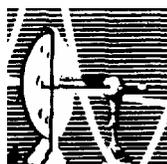


SHEILA DA SILVA FAGUNDES

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE DIFERENTES
INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE EM UM
MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *E. COLI***

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
visando a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SHEILA DA SILVA FAGUNDES
POTENCIAL TERAPÊUTICO DE DIFERENTES INIBIDORES DE
FOSFODIESTERASE EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *E. COLI*

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à
obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Área de Concentração: Fisiologia Respiratória

APROVADA POR:

Profa. Vania Maria Correa da Costa (Suplente Interna e Revisora)
Profa. Adjunta UFRJ

Prof. Marcelo Einicker Lamas (Suplente Externo)
Prof. Adjunto UFRJ

Prof. Marcos Eduardo Machado Paschoal
Prof. Adjunto UFRJ

Profa. Lídia Moreira Lima
Profa. Adjunta UFRJ

Profa. Débora Souza Faffe
Profa. Adjunta UFRJ

Prof. Walter Araújo Zin (Orientador)
Prof. Titular UFRJ

Rio de Janeiro, Brasil.

Julho 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Fagundes, Sheila da Silva

Potencial Terapêutico de Diferentes Inibidores de Fosfodiesterases em um Modelo de Lesão Pulmonar Aguda induzida por Lipopolissacarídeo de *E. Coli*. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Tese: Mestre em Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia). Área de

Concentração: Fisiologia Respiratória

1. Inibidores de Fosfodiesterase 2. Mecânica Respiratória 3. Elastância 4. Morfometria
5. Lesão Pulmonar Aguda

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa da UFRJ (CEPG-UFRJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Aos meus pais, porque sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho e às quais devo meus agradecimentos:

Ao Prof. Walter Araújo Zin. Por me ensinar os caminhos da pesquisa científica e acompanhar meus passos até hoje. Trago como referência e inspiração, o importante trabalho que realiza como pesquisador, professor e orientador. A ele dedico todo meu respeito e admiração. Muito Obrigada.

À Professora Débora Souza Faffe, pelos ensinamentos, apoio e conselhos ao longo de toda minha formação, além de revisão dedicada e importantes sugestões, fundamentais para a realização deste trabalho. Sempre amiga, disposta a me ouvir e atender com carinho. Muito obrigada.

À Professora Patricia R. M. Rocco, pelos ensinamentos e atenção ao longo dos últimos anos.

Aos estagiários e alunos de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia da Respiração, em especial Mariana Ávila e Viviane Cagido pela amizade e por toda a ajuda prestada nos momentos mais difíceis deste trabalho. Que vocês conquistem seus sonhos.

À Flávia Brandão e Lílian Katie Nagato, sempre dispostas a ajudar em todos os momentos. Muitíssimo obrigada.

Aos meus amigos do Laboratório de Investigação Pulmonar: Mariana Genuíno, Caroline Pássaro e Débora Xisto, pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, em especial Antônio Carlos de Souza Quaresma, técnico do Laboratório de Fisiologia da Respiração.

À Daysa, Mariana, Alba e Camila pela amizade e por entenderem a minha ausência.

Nem dá para agradecer o quanto vocês já fizeram por mim. Adoro vocês.

À minha avó, pela torcida e carinho.

Ao Pedro, pelo amor, apoio, paciência e compreensão durante todos esses anos.

RESUMO

POTENCIAL TERAPÊUTICO DE DIFERENTES INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *E. COLI*.

Nome do Autor :Sheila da Silva Fagundes

Orientador(es): Walter Araújo Zin

Resumo da Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

O presente estudo visa comparar a eficácia terapêutica da talidomida, sildenafil, talidomida e sildenafil e LASSBio 596 (uma droga híbrida composta por uma molécula modificada de talidomida e sildenafil) na lesão pulmonar aguda (LPA).

Camundongos BALB/c receberam injeção intraperitoneal de salina, talidomida, sildenafil, talidomida e sildenafil ou LASSBio 596 1 ou 6 horas depois da instilação de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*. Vinte e quatro horas após a indução da lesão, os camundongos foram anestesiados, ventilados e a mecânica pulmonar [elastâncias estática (Est) e dinâmica (Edyn), ΔE (Edyn-Est), e pressões resistiva (ΔP_1), viscoelástica (ΔP_2) e a soma das duas (ΔP_{tot}) foram determinadas pelo método de oclusão ao término da inspiração. A fração de área de colapso alveolar e número de células polimorfonucleares foi determinada pela técnica de contagem de pontos no parênquima pulmonar (coloração H-E).

