento de insuficiência respiratória e hipoxêmica secundária a alterações na relação ventilação-perfusão, e ao estabelecimento de “shunt” venoarterial pulmonar secundário ao colapso alveolar. O broncospasmo, se presente, contribuirá para a intensificação dessas alterações

1.6. SDRA e mediadores inflamatórios

Alguns tecidos severamente lesados são reconhecidos como produtores de uma resposta inflamatória local e sistêmica. Essa resposta inflamatória acarreta em grande risco de falência orgânica como tem sido visto na SDRA (20, 21). Alguns mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos como responsáveis pela injúria pulmonar aguda e remota perpetuação sistêmica após a injúria local, como a liberação de mediadores pró-inflamatórios, atração e ativação de células polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, bem como uma potencial ativação de uma sinalização inflamatória simpática (22).

A Fosfolipase A₂ (PLA₂) tem sido investigada por muitos autores. Ela é ativada pela tripsina no duodeno removendo ácidos graxos dos lipídeos. Fisiologicamente, a superfície alveolar é recoberta por surfactante que previne colapso alveolar mantendo a tensão superficial. Um dos mais importantes componentes do surfactante pulmonar é o fosfolípido dipalmitoi-1-fosfatidicolina que é um perfeito substrato para a PLA₂. Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição do surfactante que ocorre na SDRA pode estar sendo mediada pela ação da PLA₂. A reação básica da insuficiência pulmonar e SDRA é a destruição do surfactante (10).

Inúmeras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, etc) também têm sido descritas como importantes no processo fisiopatológico da SDRA (23), por exemplo, a IL-8 que é uma potente citocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos e está

aumentada na SDRA tanto no LBA quanto na circulação sistêmica (23). Além disso, os níveis de IL-8 também estão associados com os níveis de gravidade da SDRA além de se correlacionarem com a taxa de mortalidade provocada pela SDRA (23, 24). A IL-1 também desempenha papel fundamental na fisiopatologia da SDRA, uma vez que a ausência da produção de IL-1 através do silenciamento do gene para IL-1 ou mesmo através do bloqueio farmacológico da IL-1 resultou na completa inibição da neutrofilia (25). Outra citocina que apresenta papel fundamental na fisiopatologia da SDRA é a IL-6 (26, 27). Níveis aumentados de IL-6 estão correlacionados com pobre prognóstico de pacientes com SDRA (28), além de apresentarem-se aumentados também em modelos experimentais de SDRA, contribuindo para a perpetuação da inflamação e também agindo como um adjuvante pró-coagulante (29, 30).

1.7. Inibidores de Leucotrienos Cys

Na década de 40, a substância de reação lenta da anafilaxia (SRS-A) foi descoberta, mas somente no final dos anos 70 é que os investigadores concluíram que ela é constituída por três compostos relacionados, que foram denominados leucotrienos. O termo *leucotrieno* (LT) foi proposto porque a sua síntese ocorre nos *leucócitos* e sua estrutura química apresenta três ligações alternadas (*trieno*) de um total de quatro ligações duplas (daí o número 4, por exemplo, LTD₄). Diferentes do LTB₄, os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ contêm o aminoácido cisteína em sua molécula e, por isto, eles são chamados de cisteinil -leucotrienos.

Os leucotrienos são derivados do metabolismo oxidativo do ácido araquidônico das membranas perinucleares. Diferente da histamina, que é sintetizada e armazenada em grânulos que são rapidamente liberados quando a célula é ativada, os leucotrienos são sintetizados após a ativação celular e então liberados. Grandes quantidades de cisteinil-leucotrienos são sintetizadas por mastócitos e eosinófilos, células comprometidas com a patogênese da asma (2).

Os leucotrienos atuam ligando e ativando receptores específicos da superfície das células-alvo. Até o momento já foram identificados três tipos de receptores em pulmões humanos: um receptor para LTB₄ e dois receptores para cisteinil-leucotrienos (receptores *CysLt₁* e *CysLt₂*). Em seres humanos, o principal receptor para cisteinil-leucotrienos é o *CysLt₁*. Os receptores *CysLt₂* são intermediários da contração vascular da musculatura lisa pulmonar.

Pesquisas têm demonstrado que os LTC₄ e LTD₄ são praticamente equipotentes, com a ação de broncoconstrição aproximadamente 1000 vezes mais intensa que a da

histamina, estando entre os broncoconstritores mais potentes já conhecidos. A ação dos leucotrienos inicia-se mais lentamente que a da histamina, mas a sua duração é muito maior que a induzida por ela. O LTE_4 é dez vezes menos potente que os LTC_4 e LTD_4 . Testes de provocação com alérgeno inalado têm sido associados ao aumento de LTE_4 urinário durante a fase imediata, mas não na fase tardia da asma. O volume de LTE_4 na urina correlaciona-se com a magnitude da queda de VEF_1 após a provocação com alérgeno.

Além da ação broncoconstritora, os cisteinil leucotrienos são potentes mediadores pró-inflamatórios (1).

A inibição dos receptores de leucotrienos cys resulta em diminuição da inflamação das vias aéreas na asma (31). Evidências recentes sugerem que o TFA melhora a inflamação alérgica das vias aéreas, tanto em modelos experimentais quanto em humanos (31, 32)^{24,33}. Um dado preliminar aponta que o TFA diminui os níveis de leucotrieno B4 (LTB_4) no fluido broncoalveolar de camundongos em modelo experimental de asma.

Portanto, há a hipótese de que os efeitos antiinflamatórios do TFA em modelo experimental de asma possa ser mediado pela inibição da produção de leucotrienos através da inibição da 5-lipoxygenase (5-LO) ou LTC_4 sintase, ou ainda pela inibição da expressão dos receptores de leucotrienos receptor BLT1, receptor BLT2, receptor cysLT1 e receptor cysLT2. Além disso, existem evidências na literatura de que os inibidores de leucotrienos previnem a diminuição da síntese de IL-10 ocorrida na asma (3) enquanto que um outro estudo demonstra que a IL-10 inibe a ativação celular na asma via inibição dos leucotrienos (34). Existem ainda inúmeros estudos demonstrando que a IL-10 apresenta importantes efeitos antiinflamatórios na asma (35, 36). Estudos têm demonstrado que os efeitos do TFA na asma podem ser mediados pelos aumentos na síntese de IL-10 induzida pelo exercício (34).

2. Objetivos

Avaliar os efeitos do inibidor de leucotrienos (MK0476) associado a inflamação pulmonar e sistêmica em um modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) induzida por LPS em camundongos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Nove de Julho, em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12h

escuro) e temperatura (22°C-25°C). Utilizou-se 35 Camundongos C57Bl/6, machos, com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 20 gramas, os quais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n = 7 animais em cada grupo).

3.1.1 Grupos experimentais

- 1- Controle 24 horas: 7 animais (eutanásia).
- 2- Controle 48 horas: 7 animais (eutanásia).
- 3- LPS 24 horas: 7 animais [eutanásia 24 horas após a administração intra-traqueal 10 µg (microgramas) de LPS].
- 4- LPS 48 horas: 7 animais [eutanásia 48 horas após a administração intra-traqueal de 10 µg (microgramas) de LPS].

3.1.2 Manuseio dos Camundongos

Para realizarmos a coleta os animais que estavam acondicionados nas gaiolas foram pegos de acordo com as técnicas adequadas como vemos nas figuras abaixo: com empunhadura em região cervical e pela cauda e acomodando na palma da mão (Fig.1), para receber anestesia com Quetamina e Xilazina (Ketamina: 01 a 1,5 microlitros de ketamina por grama de peso Xilazina: 0,5 microlitros de xilazina por grama de peso) (Fig.2)

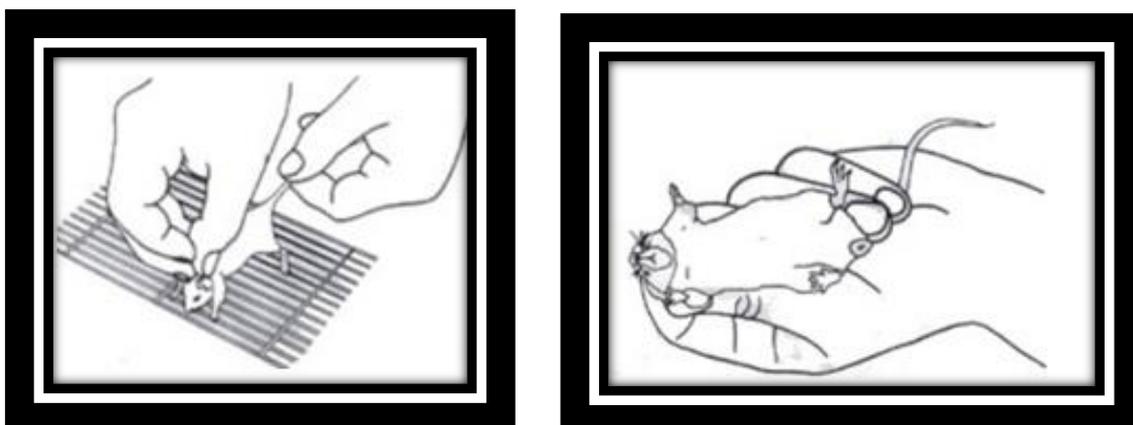


Fig. 1 Chorilli,M; Michelin,DC; Salgado,HRN.

Em posição na placa de parafina em decúbito dorsal para a realização da incisão em região

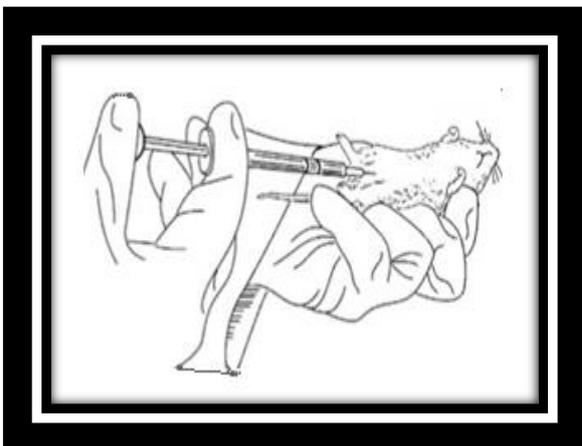


Fig. 2 Chorilli,M; Michelin,DC; Salgado,HRN.

O sangue coletado foi armazenado em eppendorf e utilizado para contagem total de células em Câmara de Neubauer, o restante foi centrifugado a 3000 RPM a 4°C durante 10 min.

O soro em suspensão foi armazenado em tubo eppendorf a -70°C para análise dos níveis de citocinas por ELISA.

Feito traqueostomia e com gelco nº 14 com PSB (solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio) .colhido 3 frascos com 50 microlitros deste lavado e por meio de gavagem como mostra a figura (Fig.3) introduzido o MK 0476 1 mg/Kg de peso .

PSB possui muitas aplicações, pois é isotônico (tem a mesma pressão osmótica) e não é tóxico em relação às células. Ele pode também ser utilizado para diluir diferentes substâncias, ou como uma solução para limpeza celular. Para garantir uma prolongada armazenagem a seco, de biomoléculas imobilizadas, tais como proteínas, proteínas enzimáticas etc., o PBS é usado como um diluente biomolecular, já que pode manter água em torno das biomoléculas imobilizadas em uma superfície sólida. Este fino filme de água formado, previne a desnaturação das biomoléculas ou mudanças conformacionais. Tampões carbonato podem ser também usados com a mesma finalidade, mas com menos eficácia. O PBS puro pode ser usado como um

espectro de referência, quando é determinada a absorção de proteínas por elipsometria.

O uso de aditivos pode modificar a funcionalidade de um tampão PBS. Por exemplo, o PBS com EDTA é usado para desalojar células que estejam aderidas ou agregadas em determinados sistemas. metais divalentes, como, por exemplo, o zinco, não podem ser adicionados em misturas contendo PBS, pois ocorrem precipitações. Neste caso, é possível utilizar-se outros tipos de sistemas tampão.(35)



Fig. 3 Chorilli,M; Michelin,DC; Salgado,HRN.

5- (MK - 0476) + LPS 48 horas: 7 animais [eutanásia 48 horas após a administração intra-traqueal 10 μ g (microgramas) de LPS e 24 horas após a administração de MK 0476 (1mg/kg)].

Na prática administrou-se o LPS, seguidas 24 horas administrou-se o MK 0476 e a eutanásia ocorreu 24 horas após o MK 0476.

3.2. Modelo de SDRA intrapulmonar usando Lipopolissacarídeo (LPS)

Os animais do grupo IT (Intratraqueal) e IT + MK receberam LPS + solução salina 0,9% (10 μ g/mouse) uma única vez com o auxílio de uma micropipeta 20 μ l, sendo que os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilazina para este procedimento.

3.3. Coleta de Sangue

24 horas após administração de LPS e LPS e MK 0476 os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina sendo realizada uma incisão na região abdominal e através da veia cava inferior coletado entre 0,5 ml e 1,0 ml de sangue. O sangue coletado foi armazenado em eppendorf e utilizado para contagem total de células em Câmara de Neubauer, o restante foi centrifugado a 3000 RPM a 4°C durante 10 min. O soro suspenso foi armazenado em tubo eppendorf a -70°C para análise dos níveis de citocinas por ELISA.

3.4. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado bronco alveolar (LBA)

Após coleta de sangue foi realizado uma traqueostomia, os animais foram canulados e os pulmões fluidos com 3 x 50 ul de PBS. O volume do fluido recuperado foi centrifugado (1000 rpm, durante 10 minutos) a 05°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -70° C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão de células foi ressuspensionado em 1 ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Dez microlitros foram utilizados para contagem do número total de células com auxílio de uma câmara de Neubauer. Cem microlitros foram utilizados para contagem diferencial após centrifugação (06 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA) e coloração das lâminas com May-Grun-wald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina (37).

3.5. Avaliação dos níveis de citocinas no lavado bronco alveolar (LBA) e no soro por ELISA

Os níveis de IL-1 β , IL-6, KC/CXCL1, IL-10, TNF- α e IFN- γ no LBA e soro foram avaliados através dos kits da Biolegends e da R&D Systems conforme instrução das empresas.

3.6. Histologia - Análise da Densidade de Neutrófilos no Parênquima Pulmonar

Após a coleta do sangue e do LBA, os pulmões foram removidos em bloco e fixados em formol 10% durante 24 horas e submetidos à rotina histológica. As lâminas contendo os cortes dos pulmões em 05 μ m foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Com o intuito de avaliar os efeitos do laser sobre a densidade de neutrófilos no

parênquima pulmonar, foram fotografados 15 campos aleatórios do parênquima pulmonar num aumento de 40x e então através da análise de imagem (utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0), foi avaliada a área de tecido e contado o número de células polimorfonucleares (PMN) nessa área. Assim, o número de células PMN foi expresso em número de células por mm² de área de tecido 38,39.

3.7. Avaliação da expressão de LTB₄R e NF-κB nas proteínas dos pulmões

A avaliação da expressão do LTB₄R e do NF-κB no tecido pulmonar e nas células (leucócitos totais) do LBA e nos leucócitos totais da cultura de sangue total foram realizadas com o intuito de avaliar se os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelo MK0476 após o estímulo com LPS é resultante da inibição da expressão do LTB₄R e do NF-κB. A avaliação da expressão do LTB₄R e do NF-κB foram realizadas através da técnica de Imunohistoquímica.

3.8. Avaliação de proteínas no LBA

Para a análise de proteínas totais foi feito o método BCA, utilizando kit de proteínas utilizando as instruções do fabricante.

3.9. Obtenção e purificação e neutrófilos de sangue periférico

Foram coletados aproximadamente 50ml sangue heparinizado e diluídos em salina estéril 0,9 % na proporção de 1:1; em seguida, a suspensão de hemácias e granulócitos foi obtida após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm através da solução de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Ltd). As hemácias foram lisadas com uma solução de cloreto de amônia (Pharm Lyse- BD bioscience, Sam Jose, EUA). Os granulócitos foram quantificados na suspensão celular com o uso da câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 2.7×10^7 . Em seguida os neutrófilos foram purificados através de seleção negativa seguindo as instruções do kit EasySep® Negative Selection Human Neutrophils Enrichment Cocktail (Stem Cell). A viabilidade celular foi de 95% observada com o auxílio do corante azul de Trypan.

3.10 Estimulação dos neutrófilos purificados para quantificação de IL-8.

Após o ajuste a concentração para 1×10^6 de eosinófilos por ml em meio de cultura RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina, foram estimulados com 10 μ mol de Montelair (montelucaste de sódio 4mg - Ache) em triplicata na placa de 24 poços por 6 horas em estufa com 5% de CO² á 37°C. Após a incubação foi coletado o sobrenadante da cultura para a dosagem de IL-8 em Kit de Elisa conforme instruções do fabricante.

3.11. Análises estatísticas

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA).

4. Analise Resultados

A administração terapêutica de MK-0476 reduziu o número de leucócitos no lavado bronco alveolar (LBA). Resultados foram expressados com significancia \pm SEM. Para figura 1A ** $p < 0.01$ comparado com grupo PBS24h. Figura 1B e 1D * $p < 0.05$ comparado com PBS48h e LPS48h + grupo MK. Figura 1C, 1E e 1G * $p < 0.05$ comparado com grupo PBS24h. Figura 1F ** $p < 0.01$ comparado com PBS48h and LPS48h + grupo MK. Figura 1H *** $p < 0.001$ comparado com PBS48h e LPS48h + grupo MK. Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA).

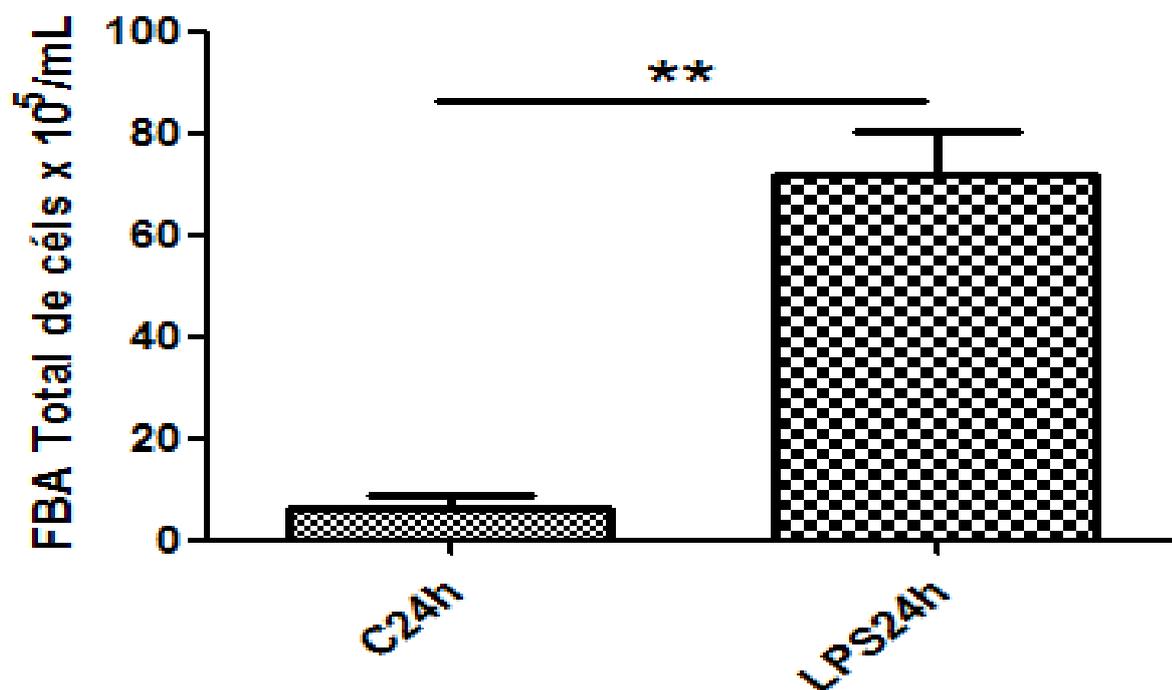
A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-

Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA).

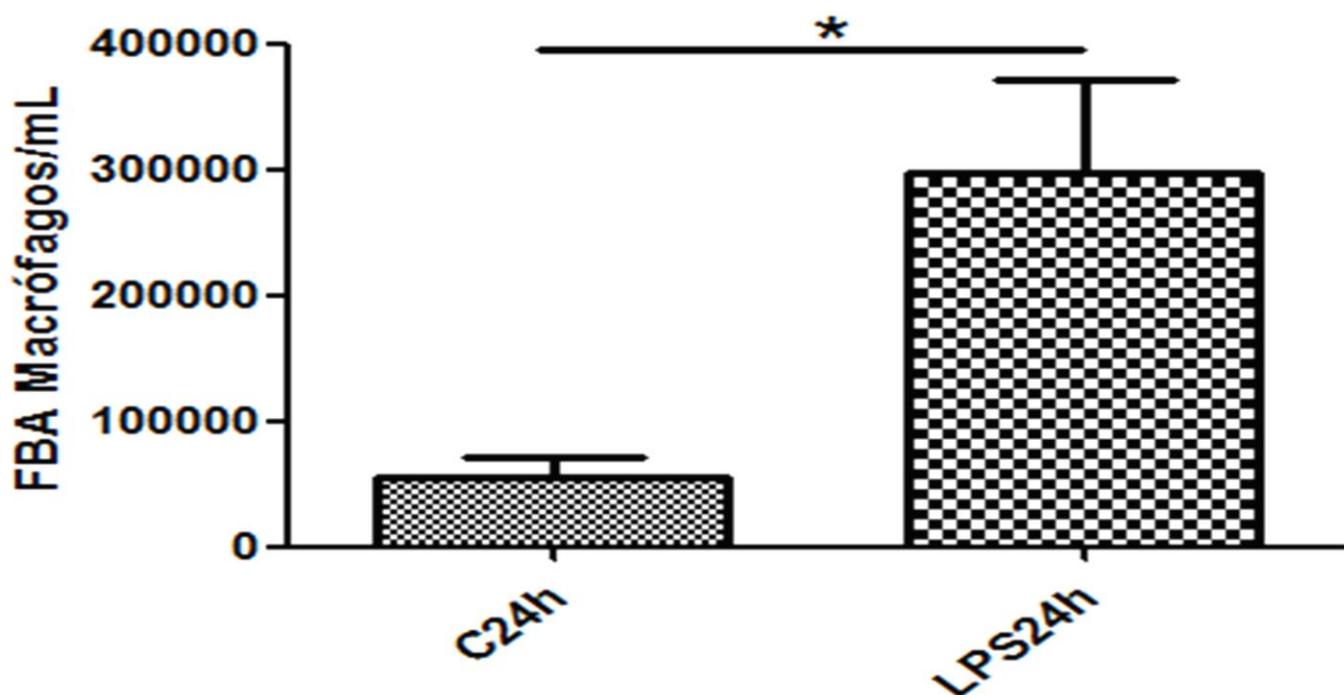
4.1. Contagem Total e Diferencial em LBA 24horas com LPS 24 horas

Gráfico 1 - TOTAL DE CÉLULAS

Avaliação gráfica do total de células no fluido broncoalveolar: controle 24 horas e



indução inflamatória por LPS num período de 24 horas. Quando avaliamos a quantidade de células por mL temos um aumento significativo do debris celular se comparado controle e a indução inflamatória, comprovando a relação teórica e prática previamente estudada.

Gráfico -2 **MACRÓFAGOS**

Macrófagos desempenham um papel chave na regulação do sistema imunológico, orientando as respostas imunes inatas e específicas [1]. Em estágios iniciais de invasão microbiana ou de injúrias teciduais, macrófagos defendem a homeostase local e sistêmica iniciando uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos. Esses ajustes patofisiológicos são mediados por uma extensa variedade de moléculas comunicantes, incluindo citocinas, inibidores de citocinas, hormônios endócrinos, eicosanóides, neurotransmissores e intermediários reativos de oxigênio [1,2]. A diferenciação de macrófagos depende inicialmente da formação de monócitos

que ocorre na medula óssea. Monócitos são diferenciados a partir de células tronco hematopoiéticas precursoras [3]. Os Monócitos circulam na corrente sanguínea durante cerca de um a três dias e, em seguida, movem-se para os tecidos por todo o corpo.

Constituem entre 3-8% dos leucócitos no sangue. Nos tecidos, monócitos maduros se diferenciam em vários tipos de macrófagos em variadas localizações anatômicas [4, 5]. O processo de migração de monócitos, pela corrente sanguínea, para outros tecidos, permite a diferenciação em macrófagos residentes [6]. Macrófagos de diferentes tecidos são conhecidos por diferir com respeito às funções desenvolvidas [7, 8].

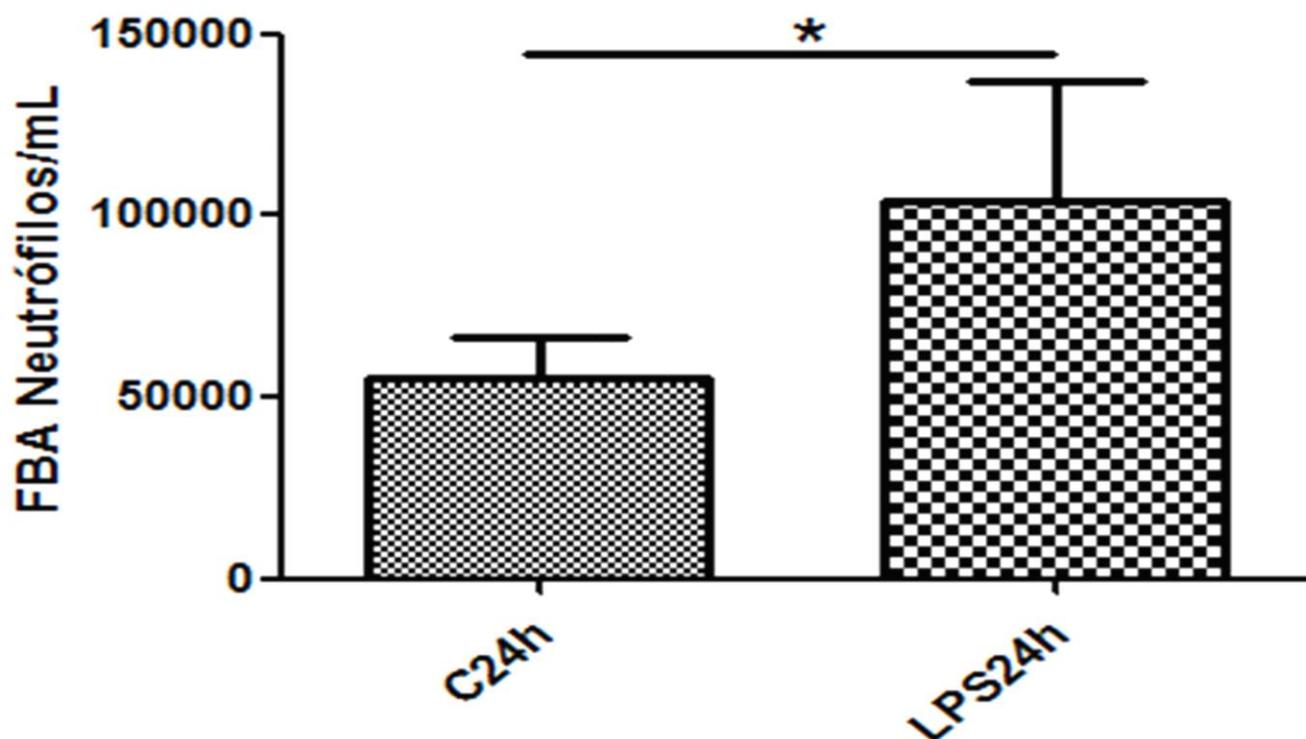
Os macrófagos podem ser classificados basicamente em residentes e ativados.

Macrófagos obtidos de organismos normais, ou seja, não infectados e sem inflamação são denominados residentes, apresentando capacidade mínima de destruir microrganismos, secretando proteases em baixa quantidade, e pouca capacidade para responder a citocinas [9, 10, 11].

Embora os monócitos e macrófagos residentes sejam fagócitos efetivos, podem ser facilmente ativados de forma que suas funções sejam significativamente potencializadas [12].

Como podemos observar o LPS estimulou muito o crescimento dos macrófagos começando a promover um processo inflamatório que posteriormente estimulou a secreção das citocinas IL 1, IL 6, IL 8 IL 10 , TNF α

Gráfico 3 - NEUTRÓFILOS



Os neutrófilos ou polimorfonucleares têm núcleos formados por dois a cinco lóbulos (mais freqüentemente, três lobulos) ligados entre si por finas pontes de cromatina. Constituem importante defesa celular contra a invasão de microorganismos. Os neutrófilos no sangue circulante são esféricos e não fagocitam, mas se tornam amebóides e fagocitários tão logo toquem um substrato sólido sobre o qual possam emitir seus pseudópodos.

Os neutrófilos são uma classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunitário do corpo humano e é um dos 5 principais tipos de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos). Eles são fagocitos capazes de ingerir microorganismos ou partículas. Ao fagocitar forma-se o fagossomo onde os microorganismos serão mortos pela liberação de enzimas hidrolíticas e de espécie reactiva de oxigênio. O consumo de oxigênio durante a reação de espécies de oxigênio é chamado de queima respiratória que nada tem a ver com respiração celular ou produção de energia. São leucócitos polimorfonucleados ou neutrófilos, têm um tempo de vida médio de 6h no sangue e 1-2dias nos tecidos e são os primeiros a chegar às áreas de inflamação, tendo uma grande capacidade de fagocitose. Estão

envolvidos na defesa contra bactérias e fungos. Os neutrófilos possuem receptores na sua superfície como os receptores de proteínas do complemento, receptores do fragmento Fc das imunoglobulinas e moléculas de adesão. Quando visualizada no sangue periférico através de um esfregaço sanguíneo e coradas o neutrófilo apresenta-se como uma célula de diâmetro entre 12-15µm (micrometros). Seu núcleo é polilobulado geralmente apresenta três lóbulos ligados por um fino filamento nuclear. Seu citoplasma é abundante e possui grânulos finos dispersos. Os seus grânulos são divididos em primários e secundários. Os primários aparecem no estágio promielócito. Os secundários (específicos) encontrados no estágio mielocítico e predominantes no neutrófilo maduro. Os neutrófilos são células piogênicas, ou seja, dão o aspecto purulento nas inflamações, aquele “líquido leitoso” do pus. O pus é formado por substâncias bacterianas, bactérias mortas, sangue, mas principalmente por neutrófilos que morreram em combate. Eles possuem receptores de superfície denominados LFA-1 (presente também em macrófagos) , que é uma molécula de adesão, se ligando ao ICAM-1 dos endotélios, que se refere ao receptor de neutrófilos nos vasos. Ao se ligar ao endotélio, o neutrófilo realiza a diapedese, que é o processo no qual o neutrófilo atravessa os poros do endotélio dilatado e entra no tecido. O endotélio se dilata pela presença de vasodilatadores como histamina, prostaglandina E2, prostaciclina e componente C5a do complemento. Os neutrófilos possuem em sua membrana receptores para o componente C3b do complemento . O C3b estimula a fagocitose pelos neutrófilos e o componente C5a é um importante quimiotáxico para eles, aumentando também o seu metabolismo. O C3b é gerada pela fixação do complemento e quando liberada na reação se liga ao receptor de superfície do neutrófilo fazendo opsonização, ou seja, ajuda na ingestão do material pelos fagócitos. Os neutrófilos ainda possuem receptores da fração FC das IgGs chamadas de FC γ R. Estas imunoglobulinas IgG (neste caso são opsoninas) envolvem o material a ser fagocitado e se liga a este receptor de superfície, ocorrendo a emissão de pseudópodes e englobamento da partícula. Suas funções são manutenção da defesa normal do hospedeiro contra microorganismos invasores, remover restos teciduais e agir nos meios extra e intracelular para matar e degradar microorganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos. Funciona também como descarregador do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocitários, além de reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose).

Os microorganismos fagocitados e recobertos com complemento e anticorpo específico (opsonização) são mortos por uma combinação de radicais tóxicos de oxigênio gerados por neutrófilos e proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos se originam da mesma série de granulócitos derivados da medula óssea, que se originam de células primordiais pluripotenciais na medula óssea. As células do estroma, na medula óssea produzem fatores glicoprotéicos específicos estimuladores de colônias de células. Esses fatores estimulam a proliferação e a diferenciação de células progenitoras de neutrófilo, na medula óssea, em neutrófilos maduros. Eles permanecem na medula por aproximadamente cinco dias e então circulam por dez horas antes de entrarem nos locais de inflamação.