O LPS aumentou significativamente Est, ΔE , ΔP_2 , ΔP_{tot} , a fração de área de colapso alveolar e o número de células polimorfonucleares (PMN) em relação ao grupo Controle (C). A talidomida e o sildenafil, sozinhos ou combinados, não foram capazes de reduzir significativamente Est e ΔP_2 em relação ao grupo LPS (L). No grupo 596 (LASSBio 596), a Est foi similar a C. 596 também reduziu ΔP_2 enquanto os outros tratamentos apresentaram um resultado menos potente. Em relação à variação da elastância (ΔE), 596 foi o único grupo que demonstrou ser estatisticamente diferente do grupo L, tal comportamento foi visto em ambos os tempos de administração após a indução da lesão. O comportamento dos grupos S (sildenafil) e 596 foi similar ao controle em relação à variação da pressão total (ΔP_{tot}).

Todos os tratamentos administrados 1 h após a indução da lesão reduziram o colapso alveolar; entretanto, essa redução foi significativamente menor nos demais tratamentos quando comparados ao 596. Nos grupos tratados com 6 h, só houve uma redução significativa no colapso ao ser administrado o fármaco LASSBio 596. Além disso, o 596 apresentou maior eficiência em inibir o recrutamento de células inflamatórias do que os demais tratamentos. Nossos dados sugerem que o LASSBio 596 reduziu a inflamação pulmonar na LPA, sendo mais efetivo que seus protótipos.

Palavras-chave: 1. Inibidores de Fosfodiesterase 2. Mecânica Respiratória 3. Elastância 4. Morfometria 5. Lesão Pulmonar Aguda

Rio de Janeiro -Julho/2006

ABSTRACT

THERAPEUTIC POTENTIAL OF DIFFERENT PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS IN A MODEL OF ACUTE LUNG INJURY.

Sheila da Silva Fagundes

Walter Araújo Zin

Abstract da Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

The present study aims to compare the therapeutic effectiveness of thalidomide, sildenafil, thalidomide-sildenafil and LASSBio 596 (a hybrid drug candidate proposed by molecular modification of thalidomide and sildenafil) in ALI.

BALB/c mice received an intraperitoneal injection of either saline, thalidomide, sildenafil, thalidomide and sildenafil or LASSBio 596 1 or 6 hours after *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) intratracheal instillation. Twenty-four hours after the induction of the injury, the mice were anesthetized, ventilated, and lung mechanics [static (Est) and dynamic (Edyn) elastances, ΔE (Edyn-Est), resistive ($\Delta P1$) and viscoelastic ($\Delta P2$) pressures, and their sum (ΔP_{tot}) were determined by the end-inflation occlusion method. Fractional area of alveolar collapse and the amount of PMN cells were determined by the point-counting technique in lung parenchyma (H-E staining).

LPS increased significantly Est, ΔE , $\Delta P2$, ΔP_{tot} and the fractional area of alveolar collapse when compared to Control (C). Thalidomida and Sildenafil, administered either separately or in association, were not able to significantly reduce Est and $\Delta P2$ in relation to group LPS (L). In group 596 (LASSBio 596), Est was similar to C. LASSBio 596 also reduced $\Delta P2$, while other treatments presented less powerful results. In relation to the variation of elastances (ΔE), 596 was the only group that statistically demonstrated to be different of group L; such behavior was seen when the drugs were administered either one or six hours after the lesion. The behavior of groups Sildenafil (S) and 596 was similar to the control in relation to the variation of the total pressure (ΔP_{tot}).

All treatments reduced alveolar collapse. However, this reduction was substantially smaller in the remaining treatments given 1 h after the induction of the injury, when compared with 596. In the groups treated at 6 h, a significant reduction in the collapse occurred only with 596. Moreover, it inhibited more efficiently the recruitment of inflammatory cells than the other the treatments. Our data suggest that LASSBio 596 reduced the pulmonary inflammation in LPA, being more effective than its prototypes.