O neutrófilo apresenta núcleo segmentado, multilobulado e sem nucléolo. Seu citoplasma apresenta grânulos finos e eletrodensos. O neutrófilo maduro é caracteristicamente deficiente em retículo endoplasmático rugoso (RER) o que indica que a síntese protéica não é uma função importante. Apresenta em seus grânulos citoplasmáticos enzimas capazes de hidrolizar polissacarídeos simples e complexos além de proteínas, lipídeos e outros substratos.

No citoplasma dos neutrófilos existem grânulos contendo proteínas: Lactoferrina e Catelicidina, Mieloperoxidase (Proteína de aumento da permeabilidade /bactericida (BPI), Defensina e Serino protease neutrófilo elastase e Catepsina G), Catepsina, Gelatinase.

Os neutrófilos depois de entrarem na corrente sanguínea, circulam pela mesma, procurando organismos infecciosos e outros intrusos. Quando encontram um, emigram para os tecidos, aderem a eles e produzem substâncias tóxicas que matam e digerem esses organismos. Esta reação pode lesar o tecido sã que está à volta da área da infecção. O processo completo produz uma resposta inflamatória na área infectada, que se manifesta na superfície do organismo como rubor, inchaço e calor.

Dado que os neutrófilos geralmente representam mais de 70 % dos glóbulos brancos, uma diminuição na quantidade de glóbulos brancos significa habitualmente que existe uma diminuição no número total de neutrófilos. Quando a quantidade de neutrófilos cai abaixo de 1000 por microlitro, aumenta em certa medida o risco de infecção e, quando cai abaixo dos 500 por microlitro, o risco de infecção aumenta

consideravelmente. Sem a defesa fundamental que constituem os neutrófilos, qualquer infecção poderá ser mortal.

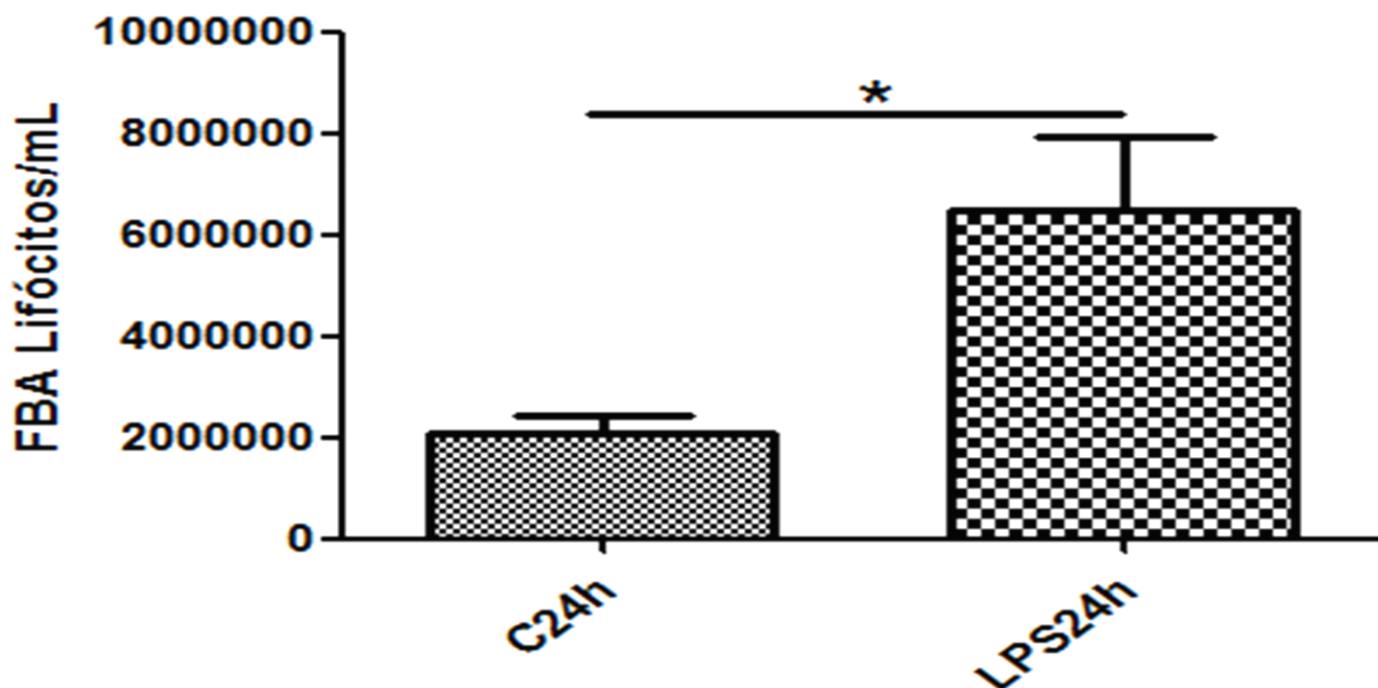
A neutropenia deve-se a diversas causas. A quantidade de neutrófilos pode diminuir devido a uma inadequada produção da medula óssea ou então devido a uma elevada destruição de glóbulos brancos na circulação. Em algumas infecções bacterianas, perturbações alérgicas, doenças auto-imunes e tratamentos com certos medicamentos, os neutrófilos destroem-se com mais rapidez do que levam a produzir-se. As pessoas com baço grande (por exemplo, as que sofrem da síndrome de Felty, de paludismo ou de sarcoidose) podem apresentar quantidades baixas de neutrófilos porque o baço grande os apanha e destrói.

A neutropenia pode desenvolver-se de forma rápida, no decurso de poucas horas ou dias (neutropenia aguda), ou então prolongar-se durante meses ou anos (neutropenia crónica). Como a neutropenia carece de um sintoma específico, é provável que passe despercebida até que se produza uma infecção. Na neutropenia aguda, a pessoa pode ter febre e feridas dolorosas (úlceras) à volta da boca e do ânus. Segue-se a pneumonia bacteriana e outras infecções graves. Na neutropenia crónica, o curso pode ser menos grave se a quantidade de neutrófilos não for excessivamente baixa.

O tratamento da neutropenia depende da causa e da gravidade. Sempre que possível, interrompem-se os medicamentos que poderiam causar neutropenia. Por vezes a medula óssea recupera por si mesma sem qualquer tratamento. As pessoas que sofrem de neutropenia ligeira (mais de 500 neutrófilos por microlitro de sangue) geralmente não apresentam sintomas nem requerem tratamento.

Denota – se que a estimulação do LPS apresentou uma elevação dos neutrófilos em quase o dobro pois ai estimularia a secreção do leucotrienos , produtos oxidantes, PAF, e as proteases.

GRAFICO 4 - LINFÓCITOS



Os linfócitos têm diversas funções no organismo, todas elas de extrema importância para o sistema imunitário (55). Dividem-se em linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (Natural Killers), sendo o linfócito T responsável, principalmente, pelo auxílio ao sistema imunitário e resposta imunitária celular, o linfócito B responsável pela resposta imunitária humoral e os linfócitos NK pela resposta imunitária inespecífica. Os linfócitos T e os linfócitos B produzem respostas imunitárias específicas, pois ambos são estimulados a partir de epítopos de antígeno específico. Neste caso, formam populações monoclonais específicas para atacar o antígeno em questão (54).

Células NK

São parte da imunidade celular mediada. Eles podem atacar a célula hospedeira. Células NK tem parte importante no sistema imune inato e papel principal na defendendo-se de hospedeiros tanto em tumores como em infecções virais. Células NK cells distingue células infectadas e tumorosas de uma normal de células não infectadas por reconhecimento de alterações nos níveis da molécula de superfície chamada de MHC - classe I (Complexo principal de histocompatibilidade).As células NK são ativadas por citocinas chamadas interferons. Ativadas células N liberam grânulos citotóxicos que destroem as células hostis. Elas são chamadas de "natural killer" por causa da noção inicial que elas não necessitavam de ativação primária para matar células (55).

Linfócitos T

São assim chamados pois sofrem maturação no timo sendo também conhecidos pelo nome de timócitos. São responsáveis pela imunidade celular, organismos estranhos ou células infectadas são destruídas pelas células T em um complexo mecanismo. Ha vários tipos de linfócitos T: Linfócitos CD8+, T8, Tc ou Citotóxicos (célula killer): Destroem as células infectadas através de mecanismo de apoptose, que é a morte celular programada; Linfócitos CD4+, T4, Th ou Auxiliares (T helper): São os intermediários da resposta imunitária que proliferam após o contato com o antígeno para ativar outros tipos de células que agirão de maneira mais direta. Existem 2 subtipos conhecidos de linfócitos T auxiliares: Th1 e Th2; Linfocitos T supressores; Linfócitos T reguladores. Os Linfócitos T são responsáveis por uma modalidade de defesa chamada Imunidade Celular. Formam clones de linfócitos específicos para combater os agentes portadores dos antígenos detectados a cada ataque e os lançam na circulação. Suas células precursoras, primitivas, teriam sido processadas, durante a vida fetal, no timo (55).

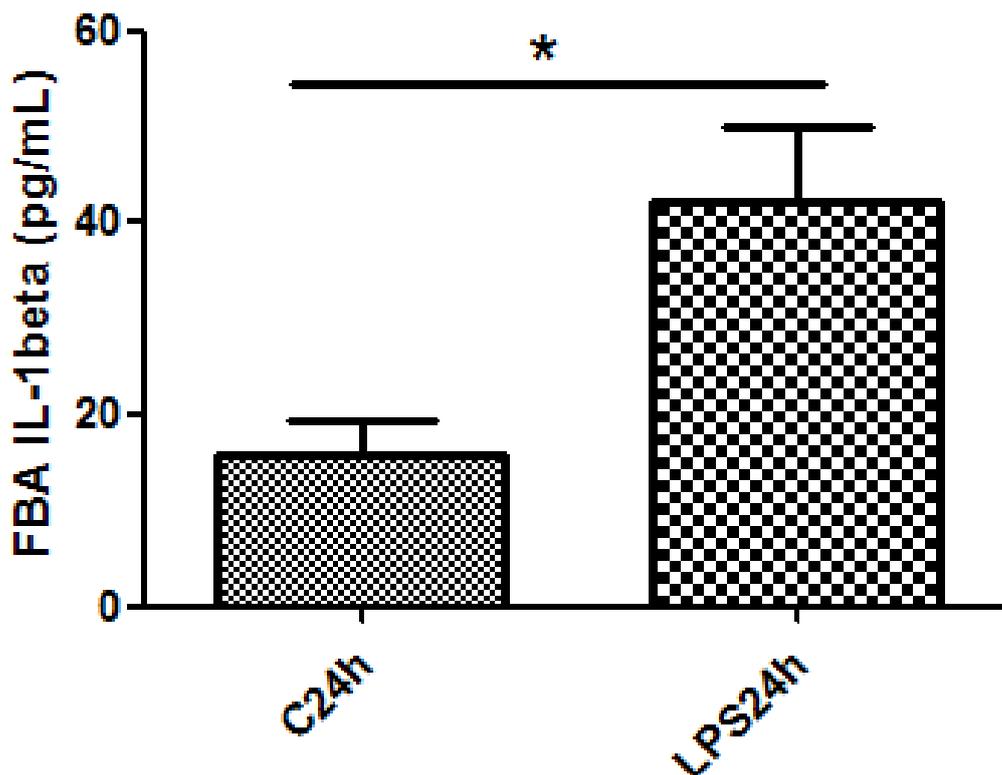
Linfócitos B

São assim chamados por terem sido inicialmente estudados na bursa de Fabricius, um órgão das aves. São responsáveis pela imunidade humoral. Produzem imunoglobulinas, chamadas de anticorpos, contra antígenos estranhos. Para serem ativados, outras células como por exemplo o macrófago lhe apresentam fragmentos de antígenos. Os linfócitos B ativados se transformam em plasmócitos. Os plasmócitos possuem em sua vesícula de Golgi capacidade de produzir anticorpos em massa. Os linfócitos B são responsáveis por uma modalidade de defesa chamada Imunidade Humoral. Não formam clones. Cada vez que detectam a presença de agentes com antígenos estranhos, transformam-se inicialmente e células maiores chamadas plasmoblastos. Estas, então, passam a formar centenas de células chamadas plasmócitos. Cada plasmócito produz e libera na circulação, a cada segundo, milhares de moléculas protéicas de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são especificamente formadas com a capacidade de detectarem e aderirem-se a cada estrutura portadora daqueles mesmos antígenos detectados por suas células produtoras (55).

Com relação aos Linfócitos observou – se também a triplicação do processo inflamatório, alcançando o objetivo. Como também podemos observar após a estimulação do LPS os neutrófilos aumentaram consideravelmente dando início ao processo de inflamação

4.2. Níveis de proteínas totais e citocinas no LBA

Gráfico – 5 Interleucina 1 (IL -1)



Os monócitos e macrófagos são a principal fonte de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β , enquanto os queratinócitos produzem IL-1 α . Outros tipos celulares podem produzir IL-1, como células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T(10). Macrófagos infectados por vírus produzem grandes quantidades de IL-1g. A síntese de IL-1 pode ser induzida por TNF- α IFN- α β e g, LPS, vírus e antígenos(11).

As formas α e β da IL-1 têm atividades semelhantes, entretanto, uma terceira forma descrita, a IL-1g, também chamada antagonista de receptor de IL-1, é um inibidor competitivo, bloqueando os efeitos da IL-1(11). Uso de IL-1g pode prevenir efeitos maléficos da IL-1. As ações da IL-1 (α e β) podem ser diretas ou através de mediadores, como PGE₂, CSF's, IL-6 e IL-8(12).

As atividades biológicas primordiais da IL-1 incluem a estimulação de células CD4+ a que secretam IL-2 e produzam receptores para a IL-2; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células

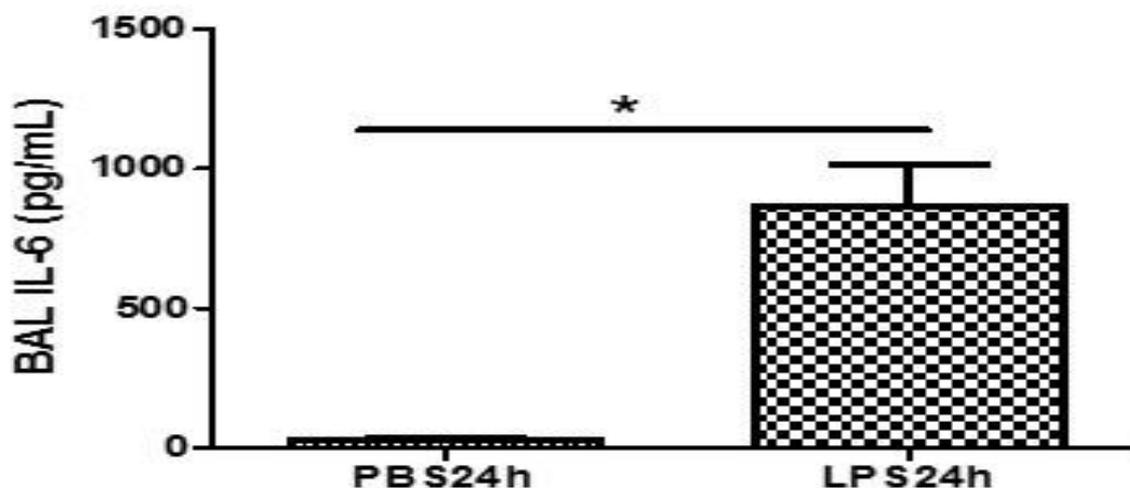
endoteliais, aumenta a atividade de coagulação, tendo participação na gênese da coagulação intravascular disseminada^{10, 11}. A IL-1 também estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda de inflamação. Ainda estimula a hematopoese, tanto por atuar na própria célula primordial quanto por aumentar a liberação de CSF's, tendo ação sinérgica a estes. Pode ser utilizada com a finalidade de aumentar a hematopoese¹².

A IL-1 β atua no hipotálamo, exercendo a função de pirógeno endógeno; origina ainda uma alça de inibição da sua própria produção, pois estimula a liberação de CRH pela hipófise posterior. CRH atua na hipófise anterior fazendo com que haja liberação de ACTH, o qual estimula a região fasciculada do córtex da adrenal, aumentando a produção de corticosteróides, os que irão inibir a síntese primária de IL-1 e são responsáveis pela hiperglicemia em pacientes diabéticos com processo infeccioso. Também atua aumentando a atividade de osteoclastos e adipócitos, sendo grande responsável pelo emagrecimento e tendência a fraturas de pacientes com processos infecciosos crônicos¹³.