Key-words: 1. phosphodiesterase inhibitors 2. Respiratory mechanics 3. elastance 4. Morphometry 5. Acute Lung Injury

Rio de Janeiro -Julho/2006

ÍNDICE

Ficha Catalográfica	iii
Agências Financiadoras	iv
Dedicatórias	v
Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Índice	x
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Abreviaturas	xvi
I. Introdução	1
I.1 - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - Definição e histórico.....	2
I.2 - Patogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	6
I.3 - Epidemiologia e Mortalidade na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	8
I.4 - Modelo de SDRA mediada por lipopolissacarídeo.....	9
I.5 - Talidomida.....	12
I.5.1. Histórico.....	12
I.5.2 - Composição e Análogos Estruturais da Talidomida.....	14

I.5.3 - Mecanismo de Ação	15
I.5.4 - Atividade da Talidomida em Diferentes Doenças.....	16
I.6 - Tratamento com Inibidores Específicos de Fosfodiesterases.....	17
I.7 – Sildenafil.....	29
I.7.1. Histórico.....	29
I.7.2 - Composição.....	29
I.7.3 - Mecanismo de Ação	30
I.8 - LASSBio 596.....	32
I.9 - Mecânica Respiratória.....	36
I.9.1 - Noções básicas.....	36
I.9.2 - Estudo da Mecânica Respiratória.....	41
II. Objetivos.....	50
II.1- Objetivo Geral.....	50
II.2- Objetivos Específicos.....	50
III. Justificativa.....	50
IV. Materiais e Métodos.....	52
IV.1 - Grupos Experimentais.....	53
IV.2 - Mecânica Pulmonar.....	54
IV.3 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração.....	57
IV.4 - Remoção dos pulmões e análise histopatológica.....	62
IV.5 – Aspectos éticos.....	65
IV.6 - Análise estatística.....	65

V- Resultados.....	67
V.1. Mecânica Pulmonar.....	67
V.2. Análise Histopatológica e Morfométrica.....	73
V.2.1. Análise Qualitativa	73
V.2.2. Análise Quantitativa	76
V.3. Correlação Entre Achados Mecânicos e Morfométricos.....	79
VI – Discussão.....	82
VI.1 – Modelo.....	84
VI.2 – Fármacos.....	87
VI.3 – Desenho Experimental.....	91
VI.4 - Mecânica Pulmonar.....	92
VI.5 - Microscopia Óptica.....	97
VII – Conclusões.....	102
VIII - Perspectivas Futuras.....	105
IX – Referências Bibliográficas	106
X – Apêndice	136

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1- Composição estrutural da talidomida.....	14
Figura 2.- Ações complementares úteis na SDRA/LPA do AMPc e do GMP.	20
Figura 3 - Composição estrutural do sildenafil.....	30
Figura 4 - Gênese dos novos derivados duais (4a-e; 5a-e; 6a-e), inibidores de PDEs.....	34
Figura 5 - Modelo linear unicompartimental.....	42
Figura 6 - Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo inspiratório.....	45
Figura 7 - Montagem experimental.....	58
Figura 8 - Método de oclusão ao final da inspiração.....	60
Figura 9 - Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	64
Figura 10 - Elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 1 hora depois da indução da lesão.....	67

Figura 11 –Variações de pressões do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 1 hora depois da indução da lesão.....	68
Figura 12 – Elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 6 horas depois da indução da lesão.....	69
Figura 13 –Variações de pressões do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 6 horas depois da indução da lesão.....	70
Figura 14 - Fotomicrografia de parênquima pulmonar.....	74
Figura 15 - Fotomicrografia de parênquima pulmonar.....	75