Sabe – se também que IL1 citocina pró- inflamatória e age na elevação da temperatura , nos vasos sanguíneos induzindo a vasodilatação por ativação do PAF, PG, NO têm uma meia vida efêmera e seus níveis diminuem rapidamente.

Como mostra o gráfico houve um aumento considerável após 24 horas de inflamação duplicando seus valores referenciais.

Gráfico 6 – Inetrleucina – 6 (IL – 6)



A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa).(113) A IL-6 se constitui em importante marcador inflamatório. É uma citocina envolvida numa série de atividades imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado, estando envolvida na regulação metabólica da própria PCR. Tal como o seu receptor (gp130), é amplamente expressa durante a reação inflamatória, produzindo efeitos indesejáveis em vários órgãos.(114)

A IL-6 normalmente é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes. Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o estrógeno e a testosterona. Após a menopausa ou andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse.(115)

A própria hiperglicemia característica da intolerância à glicose tem relação com a síntese imediata de marcadores como IL-6, com variações dos níveis séricos positivamente relacionados e com aumentos mais significativos na hiperglicemia em pulsos, situação comum no diabético.(113) Propôs-se que o aumento da idade associado à elevação sérica da IL-6 é responsável por algumas das mudanças fenotípicas da idade avançada, especialmente aquelas relacionadas à doença inflamatória crônica (diminuição da massa corporal magra, osteopenia, anemia, diminuição da albumina e de colesterol e aumento de proteínas inflamatórias, como

PCR). Além disso, o aumento da idade associado à IL-6 tem sido vinculado a doenças linfoproliferativas, mieloma múltiplo, osteoporose e doença de Alzheimer.(115)

A IL-6 desempenha papel importante no processo de ruptura ou erosão da placa de aterosclerose e tem seus valores séricos aumentados nesses eventos.(113) Esse aumento pode estar relacionado ao aumento da PCR, já que a IL-6 promove a síntese hepática desse marcador, porém também a PCR tem seu efeito aterogênico mediado em parte pela síntese de IL-6 (116).

Trata-se de um forte marcador independente do aumento da mortalidade por doença coronariana aguda (DCA), prestando-se também à identificação de pacientes que se beneficiam de uma estratégia invasiva precoce.(117) Em homens aparentemente saudáveis, níveis elevados de IL-6 estão associados ao risco aumentado de futuras isquemias miocárdicas.(118)

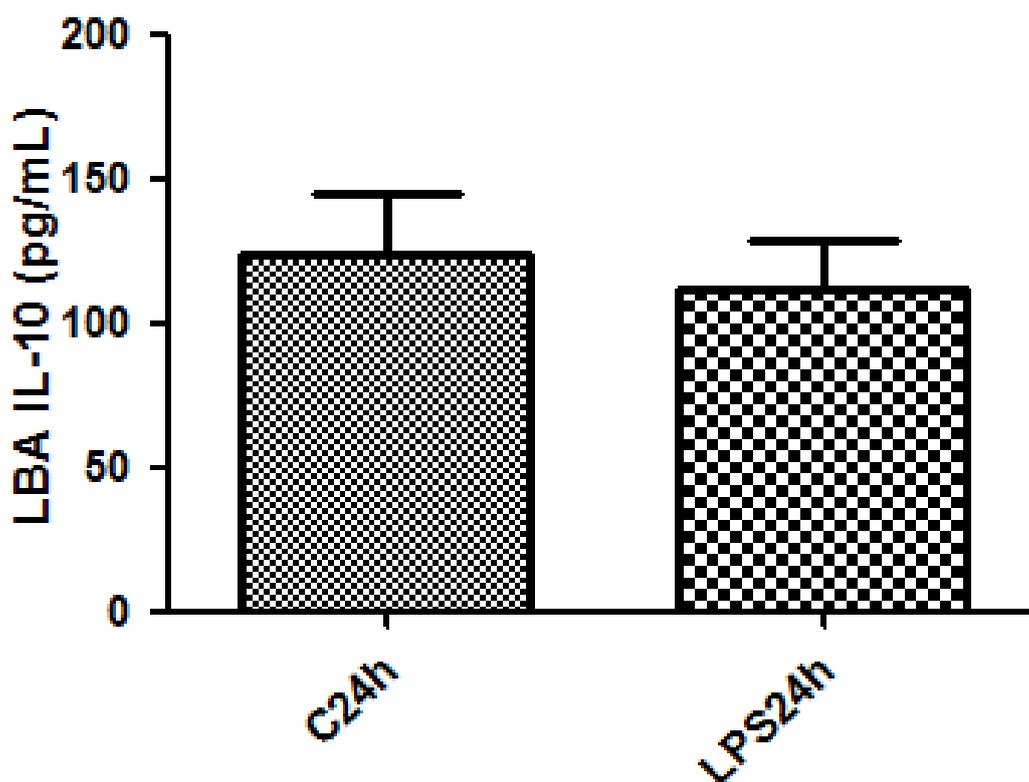
Os marcadores inflamatórios já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da doença aterosclerótica e são úteis na predição do elevado risco cardiovascular entre os indivíduos de meia-idade. O estudo JUPITER demonstra o papel dos níveis de proteína C-reativa como um importante fator de risco cardiovascular em população saudável.(119) Entretanto alguns estudos importantes contestam a associação de valores elevados da PCR com fatores de risco cardiovascular.(110,111)

Pesquisa incluindo apenas idosos mostrou que a PCR e o fibrinogênio podem não ser tão úteis quanto a IL-6 e o TNF-alfa. Nos pacientes com ≥ 65 anos, a IL-6 e TNF- α têm se mostrado bons preditores de desfechos cardiovasculares.¹²⁰ Trabalho anterior havia avaliado o tempo para a estabilização da placa aterosclerótica nas síndromes coronarianas agudas (SCA), utilizando-se marcadores inflamatórios como PCR, TNF-alfa, fibrinogênio e IL-6, e concluiu quanto ao prognóstico que, dentre os marcadores analisados, somente a IL-6 se correlacionou de maneira significativa e independente com o surgimento de eventos cardiovasculares futuros.¹¹³ Esse trabalho observou ainda que fibrinogênio e o TNF-alfa não foram úteis na avaliação da estabilização da placa, pelo fato de não se elevarem significativamente em relação ao grupo-controle. O padrão genético relacionado a IL-6 também denota importância prognóstica para DCV. Estudo recente, realizado no Brasil, demonstrou que o gene IL-6 é inequivocamente associado com várias características compatíveis com o risco cardiovascular em idosos aparentemente saudáveis do sexo feminino.¹¹⁴ De acordo com o mesmo estudo, a homozigose dominante

apresenta efeito mais deletério, e em contrapartida, a homozigose recessiva apresenta efeito mais vantajoso.

Ainda não há consenso sobre métodos de dosagem e valores de referência para a IL-6 quando se observam os diversos trabalhos que utilizaram esse marcador e que foram pesquisados nesta revisão. A utilização rotineira das dosagens de citocinas, como a IL-6 e outros marcadores de atividade inflamatória como a PCR, ainda depende de mais observações, pois estas são metodologias de custo mais elevado. A *American Heart Association* e o Centro Americano de Controle de Doenças recomendaram, em 2002, que se solicitassem os marcadores inflamatórios, especialmente a PCR, por possuir maior disponibilidade de métodos de dosagem para melhorar a predição de eventos coronarianos entre pacientes com risco intermediário pelo escore de risco de Framingham.¹²²

Gráfico 7 Interleucinas -10 (IL – 10)



A IL-10 é uma citocina muito estudada e conhecida principalmente por seu papel regulador em diversos modelos de infecção e inflamação (91, 92, 93). Ainda não está claro o papel da IL-10 durante a infecção por vírus influenza em modelo murino. Diferentes trabalhos têm demonstrado diferentes fenótipos durante a infecção por

vírus influenza, o que torna difícil a definição do papel de IL-10 neste modelo. Camundongos deficientes para a produção de IL-10 sobrevivem por mais tempo após infecção por influenza (94), e o bloqueio de IL-10R pode reduzir o período de sobrevivência dos camundongos infectados (95). Todavia é razoável supor que a IL-10 deve ter papéis diferentes em diferentes fases da infecção por influenza.

Um trabalho publicado recentemente, por Yueh-Chia He e colaboradores mostra como a citocina IL-10 produzida por células Th1 induz a proliferação celular e a inflamação durante a fase inicial da infecção pelo vírus influenza em camundongos. Evidencia também como esta citocina assume papel regulatório em fases mais tardias neste modelo (96).

Sabe-se que a neuraminidase produzida pela maquinaria viral é capaz de induzir a secreção de TGF- β , citocina também conhecida por seu papel regulatório e protetor (97). Com o uso de camundongos transgênicos, cujas células TCD4 possuem TCR específico para Hemaglutinina do vírus influenza, Yueh-Chia He e colaboradores mostraram que a atividade da enzima neuraminidase foi reduzida pela presença da IL-10 produzida por estas células. Como consequência, foram produzidas quantidades significativamente menores de TGF- β no pulmão dos camundongos na presença de IL-10 comparados aqueles cujo citocina foi ausente durante a fase inicial da infecção, o que levou ao aumento do fenótipo Th1 em células TCD4 específicas. Em fases mais tardias, quando o vírus é eliminado, a atividade da neuraminidase cessa e os receptores para IL-10 (IL-10R) aumentam na superfície das células TCD4 específicas, então a citocina atua regulando a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN, TNF e IL-2 nestas células (Yueh-Chia He et al).

O papel ambíguo da IL-10 indica a necessidade de estudos funcionais mais detalhados em outros modelos, especialmente os que utilizam seu papel regulador e anti-inflamatório em testes terapêuticos, uma vez que ela pode funcionar como indutora da inflamação.

Gráfico 8 – Interleucina – 17 (IL -17)



Gráfico 8 Interleucina -17

Em 1995, Yao et al. descreveram pela primeira vez a IL-17 humana, que é produzida principalmente por células Th CD4+ ativadas. Ela estimula a secreção de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) pelos fibroblastos humanos e aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)(83).

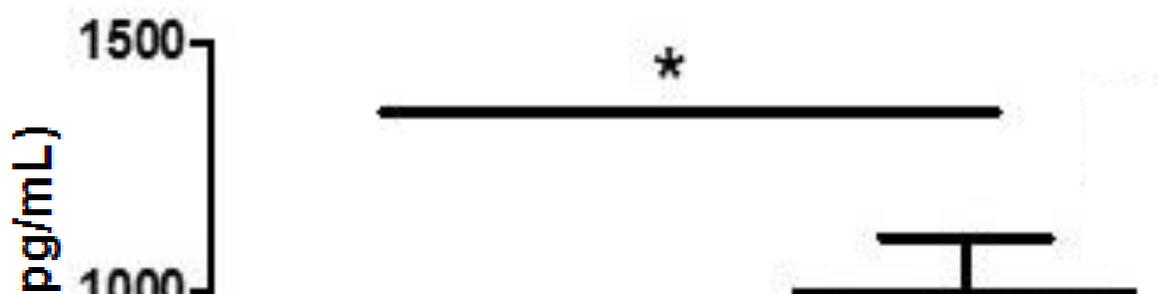
Posteriormente, os receptores de IL-17 de camundongos e humanos (IL-17RA) foram clonados; IL-17RA é considerado o receptor para IL-17 e tem elevada e distinta expressão em comparação a outros receptores de citocina(74,75).

A família IL-17 inclui sete membros (IL-17 ou IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-25, IL-17F, e o homólogo viral vIL-17 ou ORF13), e até o presente cinco diferentes receptores foram descritos(79).

Vários trabalhos propõem um papel para IL-17A na proteção contra bactérias e fungos extracelulares, devido a sua capacidade de recrutar neutrófilos para áreas infectadas. Todavia, logo ficou evidente que IL-17 participa na patologia de vários modelos de doença autoimune, tais como encefalomielite e artrite autoimunes(91-110).

Porém, a grande revolução na pesquisa de IL-17 ocorreu em 2000, quando Infante-Duarte et al. propuseram que esta interleucina não fosse classificada como uma citocina derivada de Th1 ou Th2, mas como uma nova linhagem de células-T que produzem IL-17A, como é mostrado na figure 1. Este conceito modificou o paradigma já estabelecido sobre Th1-Th2, levando à definição do novo subtipo de células Th17, e ofereceu novas perspectivas para o estudo de várias doenças imunológicas e mecanismos de regulação de células-T. O subtipo de células Th17 é composto por células que secretam IL-17 e expressam o fator de transcrição órfão gama relacionado a RAR (ROR γ t)(111,112). Em resumo a IL -17 induz a secreção IL -8 permitindo o recrutamento dos neutrófilos e parece que tem um papel importante no curso de infecções de bactérias extra celulares como a *Klebsiella pneumoniae* ou leveduras como *Candida albicans*

Grafico 9 - Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF – α)



Sintetizado principalmente por macrófagos, sendo que monócitos, neutrófilos, células T e NK, após estimulação por LPS, também o sintetizam. A produção é estimulada por IFN, IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocom-plexos, inibidores da cicloxigenase e PAF. A produção é inibida por ciclosporina, dexametasona, PGE₂, IL-6 e antagonistas do PAF. TNF- α e TNF- β ligam-se aos mesmos receptores no início, mas intracelularmente, após a endocitose deste complexo, exercem atividades distintas.

A principal atividade biológica do TNF é uma acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral importantíssima. É o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas(116,117).

As demais ações do TNF são semelhantes às da IL-1. As alterações endoteliais, principalmente a perda da função de diminuição de coagulação, a atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos são ações do TNF compartilhadas com a IL-1. Tem também atividade de pirógeno endógeno, aumenta a reabsorção óssea, a atividade de adipócitos e a expressão de MHC-I e II. Diferentemente da IL-1, o TNF não tem ação em córtex da adrenal.

Estimula a produção de IL-6 fazendo com que os hepatócitos produzam proteínas da fase aguda da inflamação (116,117).

Altas concentrações de TNF no sangue de pacientes com septicemias correlacionam-se com a piora do prognóstico¹⁸. Em animais de laboratório, injeções de TNF, mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante ao choque séptico, sugerindo uma importante ação deletaria quando sintetizado em quantidades excessivas¹⁸.

O TNF também pode ser útil no tratamento de neoplasias secundárias a AIDS, principalmente no sarcoma de Kaposi. Injeções intralesionais ou sistêmicas são aplicadas, havendo certa regressão da neoplasia. Receptores solúveis de TNF (sTNF-R1) podem ser utilizados como adjuvante na terapêutica convencional^{19,20}

Gráfico 10 Fator Nuclear Kappa B (NF-kB)

0.020

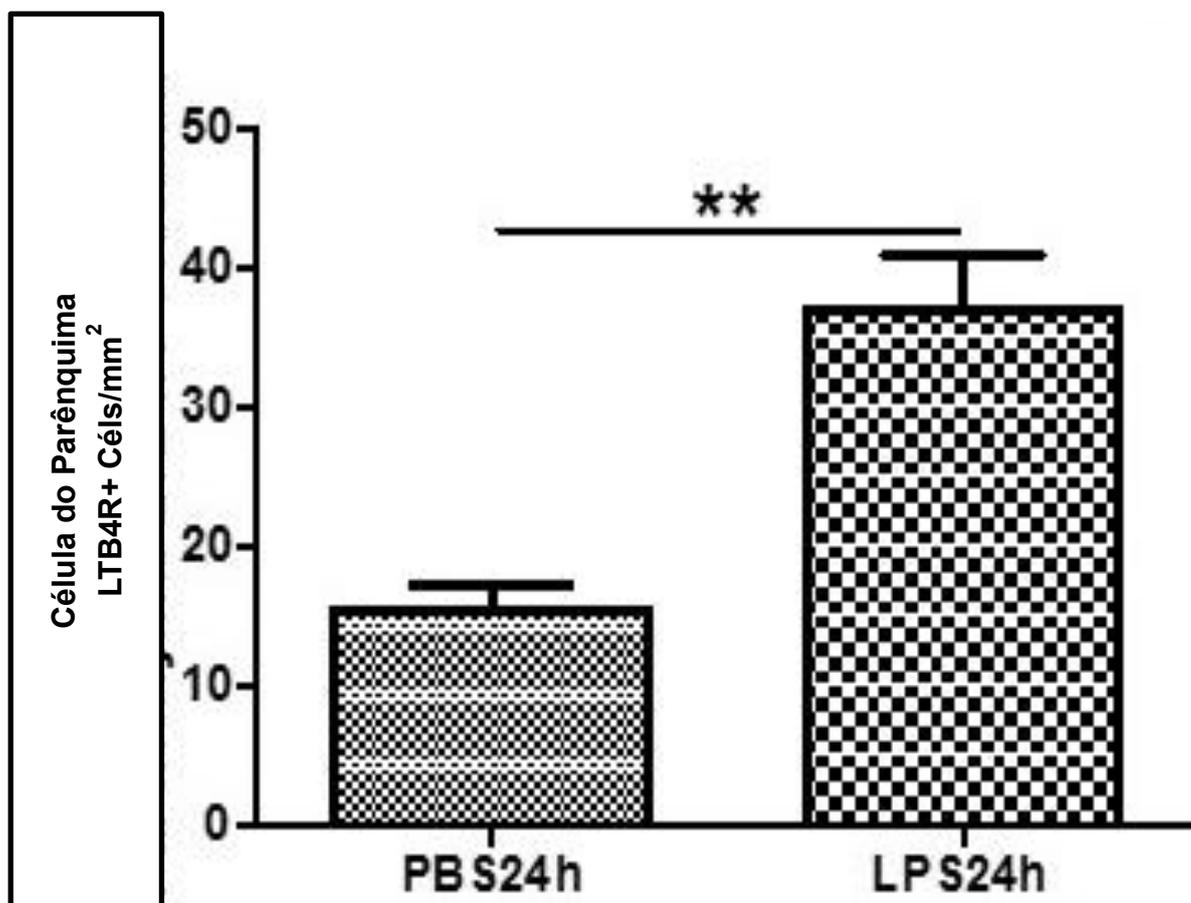
*

O Fator Nuclear Kaapa beta (NF κ B) foi descrito por Sen e Baltimore em 1986 (112) como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente sabe-se também que este fator também envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta imunoinflamatória, entre outros genes envolvidos na apoptose e na transformação neoplásica celular. Alguns genes cuja expressão é controlada pelo NF κ B estão descritos na literatura, dentre eles os mais conhecidos são: fator de crescimento (GM-CSF), moléculas de adesão celular, MAd-CAM-1, ELAM-1, VCAM, citocinas IL 1,2,6,8, TNF α e β , anti-apoptóticos, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2, dentre outros.

O NF κ B pode ser ativado por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias com o TNF α e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento de fatores indutores do estresse.

Papel do NF – κ B livre promove a regulação da expressão de múltiplos genes envolvidos nas respostas inflamatórias, incluindo moléculas de adesão como: ICAM – 1 e VCAM – 1 , E-seletina , enzimas como a COX -2, 5- LO , c PLA, e a INOS e a maior parte faz citocinas IL - 1β , TNF – α , GM e G- CSF e quimosinas como a IL – 8 , RANTES, MCP -1 , MIP- κ e eotaxina (115 , 117). Atualmente esta bem relatado na literatura que o NF – κ B é um dos reguladores mais importantes de expressão de genes pró – inflamatórios . Como por exemplo a ativação da expressão do cicloxigenase2 (Cox – 2),que é uma enzima essencial para produção de prostaglandinas e tromboxanas no processo inflamatório, e muito dos elementos moleculares envolvidos em várias doenças como a artrite reumatoide , asma , sinusite entre outras.

Grafico 11– Leucotrieno (LTB4R)



Os LTs assim como as PGs também são moléculas derivadas do AA, porém por ação das enzimas lipoxigenases 5 (LO-5), 12 (LO-12) e 15 (LO-15) em conjunto com uma proteína auxiliadora, a 5-LO-activating protein (FLAP), sendo que a LO-5 é responsável pela síntese de LTB₄ e a LO-12 e LO-15 são responsáveis pela síntese de lipoxinas A₄ (LXA₄). Esses metabólitos são formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em leucotrieno A₄ (LTA₄). Este, por sua vez, é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando leucotrieno B₄ (LTB₄) ou então receber um resíduo de glutatona gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ dá origem ao leucotrieno D₄ (LTD₄) e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o leucotrieno E₄ (LTE₄). Eles estão divididos em duas classes: o LTB₄ que é o mais potente mediador quimioatraente e o cisteinil-leucotrieno (Cys-LT) LTC₄, LTD₄ e LTE₄ que são poderosos agentes espasmogênicos (128). Para exercer as suas funções biológicas esses mediadores lipídicos ligam-se à

receptores específicos: BLT1 e BLT2, e CysLT1 e CysLT2, respectivamente (129-132). Essa ligação é mediada pela proteína G (133,134).

Diferentemente das PGs, os LTs são predominantemente sintetizados em leucócitos, principalmente em granulócitos, monócitos/macrófagos, mastócitos e DCs 135. Os mastócitos e os eosinófilos sintetizam principalmente cysLTs, e os neutrófilos, os macrófagos e as DCs secretam LTB₄ 136

Os LTs foram identificados inicialmente como potentes agentes estimuladores da quimiotaxia e adesão de leucócitos às células

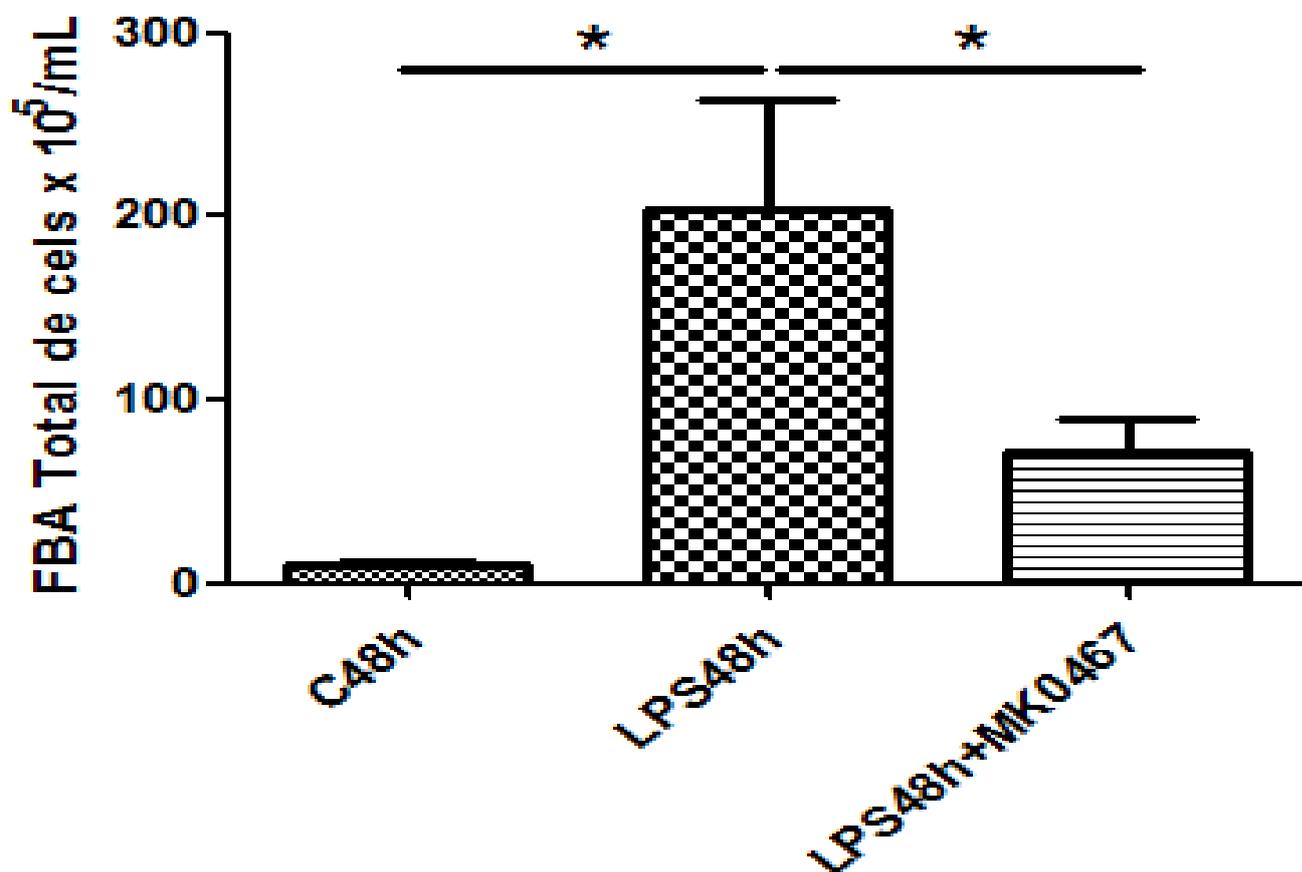
endoteliais, com consequente aumento da migração de neutrófilos 130-137

No entanto, várias outras funções moduladoras tanto sobre a resposta imune inata, quanto sobre a adaptativa tem sido atribuídas a esses mediadores nos últimos anos 137

Nesse sentido, os neutrófilos, os monócitos e os macrófagos produzem LTs, ao mesmo tempo em que respondem a esses mediadores. O LTB₄ induz o recrutamento de macrófagos e monócitos ¹³⁸, produção de TNF- α 139 e redução de MCP-1 por monócitos 140.

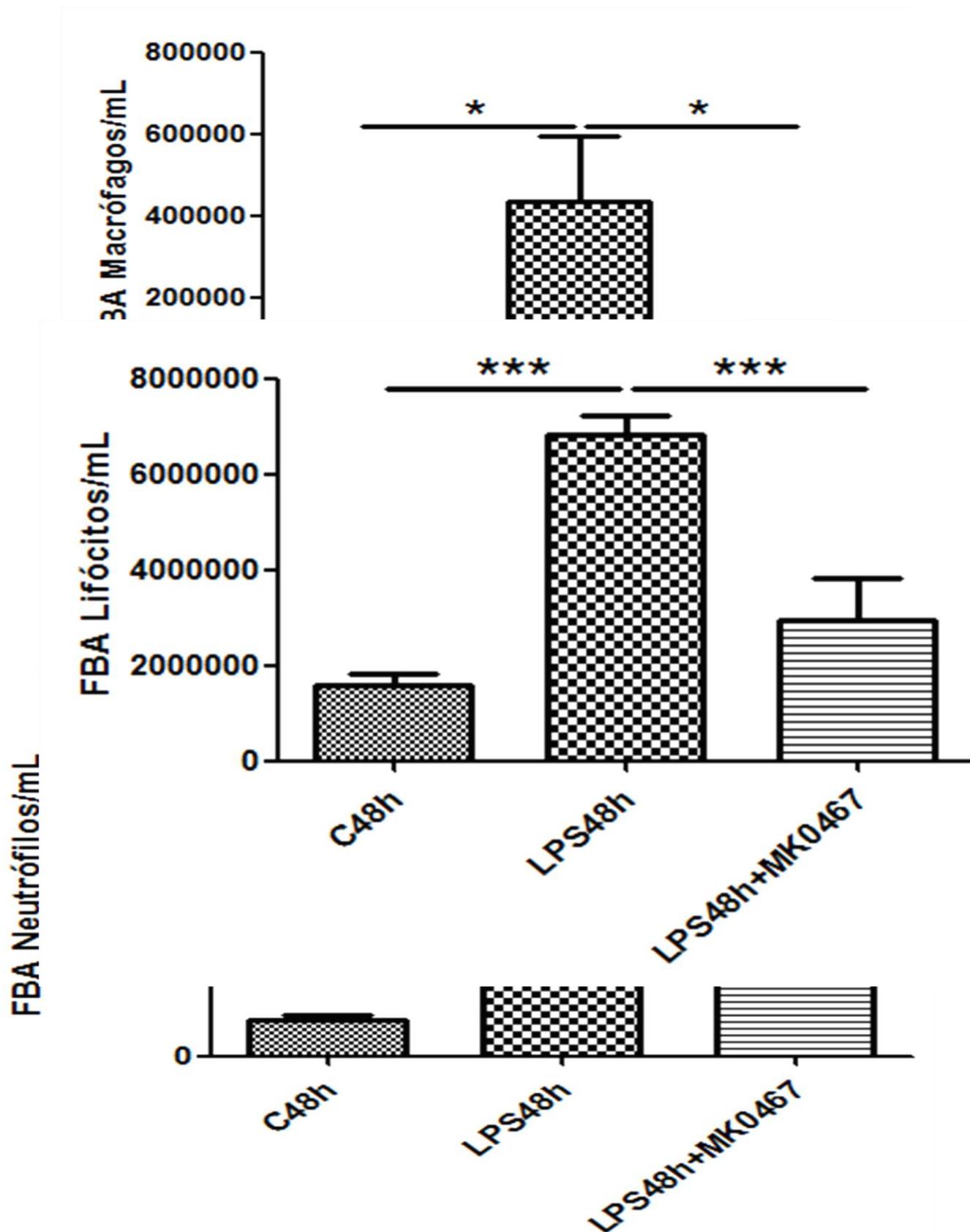
4.2 Contagem Total e Diferencial em LBA CONTROLE 48h vs LPS 48h vs LPS 48h + MK 0476

Gráfico 12 Avaliação gráfica do fluido broncoalveolar : controle 48 horas, indução inflamatória por LPS num período de 48 horas e uso de MK 0476 com inflamação induzida após 48 horas



Quando houve o estímulo com LPS após 48 horas observou – se que o processo inflamatório em evolução apresentou e posterior adição de MK 0476 vimos que a inflamação regrediu sensivelmente, referendando que a ação anti-inflamatória estava ocorrendo adequadamente.

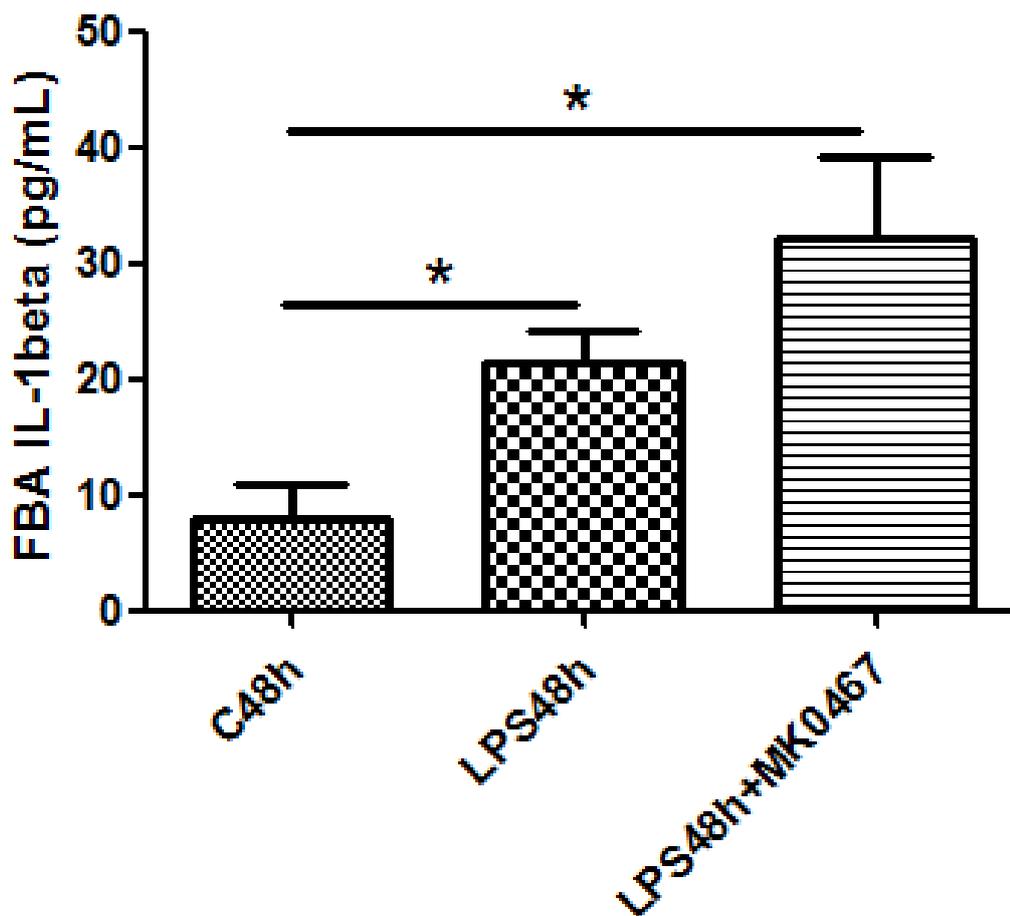
Gráfico 13 Avaliação dos Macrófagos , Neutrófilos e Linfócitos comparativamente