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 – Causas associadas à SDRA/LPA.....	5
Tabela 2 – Achados histopatológicos da lesão pulmonar aguda.....	8
Tabela 3 – Distribuição das fosfodiesterases humanas.....	22
Tabela 4 – Expressão de AMPc-PDE e sua significância em células humanas inflamatórias/acessórias.....	23
Tabela 5 – Número final de animais	54
Tabela 6 – Celularidade do parênquima pulmonar dos grupos controle, LPS e submetidos a diferentes tratamentos 1 hora depois da indução da lesão.....	77
Tabela 7 – Celularidade do parênquima pulmonar dos grupos controle, LPS e submetidos a diferentes tratamentos 6 horas depois da indução da lesão.....	77
Tabela 8 – Morfometria do parênquima pulmonar dos grupos controle, LPS e submetidos a diferentes tratamentos 1 hora depois da indução da lesão.....	78
Tabela 9 – Morfometria do parênquima pulmonar dos grupos controle, LPS e submetidos a diferentes tratamentos 6 horas depois da indução da lesão.....	79
Tabela 10 - Correlação dos Animais tratados 1 hora após a indução da lesão	80
Tabela 11 - Correlação dos Animais tratados 6 horas após a indução da	

ABREVIATURAS

AC –Adenilato ciclase

AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina

BAL – Lavado broncoalveolar

BALF – Flúido do Lavado broncoalveolar

τ - Constante de tempo

CPT – Capacidade pulmonar total

CRF - Capacidade residual funcional

Crs – Complacência do sistema respiratório

CL – Complacência do pulmão

Cw – Complacência da parede torácica

CV – Capacidade vital

CVF – Capacidade vital forçada

DMSO – dimetil-sulfóxido

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

ΔV –Variação do volume gasoso mobilizado

$\Delta P_{1,L}$ - Variação de pressão gasta para vencer o componente viscoso pulmonar

$\Delta P_{2,L}$ - Variação de pressão dispendida para vencer o componente viscoelástico

e/ou inhomogêneo pulmonar

ΔR – Variação da resistência

ΔP - Variação de pressão do equipamento

ΔP_{tot} - Variação de pressão total

E - Elastância total ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

E2 - Elastância do componente viscoelástico (corpo de Maxwell)

Edyn – Elastância dinâmica ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Edyn,rs - Elastância dinâmica do sistema respiratório ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Edyn,L - Elastância dinâmica do pulmão ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Edyn,w - Elastância dinâmica da parede torácica ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Est- Elastância estática ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Est,rs - Elastância estática do sistema respiratório ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Est,L - Elastância estática do pulmão ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Est,w - Elastância estática da parede torácica ($\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$)

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

HRB – Hiperresponsividade Brônquica

IgE- Imunoglobulina E

IFN- γ - Interferon gamma

ICAM -1 – Molécula de adesão intracelular-1

IL – Interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase endotelial

LT- Leucotrieno

LBP – *Lipid binding protein*

LPS - Lipopolissacarídeo

LPA – Lesão Pulmonar Aguda

MPO – Mieloperoxidase

NF κ B – Fator nuclear kappa B

OVA – Ovalbumina

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio

PMN – Polimorfonuclear

PEEP- Pressão positiva ao final da expiração

Pel,rs - Pressão de retração elástica do sistema respiratório (cmH₂O)

PE_{max} – pressão expiratória máxima (cmH₂O)

PI_{max} - pressão inspiratória máxima

P_{máx,rs} - Pressão máxima do sistema respiratório ou pressão de pico inspiratória (cmH₂O)

P_{mus_i} - Pressão desenvolvida pelos músculos inspiratórios durante expiração.

P_{mus_i,0} - Pressão desenvolvida pelos músculos inspiratórios no início da expiração.

P_{tr} - Pressão traqueal (cmH₂O)

PKA – Proteína quinase A

PKG – Proteína quinase G

PDE – Fosfodiesterase

P- Pressão

r- raio

R - Resistência total ($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$)

R'rs - Resistência ativa do sistema respiratório ($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$)

Raw – Resistência das vias aéreas ($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$)

Rtis – Resistência Tecidual ($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$)

Rinit – Resistência Pulmonar Intrínscica

Rtot,L – Resistência pulmonar total

Req – Resistência do equipameto

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo

SDRAp – Síndrome do desconforto respiratório agudo pulmonar

SDRAep – Síndrome do desconforto respiratório agudo extrapulmonar,

TLR – *Toll like receptor*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Th – T helper

T_I - Tempo inspiratório (s)

T- Tensão

VEF₁- Volume expiratório forçado no primeiro segundo

VE- Volume expirado por minuto

V'CO₂- Volume de gás carbônico produzido por minuto

V'O₂- Volume de oxigênio consumido por minuto

V_T - Volume corrente (mL)

\dot{V} - Fluxo ($\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$)

xx

\dot{V}_E - Volume minuto expiratório (mL.min⁻¹)

V - Volume (mL)

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1 - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - Definição e Histórico

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é a mais comum e devastadora síndrome clínica de lesão pulmonar aguda, afetando tanto pacientes clínicos como cirúrgicos (Ware e cols., 2000). Atualmente, representa a principal causa de morbidade, morte e custos nas Unidades de Terapia Intensiva (Piantadosi e Schwartz, 2004). Sua primeira descrição foi realizada por Ashbaugh e colaboradores (Ashbaugh e cols., 1967), ao identificarem 12 pacientes ventilados mecanicamente, que evoluíam com cianose refratária à oxigenoterapia, redução da complacência pulmonar e evidência de infiltrados difusos na radiografia de tórax. Inicialmente foi denominada Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto, esse termo foi modificado para Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) logo após a constatação de que a Síndrome pode ocorrer também em crianças.

Desde sua primeira descrição, os critérios para definição da SDRA vêm sofrendo modificações, a fim de corrigir possíveis falhas na definição inicial e, desta forma, criar critérios mais específicos para identificar pacientes com SDRA (Murray e cols., 1988).

Em 1994, uma nova definição foi estabelecida em uma Conferência Consenso entre as Sociedades Americana e Européia de Terapia Intensiva (AECC), com o objetivo de desenvolver uma definição padrão para a SDRA, a fim de auxiliar as pesquisas clínicas e epidemiológicas. A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) passou a ser reconhecida como uma síndrome inflamatória com aumento

da permeabilidade, que está associada a uma constelação de anormalidades clínicas, radiológicas e fisiológicas.

Esse mesmo consenso classifica a lesão pulmonar de acordo com a gravidade da hipoxemia. Pacientes com comprometimento menos grave são diagnosticados com Lesão Pulmonar Aguda (LPA), caracterizada por inflamação pulmonar aguda e persistente, edema pulmonar secundário a aumento da permeabilidade vascular pulmonar, infiltrado alveolar bilateral ao RX, relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) entre 201 e 300 mmHg, independentemente do valor de pressão positiva ao final da inspiração (PEEP), e ausência de evidência clínica de elevação da pressão atrial esquerda, avaliada pela pressão de enchimento capilar pulmonar, que não deve exceder 18 mmHg. Os pacientes com hipoxemia mais grave, a relação entre PaO_2/FiO_2 é igual ou menor que 200 mmHg, independentemente do valor de pressão positiva ao final da inspiração (PEEP) recebem o diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, apresentando as outras características semelhantes às descritas acima para a LPA. Sendo assim, podemos afirmar que a SDRA refere-se ao estágio mais grave da LPA (Bernard e cols., 1994).

Em geral, a SDRA é considerada como a forma extrema de um espectro de lesões pulmonares e em inflamação pulmonar independentemente da doença precipitante. No entanto, a SDRA/LPA pode ser causada por duas vias patogênicas distintas: uma lesão “direta” do parênquima pulmonar como na SDRA/LPA secundária à doença pulmonar, e.g., pneumonia difusa, ou uma lesão “indireta” do parênquima pulmonar como na SDRA/LPA secundária à doença extrapulmonar, e.g., sepsis abdominal ou pancreatite (Tabela 1). Evidências

sugerem que essas duas vias podem corresponder a diferentes processos patológicos subjacentes (Gattinoni e cols., 1998; Menezes e cols., 2005; Santos e cols., 2006). Modelos experimentais de SDRA evidenciaram respostas pulmonares diversas, quando o agente indutor da lesão é administrado diretamente, via instilação intratraqueal, ou indiretamente, via injeção intravenosa ou intraperitoneal (Seidenfeld e cols., 1986; Muller-Leisse e cols., 1993; Terashima e cols., 1994; Tasaka e cols., 1996). Na lesão “direta” ocorre dano primário do epitélio alveolar, levando à ativação de macrófagos alveolares e início de uma rede de resposta inflamatória com edema, deposição de fibrina, colágeno, agregados de neutrófilos e hemácias dentro do espaço alveolar. Na lesão “indireta” o dano principal ocorre no endotélio vascular pulmonar com aumento da permeabilidade capilar e recrutamento de monócitos, neutrófilos e plaquetas, entre outras células (Brigham e Meyrick, 1986). Dessa forma, espera-se observar um predomínio de consolidação na SDRA “direta”, e um predomínio de edema intersticial e colapso alveolar na SDRA “indireta” (Gattinoni e cols., 1998; Rocco e Zin, 2005).