Avaliação gráfica do fluido bronco alveolar: enter os macrófagos, neutrófilos e linfócitos em controle 48 horas, indução inflamatória por LPS num período de 48 horas

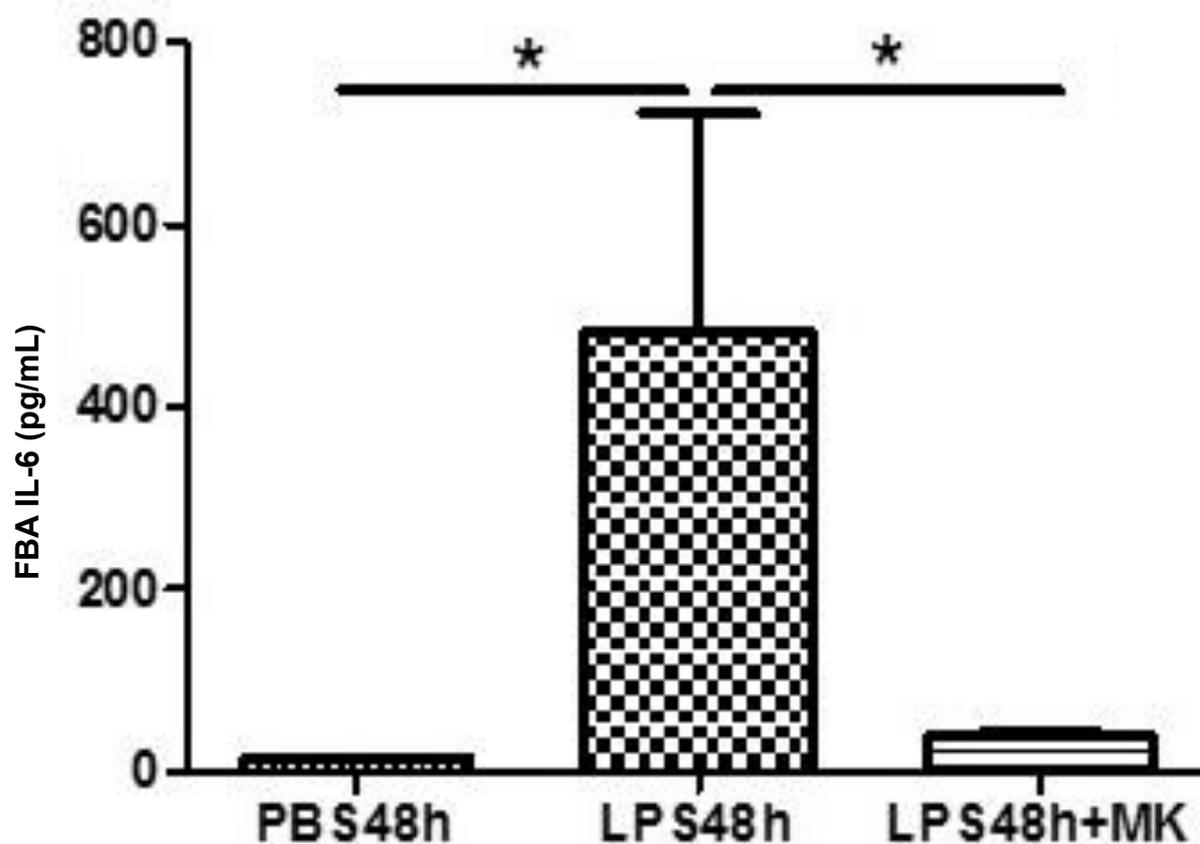
e uso de droga inibidora MK 0476 com inflamação induzida após 48 horas. Nota-se que após a introdução da droga houve uma significativa queda, praticamente retomando a homeostasia do tecido, corroborando com a ação anti-inflamatória do inibidor de leucotrieno.

Gráfico 14 – Interleucina 1 β (IL 1 β)



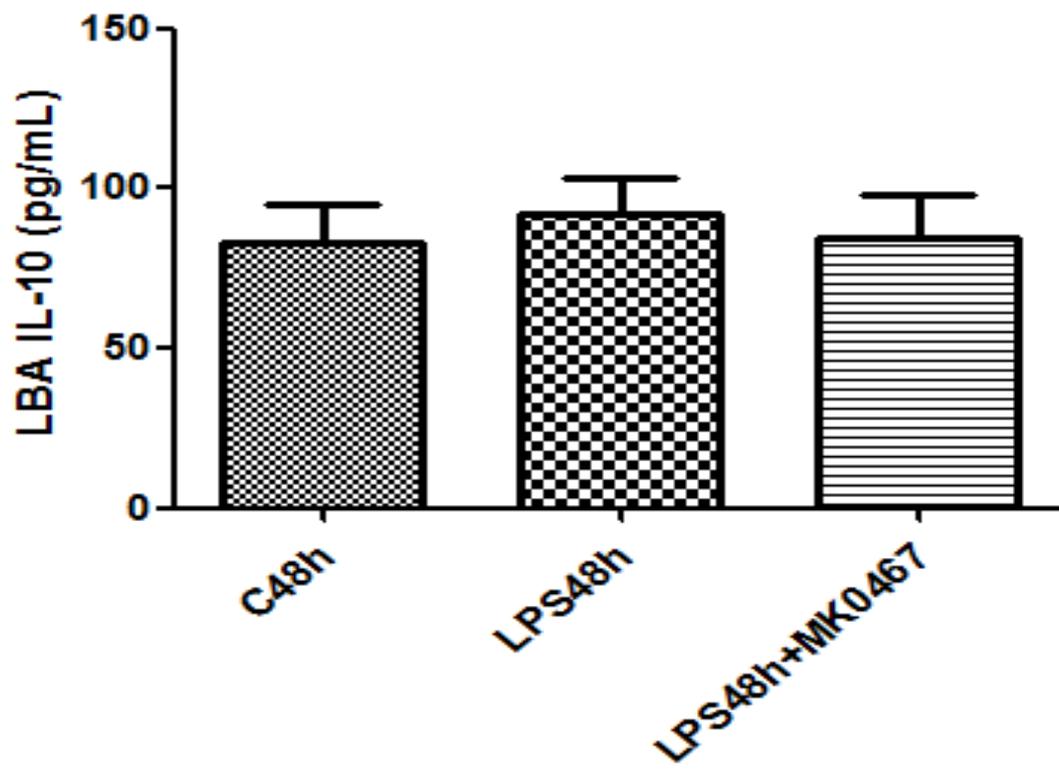
A IL 1β é um importante mediador na resposta inflamatória e também é uma citocina pró-inflamatória e age na elevação da temperatura, nos vasos sanguíneos induzindo a vasodilatação por ativação do PAF, PG, NO, têm uma meia vida efêmera e seus níveis diminuem rapidamente. Provavelmente não uma redução acentuada em decorrência de sua volatilidade.

Gráfico 15 - Interleucina -6 (IL - 6)

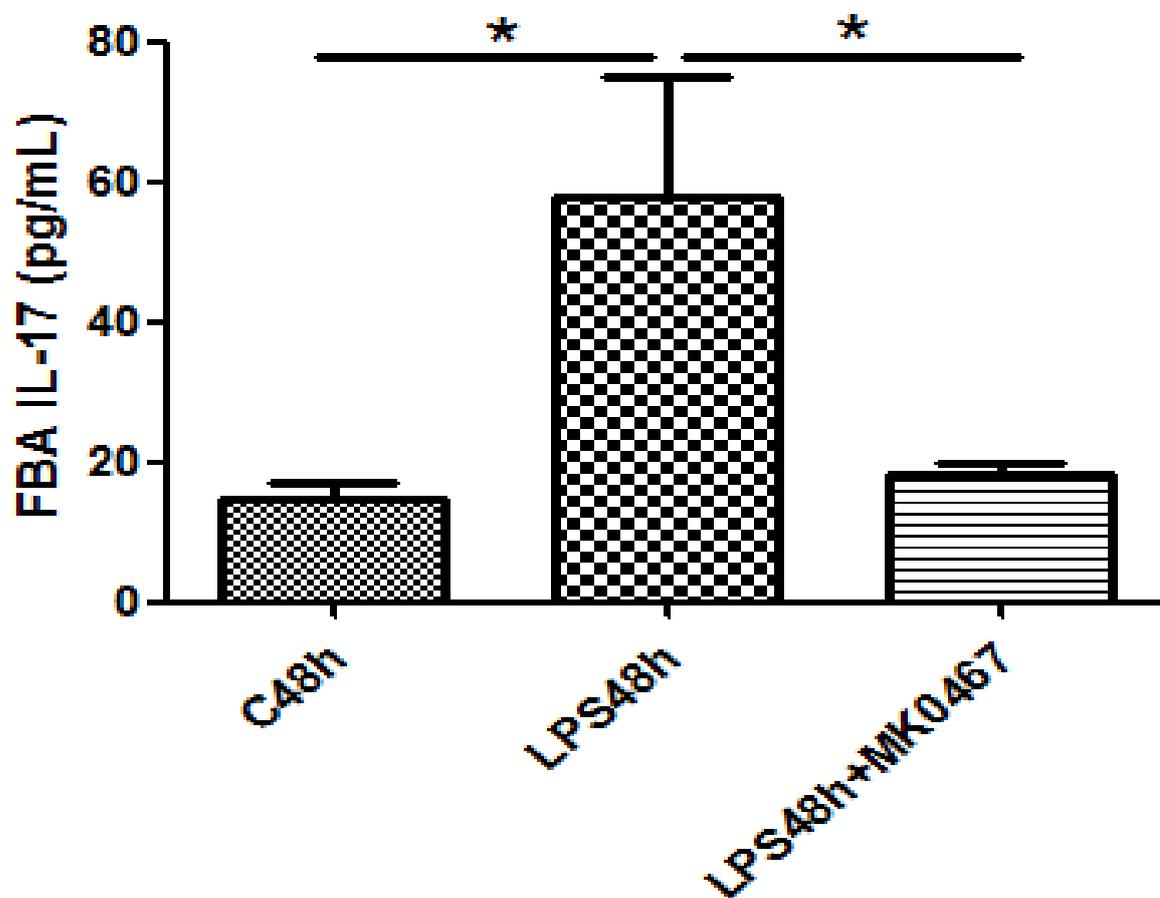


Este gráfico apresenta uma redução muito acentuada pois voltando quase ao nível do controle corroborando com a ação anti-inflamatória do MK 0476, visto que com a ação do LPS houve um aumento de cerca de 500 pg/mL

Gráfico 16 - Interleucina 10 (IL -10)

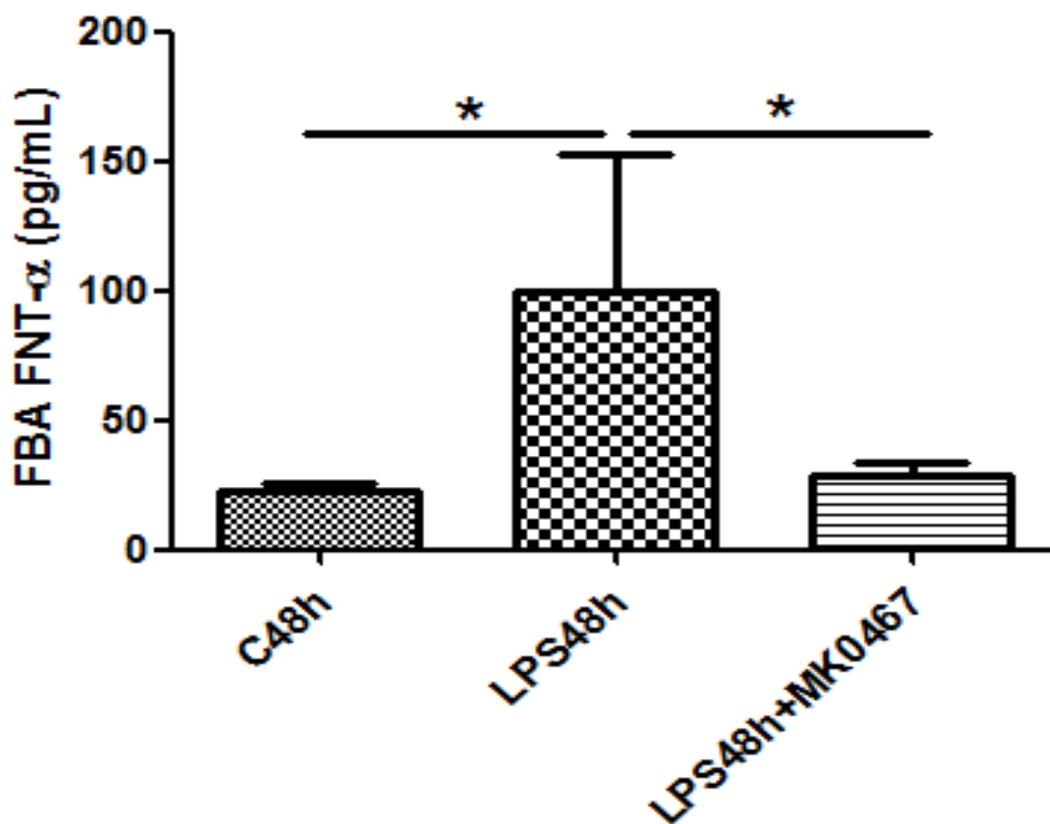


Nessa análise praticamente não houve melhora com a indução do MK 0476, pois essa citocina é um inibidor de macrófago ativado, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata da principalmente da imunidade celular.



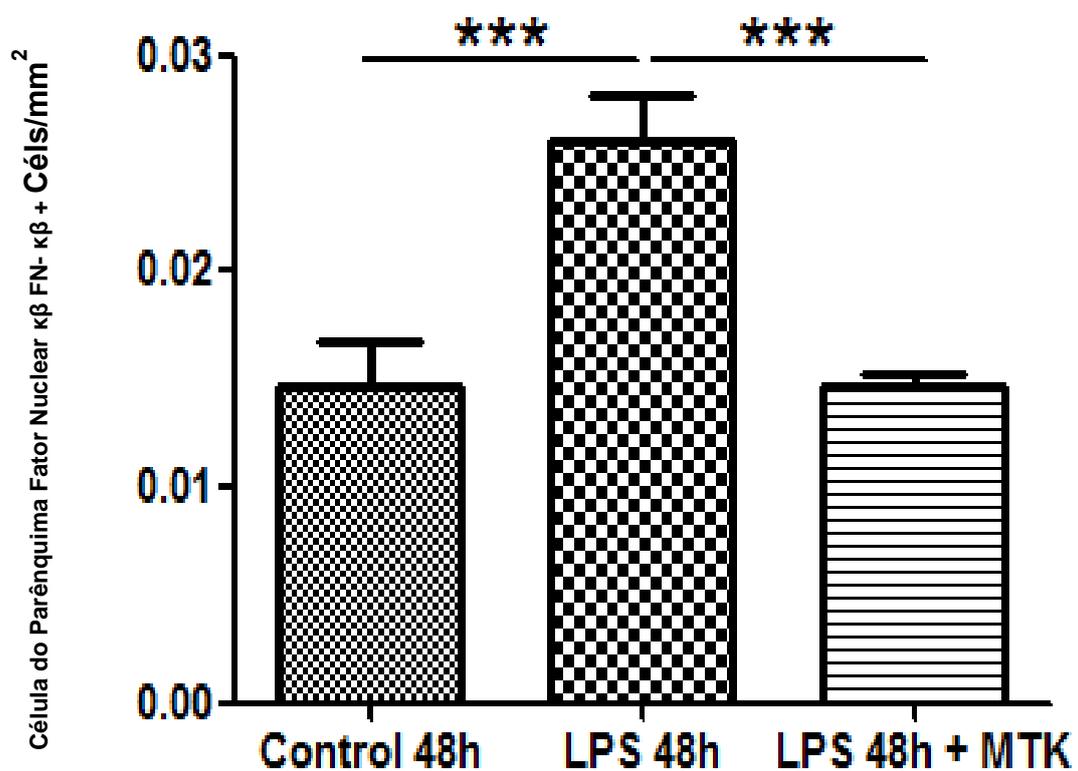
A IL -17 apresentou uma importante ação inflamatória e quando adicionado o MK 0476 houve uma regressão chegando quase aos limites do controle, confirmando mais uma vez a ação anti – inflamatória do inibidor de leucotrieno na SARA.

Gráfico 18 – Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF – α)



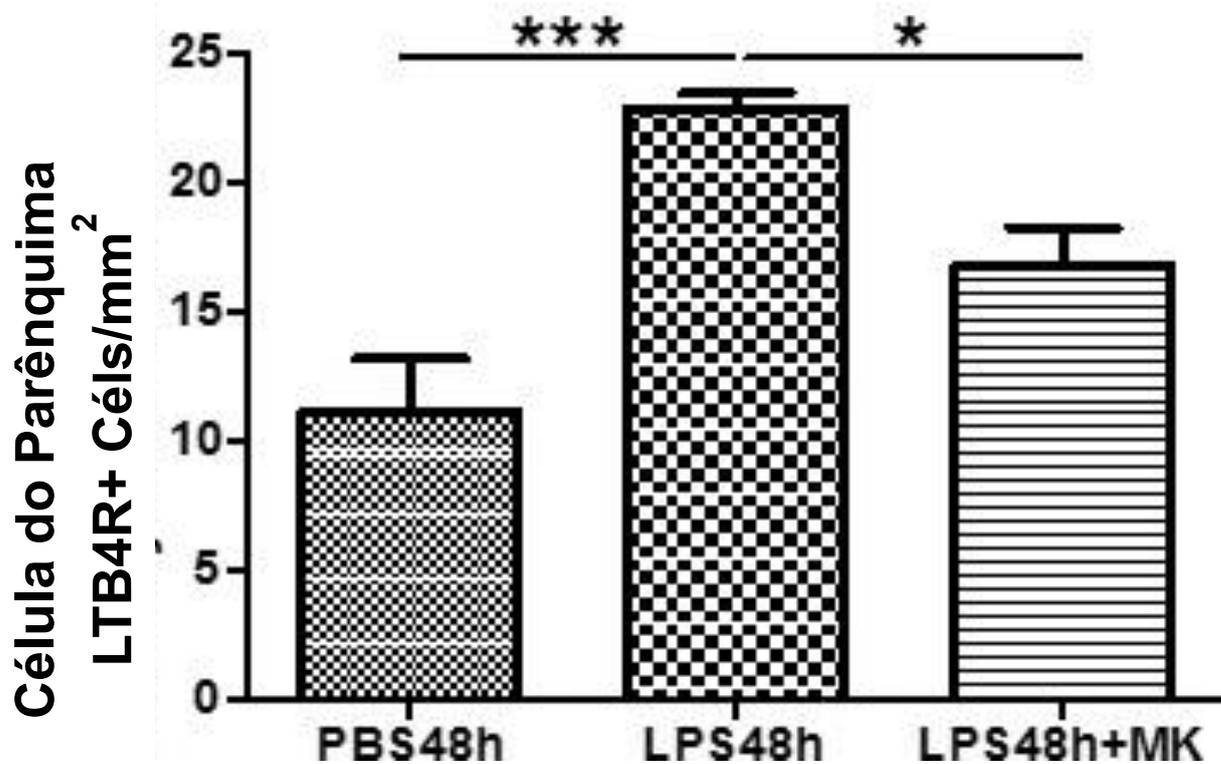
Mais uma vez a ação anti – inflamatória do MK 0476 esteve presente fazendo com que houvesse praticamente a normalização no fluido bronco alveolar devido ao LPS

Gráfico 19 – Fator Nuclear Kappa B (NF-kB)



O MK 0476 apresentou novamente uma ação anti – inflamatória , pois com o advento do aumento do LPS o inibidor de leucotrieno mais uma vez se fez presente melhorando o quadro infamatório

Gráfico 20 – Leucotrieno (LTB 4 R)

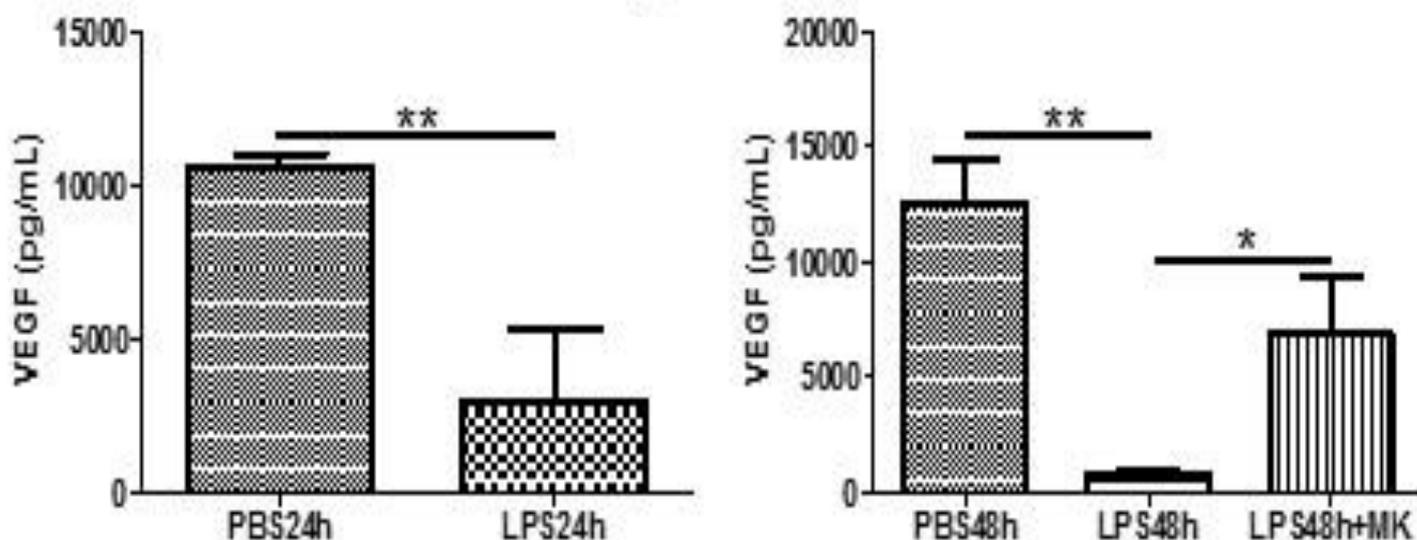


A ação anti – inflamatória também se fez presente fazendo com que os níveis da ação do LPS regredissem

Gráfico 21 - Fator de Crescimento Vascular Endotelial- (VEGF)

CONTROLE 24h vs LPS 24h

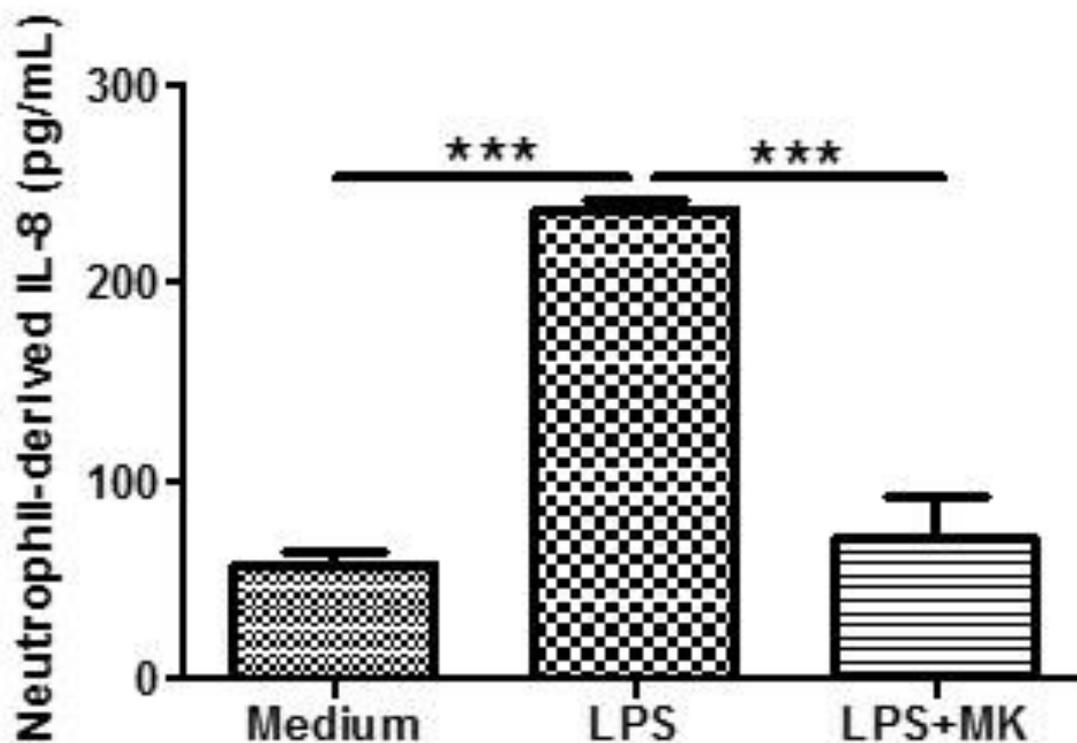
CONTROLE 48h vs LPS 48h vs LPS 48h + MK0476



Níveis de VEGF no homogenato do tecido pulmonar.

Há uma reparação tecidual em processos agressivos em modelos com LPS intraqueal promovendo uma inflamação aguda forte. Temos então uma diminuição da concentração de Fatores de Crescimento do tecido favorecendo a destruição tecidual e a ação do MK 0476 fez com que houvesse um restabelecimento dos níveis de VEGF ocorrendo a reparação tecidual no processo inflamatório como no caso da lesão pulmonar aguda .

Gráfico 22 – Cultura celular e verificação dos níveis de IL-8



MK-0476 suprimiu produção de níveis de IL-8 para neutrófilos humanos estimulado com LPS. Níveis de IL-8 em sobrenadante de neutrófilos foram mensurados usando ELISA. Os resultados foram expressados com significancia \pm SEM. *** $p < 0.001$ comparado com não estimulado e estimulado com LPS e ambos estimulado com LPS e LPS + MK-0476.

Conclusão

O efeito do MK0476 demonstrou ação anti-inflamatória importante em modelo experimental de SDRA praticamente com todas as citocinas estudadas; durante a realização deste projeto permitindo que, futuros estudos clínicos como terapia adjuvante na SDRA possam ser realizados para diminuir a incidência da mortalidade em casos de pneumonia ou sepse que evoluam para a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.

Além disso, essa premissa ganha importância especial uma vez que o MK0476 também inibiu a ativação de neutrófilos humanos in vitro, indicando que o MK0476 pode inibir não somente a inflamação neutrófila em modelos animais, mas também em humanos.

6. Referências

1. Laennec, RTH. A treatise on the diseases of the chest: In which they are described according to their anatomical characters, and their diagnosis established on a new principle by means of acoustic instruments. Translated by Forbes. Birmingham, AL: Classics of Medicine Library; 1979.
2. Ibsen B. The anesthetist's viewpoint on treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952. *Proc R Soc Med* 1954;47:72–74.
3. Respirator Lung Syndrome. *Minn Med* 1967;50:1693–1705.
4. Clark LC Jr. Monitor and control of blood and tissue O₂ tensions. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1956;2:41–48.
5. Ibsen B. The anesthetist's viewpoint on treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952. *Proc R Soc Med* 1954;47:72–74. [
6. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517–523. Moss AJ, Kouwenhoven WB, Jude JR, Knickerbocker GG. Closed-chest cardiac massage. *JAMA* 1960;173:1064–1067. [
7. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;29:319–323. [
8. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:720–723.]
9. Bone RC, Francis PB, Pierce AK. Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome. *Am J Med.* 1976;61:585-9.
10. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg.* 1982;144:124-30.
11. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, et al. Adult respiratory distress syndrome: Risk with common predispositions. *Ann Intern Med.* 1983;98:593-7.
12. Raghavendran K, Napolitano LM. Definitions of ALI/ARDS. *Crit Care Clin.* 2011;27:429-37.
13. Donahoe M. Acute respiratory distress syndrome: A clinical review. *Pulm Circ.* 2012;24:192-211.

14. Villar J, Blanco J and Kacmarek RM. Acute respiratory distress syndrome definition: do we need a change? *Curr Opin Crit Care*. 2011;17:13-7.
15. Weil MH, Henning RJ, Morissette M, Michaels S. Relationship between colloid osmotic pressure and pulmonary artery wedge pressure in patients with acute cardiorespiratory failure. *Am J Med* 1978;64:643–650.
16. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, Kariman K, Higgins S, Bradley R, Metz CA, *et al*. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987;317:1565–1570.
17. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, Kariman K, Higgins S, Bradley R, Metz CA, *et al*. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987;317:1565–1570
18. Villar J, Pérez-Méndez L, Kacmarek RM. Current definitions of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome do not reflect their true severity and outcome. *Intensive Care Med*. 1999;25:930-5.
19. Villar J, Pérez-Méndez L, López J, Belda J, Blanco J, Saralegui I, *et al*. An early PEEP/FIO₂ trial identifies different degrees of lung injury in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:795-804.
20. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: A clinical review. *Lancet*. 2007; 369:1553-64.
21. Suntharalingam G, Regan K, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW. Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-month functional recovery in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2001;29:562-6.
22. Desai SR, Wells AU, Suntharalingam G, Rubens MB, Evans TW, Hansell DM. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary injury: A comparative CT study. *Radiology*. 2001;218:689-3.
23. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:766-72.
24. Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lanken PN, Hyzy R, *et al*. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2006;354:1671-84.

25. Croce MA, Fabian TC, Davis KA, Gavin TJ. Early and late acute respiratory distress syndrome: Two distinct clinical entities. *J Trauma*. 1999;46:361-8.
26. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Anzueto A, Alía I, Brower RG, et al. Airway pressures, tidal volumes, and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005;33:21-30.
27. Phua J, Stewart TE, Ferguson ND. Acute respiratory distress syndrome 40 years later: Time to revisit its definition. *Crit Care Med*. 2008;36:2912-21.
28. Ferguson ND, Kacmarek RM, Chiche JD, Singh JM, Hallett DC, Mehta S, et al. Screening of ARDS patients using standardized ventilator settings: influence on enrollment in a clinical trial. *Intensive Care Med*. 2004;30:1111-6.
29. Gowda MS, Klocke RA. Variability of indices of hypoxemia in adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1997;25:41-5.
30. Britos M, Smoot E, Liu KD, Thompson BT, Checkley W, Brower RG, et al. The value of positive end-expiratory pressure and FiO₂ criteria in the definition of the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2011;39:2025-30.
31. Takala J. Hypoxemia due to increased venous admixture: Influence of cardiac output on oxygenation. *Intensive Care Med*. 2007;33:908-11.
32. Cujec B, Polasek P, Mayers I, Johnson D. Positive end-expiratory pressure increases the right-to-left shunt in mechanically ventilated patients with patent foramen ovale. *Ann Intern Med*. 1993;119:887-94.
33. Lemaire F, Teisseire B, Harf A. Assessment of acute respiratory failure: Shunt versus alveolar arterial oxygen difference. *Ann Fr Anesth Reanim*. 1982;1:59-64.
34. Trachsel D, McCrindle BW, Nakagawa S, Bohn D. Oxygenation index predicts outcome in children with acute hypoxemic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:206
35. Glick B, Sato K, Cohenour F. Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. *J Reticuloendothel Soc* 1964;1:442-49.
36. Sabet T, Hsia WC, Stanisiz M, Dxomeiri A, Van Alten P. A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens. *J Immunol Meth* 1977;11:103-10.
37. Qureshi MA, Dietert RR, Bacon LD. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;181:560-8.
38. Trembicki KA, Qureshi MA, Dietert RR. Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols. *Devel Comp Immunol* 1984;8:395-402.

39. Harmon BG, Glisson JR, Nunnally JC. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1992;36:986-91.
40. Qureshi MA, Dietert RR. Bacterial uptake and killing by macrophages. In: 7 -Burleson GR, Dean J, Munson A, editors. *Methods in immunotoxicology*, vol. 2. NY:Wiley-Liss, 1995. p. 119-31.
41. Qureshi MA, Miller L, Lillehoj HS, Ficken MD. Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line. *Vet Immunol Immunopath* 1990;26:237-50.
42. Beug H, Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 1979;18:375-90.
43. Qureshi MA, Marsh JA, Dietert RR, Sung Y-J, Nicholas-Bolnet C, Petite JN. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poult Sci* 1994;73:1027-34
44. Hussain I, Qureshi MA. The expression and regulation of inducible nitric oxide synthase gene differ in macrophages from chickens of different genetic background. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61:317-29.
45. Bombara CJ, Taylor Jr. RL. Signal transduction events in chicken interleukin-1 production. *Poult Sci* 1991;70:1372-80.
46. Cieszynski JA, Qureshi MA, Taylor Jr. RL. Calcium role in chicken IL-1 secretion. *Poult Sci* 1999;78:70-4.
47. Fioretto JR, Ferrari GF, Ricchetti SM, Moreira FL, Bonatto RC, Carpi MF. Síndrome do desconforto respiratório agudo em crianças: incidência, mortalidade e trocas gasosas. *RBTI*. 2001;13:58-62.
48. Ware LB. Prognostic determinants of acute respiratory distress syndrome in adults: impact on clinical trial design. *Crit Care Med*. 2005;33:S217-22.
49. Rubenfeld GD, Caldwell E, Granton JT, Hudson LD, Matthay MA. Interobserver variability in applying a radiographic definition for ARDS. *Chest*. 1999;116:1347-53.
50. Meade MO, Cook RJ, Guyatt GH, Groll R, Kachura JR, Bedard M, et al. Interobserver variation in interpreting chest radiographs for the diagnosis of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:85-90.
51. ABBAS, A.K., Lichtman, A.H. Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed. Saunders, Philadelphia, USA; 2003, p. 243-274.
52. DACIE J.V. & Lewis S.M.- *Practical Haematology*. 8° Edition. Churchill Livingstone. 1995.
53. GOLDSBY, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J., 2003.