Na tabela 1 estão exemplificadas algumas das causas associadas ao desenvolvimento da SDRA/LPA (Galhardo e Martinez, 2003).

Tabela 1 – Causas associadas à SDRA/LPA

LESÃO PULMONAR DIRETA	LESÃO PULMONAR INDIRETA
Pneumonia	Sepsis
Aspiração do conteúdo gástrico	Trauma grave com choque ou múltiplas transfusões
Contusão pulmonar	Circulação extracorpórea
Embolia gordurosa ou gasosa	Toxicidade por drogas
Lesão por inalação	Pancreatite aguda
Edema de reperfusão pós-transplante pulmonar ou embolectomia	Hemotransfusão
Afogamento	Causa neurogênica
	Queimaduras graves
	Múltiplas fraturas
	Pós-transplante de medula óssea

Galhardo e Martinez, 2003

I.2 - Patogênese da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A SDRA é freqüentemente progressiva, classicamente caracterizada por fases distintas, que podem estar superpostas, com diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e radiológicas. Acredita-se que a lesão pulmonar evolui em três fases: exsudativa, proliferativa e fibrótica.

A fase aguda, ou exsudativa ocorre aproximadamente na primeira semana após o início da SDRA, apresenta-se com lesão da superfície tanto endotelial quanto epitelial, aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, inativação do surfactante pulmonar com subsequente formação de edema alveolar, causando inflamação e produzindo grandes anormalidades nas trocas gasosas e diminuição da complacência pulmonar (Piantadosi e cols., 2004). A perda da integridade epitelial e a lesão dos pneumócitos do tipo II (PII) alteram o transporte normal de fluídos através do epitélio, dificultando a remoção de líquido dos espaços alveolares. Além disso, a lesão das células do tipo II, reduz a produção e renovação do surfactante, contribuindo para as suas anormalidades características (Ware e cols., 2000). Esses eventos são refletidos na presença de infiltrados bilaterais ao exame radiológico convencional e áreas heterogêneas de consolidação e atelectasia, predominantemente na região dependente (Aberle e cols., 1988). Mediadores liberados por células inflamatórias circulantes lesam diretamente a microcirculação do pulmão. Os achados patológicos incluem dano alveolar difuso, presença de neutrófilos, macrófagos, eritrócitos e líquido rico em proteínas nos espaços alveolares, lesão capilar e ruptura do epitélio alveolar.

A fase proliferativa começa antes do terceiro dia. Entretanto, torna-se mais proeminente na segunda e terceira semanas de evolução, é um estágio de organização do exsudato intra-alveolar e intersticial adquirido na fase aguda (Fein e cols., 2000). PII se multiplicam ao longo do septo alveolar, para cobrir áreas previamente desnudas da membrana basal. A fibrose torna-se pronunciada nesta fase. Fibroblastos e miofibroblastos proliferam na parede alveolar, migram através dos hiatos da membrana e convertem o exsudato intra-alveolar em tecido de granulação. Posteriormente, forma-se um tecido fibroso e denso, pela deposição de colágeno, resultando em fibrose do ducto alveolar, espessamento do septo alveolar e colapso resultante de anormalidades estruturais e funcionais do surfactante (Fukuda e cols., 1987; Tomashefski, 2000; Wallace e cols., 2002). Nesta fase, a radiografia de tórax mostra opacidades lineares, caracterizando a presença da fibrose (Pratt e cols., 1979). Na tomografia computadorizada de tórax visualizam-se opacidades intersticiais difusas e bolhas. Muitos pacientes podem ter a SDRA resolvida nesse estágio, porém alguns evoluem para o reparo pulmonar, atingindo a fase fibrótica (Fein e cols., 2000).

A fase fibrótica inicia-se a partir da terceira ou quarta semana