54. Immunology(5th ed.). W. H. Freeman and Company, New York, USA. p. 276-298.
55. NIKOLICH, J., Slifka, M. K., Messaoudi, I., 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity *Nature Reviews Immunology*, 4: 123-132.
56. ROITT, I., Brostoff, J. & MALE, D., 2001, Immunology, Mosby, 6th edition, London, 480
57. HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H; PETTIT, J. E.. Fundamentos em hematologia. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 400 p. ISBN 9788536311067
58. ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; POBER, Jordan S.. Imunologia celular e molecular. 6. ed. São Paulo: Revinter, 2008. 564 p. ISBN 9788535222449
59. JANEWAY, Charles A.; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark; CAPRA, J. Donald. Imunobiologia: o sistema imunobiológico na saúde e na doença. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 634
60. RAPAPORT, Samuel I.. Hematologia: introdução. 2. ed. São Paulo: Roca, 1990. 472p
61. Ferguson ND, Meade MO, Hallett DC, Stewart TE. High values of the pulmonary artery wedge pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2002;28:1073-7.
62. National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Schoenfeld D, Wiedemann HP, et al. Pulmonary-artery versus central venous catheter to guide treatment of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2006;354:2213-24.
63. Pinsky MR. Clinical significance of pulmonary artery occlusion pressure. *Intensive Care Med*. 2003; 29:175-8
64. Komadina KH, Schenk DA, LaVeau P, Duncan CA, Chambers SL. Interobserver variability in the interpretation of pulmonary artery catheter pressure tracings. *Chest*. 1991;100: 1647-54.
65. Ferguson ND, Davis AM, Slutsky AS, Stewart TE. Development of a clinical definition for acute respiratory distress syndrome using the Delphi technique. *J Crit Care*. 2005;20:147-54.
66. Fink A, Kosecoff J, Chassin M, Brook RH. Consensus methods: Characteristics and guidelines for use. *Am J Public Health*. 1984;74:979-83.

67. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Aramburu JA, Nájera L, et al. Acute respiratory distress syndrome: underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions. *Crit Care Med*. 2005;33: 2228-34.
68. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alía I, Brochard L, Stewart TE, et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA*. 2002;287:345-55.
69. Meade MO, Guyatt GH, Cook RJ, Groll R, Kachura JR, Wigg M, et al. Agreement between alternative classifications of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:490-3.
70. Moss M, Goodman PL, Heinig M, Barkin S, Ackerson L, Parsons PE. Establishing the relative accuracy of three new definitions of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1995;23:1629-37.
71. Swan HJC, Ganz W, Forrester JS, Marcus H, Diamond G, Chonette D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Engl J Med* 1970;283:447–451
72. Mangialardi RJ, Martin GS, Bernard GR, Wheeler AP, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 2000;28:3137–3145.
73. Weil MH, Henning RJ, Morisette M, Michaels S. Relationship between colloid osmotic pressure and pulmonary artery wedge pressure in patients with acute cardiorespiratory failure. *Am J Med* 1978;64:643–650
74. Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease: different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:3–11
75. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American European consensus conference on ARDS: definitions mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818–824
76. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:293–301.

77. Rotta AT, Kunrath CL, Wiryawan B. O manejo da síndrome do desconforto respiratório agudo. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79:S149-60.
78. Vilar J, Slutsky AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:814-6.
79. Authors/Writing Committee and the Members of the ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome. The Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307:2526-33.
80. GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translational approach. *Swiss Med WKLY.*, v.133, n.43-44, p.586-590, 2003.
81. KISS, J., et al. Antioxidants combined with NO donor enhance systemic inflammation in acute lung injury in rats. *Scand Cardio J.*, v.41, n.3, p.186-191, 2007.
82. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American European consensus conference on ARDS: definitions mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818–824.
83. Fenn WO, Rahn H, Otis AB. A theoretical study of the composition of the alveolar air at altitude. *Am J Physiol* 1946;146:637–653. Available from: <http://ajplegacy.physiology.org/cgi/reprint/146/5/637>.
84. Moss AJ, Kouwenhoven WB, Jude JR, Knickerbocker GG. Closed-chest cardiac massage. *JAMA* 1960;173:1064–1067.
85. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;29:319–323.
86. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:720–723.
87. Villar J, Blanco J and Kacmarek RM. Acute respiratory distress syndrome definition: do we need a change? *Curr Opin Crit Care*. 2011;17:13-7.
88. Ibsen B. The anesthetist's viewpoint on treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952. *Proc R Soc Med* 1954;47:72–74.
89. Swan HJC, Ganz W, Forrester JS, Marcus H, Diamond G, Chonette D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Engl J Med* 1970;283:447–451

90. Zemans RL, Briones N, Campbell M, McClendon J, Young SK, Suzuki T, Yang IV, De Langhe S, Reynolds SD, Mason RJ, Kahn M, Henson PM, Colgan SP, Downey GP. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 20;108(38):15990-5. doi: 10.1073/pnas.1110144108. Epub 2011 Aug 31.
91. Marcelo B. P. Amato; Carlos R. R. Carvalho; Sílvia Vieira; Alexandre Isola; Vivian Rotman; Marcelo Moock; Anderson José; Suelene Aires Franca. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda / síndrome do desconforto respiratório agudo. *Rev. bras. ter. intensiva* vol.19 no.3 São Paulo July/Sept. 2007.
92. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6439-46.
93. SANTOS, F. B., et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol.*, v.100, n.1, p.98-106, 2006.
94. Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, Robertson CR, Haslett C, Donnelly SC. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002 Oct;30(10):2335-7.
95. PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.*, v.98, n.4, p.1154-1162, 2005.
96. YANG, Y., et al. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. *Gastroenterol.*, v.22, n.2, p.253-260, 2007.
97. Browne WR, Feringa BL. Making molecular machines work. *Nat Nanotechnol*. 2006 Oct;1(1):25-35. doi: 10.1038/nnano.2006.45.
98. Singh B, Tiwari AK, Singh K, Singh SK, Ahmed A, Erwin PJ, Franco PM. β 2 agonist for the treatment of acute lung injury: a systematic review and meta-analysis. *Respir Care*. 2014 Feb;59(2):288-96. doi: 10.4187/respcare.02571. Epub 2013 Jun 18
99. TEPLITZ C. The core pathobiology and integrated medical science adult acute respiratory insufficiency. *Surg ClinNorth Am* 56: 1091-1133, 1976.
100. FUKUDA Y et al. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 126: 171-182, 1987.

101. Moss M, Goodman PL, Heinig M, Barkin S, Ackerson L, Parsons PE. Establishing the relative accuracy of three new definitions of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1995;23:1629-37.
102. Mangialardi RJ, Martin GS, Bernard GR, Wheeler AP, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 2000;28:3137–3145.
103. Weil MH, Henning RJ, Morissette M, Michaels S. Relationship between colloid osmotic pressure and pulmonary artery wedge pressure in patients with acute cardiorespiratory failure. *Am J Med* 1978;64:643–650
104. Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease: different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:3–11
105. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American European consensus conference on ARDS: definitions mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818–824
106. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:293–301.
107. Rotta AT, Kunrath CL, Wiryawan B. O manejo da síndrome do desconforto respiratório agudo. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79:S149-60.
108. Vilar J, Slutsky AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:814-6.
109. Authors/Writing Committee and the Members of the ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome. The Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307:2526-33.
110. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:766-72.
111. Cujec B, Polasek P, Mayers I, Johnson D. Positive end-expiratory pressure increases the right-to-left shunt in mechanically ventilated patients with patent foramen ovale. *Ann Intern Med*. 1993;119:887–94.

112. Flori HR, Glidden DV, Rutherford GW, Matthay MA. Pediatric acute lung injury: prospective evaluation of risk factors associated with mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:995–1001
113. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2005;353:1685–93.
114. Fioretto JR, Ferrari GF, Ricchetti SM, Moreira FL, Bonatto RC, Carpi MF. Síndrome do desconforto respiratório agudo em crianças: incidência, mortalidade e trocas gasosas. *RBTI.* 2001;13:58-62.
115. Rubenfeld GD, Caldwell E, Granton JT, Hudson LD, Matthay MA. Interobserver variability in applying a radiographic definition for ARDS. *Chest.* 1999;116:1347-53.
116. Vieira RP, Duarte AC, Claudino RC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, Arantes-Costa FM, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Dec;37(6):660-7.
117. Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro Faria Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc.* v. 44, p.1227-1234, jul 2012.
118. Vieira, R.P., de Andrade, V.F., Duarte, A.C., Dos Santos, A.B., Mauad, T., Martins, M.A., Dolhnikoff, M., Carvalho, C.R., 2008. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice ii: effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 295, L670–L679.
119. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida, SR. 2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology Letters.* 94:
120. Collison LW, Vignali DA. 2008. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* 226:248–262.
121. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, et al. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.*13:715–725.

122. Jones LL, Vignali DA.2011. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol. Res.*51:5–14.
123. Hunter CA.2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.*5:521–531.
124. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ.2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*25:221–242.
125. Dong C.2008. IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. *J. Immunotoxicol.*5:43–46.
126. Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Yamaguti A, Andrade ME, Fieschi C, de Beaucoudrey L, Casanova JL, Duarte AJ.2005. Paracoccidioides brasiliensis disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clin. Infect. Dis.* 2005. 41:31-7.
127. Aoki T, Narumiya S.2012. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences.* 33:304-311.
128. Sem R, Baltimore D. Multiple nuclear factors Interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986, 46 (5) : 706-1
129. Barnes PJ, Acicock IM. Anti-inflammatory actions of steroids : molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14(12) 436-4
130. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic response syndrome and new target for therapy. *Int Care Med* 1998; 24 (11) : 1131-38
131. Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D.2008. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J. Immunol.* 181:721–735. Chu WM.2012. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters.* 328 222-225.
132. Vassiliou E, Jing H, Ganea D.2003. Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* 223:120 – 32.
133. Harizi H, Gulade N.2004. Inhibition of IL-6, TNF- α , and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* 228:99
134. Algood, HM., Lin PL, Flynn, JL.2005. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 41:S189–S193

135. Kawakami K.2008. Immune response and its clinical significance in fungal infection. *Nihon Rinsho*. 66:2245-53.
136. Van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG.2010. Pathogenesis of invasive candidiasis. 16:453-9.
137. Wood KL, Hage CA, Knox KS, Kleiman MB, Sannuti A, Day RB, Wheat LJ, Twigg HL .2003. Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 167:1279–1282
138. Mertz LE, Blair JE.2007. Coccidioidomycosis in rheumatology patients: incidence and potential risk factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1111:343 – 357
139. Warris A, Bjorneklett A, Gaustad P.2001. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *N. Engl. J. Med*. 344: 1099 – 1100
140. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ.2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 13:248-52.

**ANEXO I – Termo de Aprovação no Comitê de Ética em
Pesquisa**

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0002.2015

Título do Projeto: Efeito Inibidor de Leucotrieno (MK 0476) Associado à Terapia com Antibiótico (cefalosporina de 3ª geração) em Modelo Experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) Induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)

Orientador: Rodolfo de Paula Vieira

Aluno: Jaime Eduardo Davino Chiovatto

Objetivos: estudar os efeitos do inibidor de leucotrienos (MK0476) e da ciclosporina em modelo experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) induzida pela administração intratraqueal e intraperitoneal de LPS. Avaliações específicas serão conduzidas para determinar a mecânica pulmonar, níveis de óxido nítrico exalado, número de células inflamatórias pulmonares e sistêmicas e, perfil de mediadores inflamatórios pulmonares e sistêmicos (IL-1 β , IL-1ra, IL-6, CXCL-1/KC, IL-10, IL-17 e TNF- α).

Método: Camundongos C57Bl/6 serão distribuídos nos respectivos grupos: (1) Controle (não manipulado), (2) LPS IT (LPS intratraqueal; 10 μ g/camundongo), (3) LPS IP (LPS i.p.; 100 μ g/camundongo), (4) LPS IT+MK0476 (n=10; LPS intratraqueal; 10 μ g/camundongo+MK0476), (5) LPS IP+MK0476 (LPS i.p.; 100 μ g/camundongo+MK0476), (6) LPS IP+CFLS (LPS i.p.; 100 μ g/camundongo+CFLS), (7) LPS IT+CFLS (LPS intratraqueal 10 μ g/camundongo+CFLS), (8) LPS IT+MK0476+CFLS (LPS intratraqueal 10 μ g/camundongo+MK0476+CFLS) e (9) LPS IP+MK0476+CFLS (LPS i.p.100 μ g/camundongo+MK0476+CFLS). Após 24 horas os animais serão eutanaziados para obtenção de amostras pulmonares e sanguíneas. Parte das amostras serão cultivadas para estudo *in vitro* do efeito de LPS e amostras remanescentes serão direcionadas para dosagem molecular.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo): biotério de criação e manutenção da Universidade Nove de Julho; *Mus musculus*, C57Bl/6 macho, camundongo. Serão utilizados 180 animais(18-22 g), com tamanho amostral de 10 animais por grupos. O tamanho amostral é justificável porque o modelo experimental possui 50% de mortalidade.

Condições de alojamento e nutrição: mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho. Não restrição de água e comida.

As condições de alojamento estão claras e de acordo com as legislações nacionais, recomendações da Sociedade de Animais de Laboratório e recomendações internacionais.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: os pesquisadores reportaram que o modelo experimental não impõe dor aos animais. A obtenção das amostras ocorrerá por ministração anestésica/analgésica.

Adequado segundo as normas

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração): mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), i.p.

Adequado segundo as normas

Eutanásia: Anestesia seguida de exsanguinação pela aorta abdominal e excisão do coração. Quetamina 100mg/kg e Xilazina 10mg/kg. Intraperitoneal.

Adequado segundo as normas

Pertinência e valor científico do estudo proposto: A SDRA apresenta altas taxas de mortalidade e as modalidades terapêuticas baseiam-se na tentativa de diminuição da inflamação pulmonar para minimizar a lesão inicial, com o objetivo de se obter um melhor prognóstico. Nesse sentido, o presente estudo tem como hipótese que a inibição da via dos leucotrienos pode ser benéfica inibindo a inflamação pulmonar e sistêmica.

Data de início: 01 de Março de 2015.

Data de término: 28 de Fevereiro de 2016.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

() Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

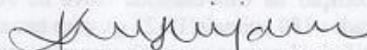
(X) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Pendência:

1. Avaliar de redução do número de animais e/ou apresentar documentação científica que comprove a necessidade de maior número
2. Esclarecer como será realizada a manutenção dos animais, evidenciando os níveis de segurança devido ao uso do LPS

São Paulo, 10 de fevereiro de 2015



Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Pertinência e valor científico do estudo proposto: A SDRA apresenta altas taxas de mortalidade e as modalidades terapêuticas baseiam-se na tentativa de diminuição da inflamação pulmonar para minimizar a lesão inicial, com o objetivo de se obter um melhor prognóstico. Nesse sentido, o presente estudo tem como hipótese que a inibição da via dos leucotrienos pode ser benéfica inibindo a inflamação pulmonar e sistêmica.

Data de início: 01/06/2015.

Data de término: 31/12/ 2017.

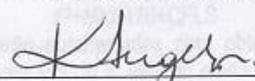
Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

- Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.**
 Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
 Não-Aprovado

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 07 de maio de 2015



Prof. Dra. Kátia De Angelis
 Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho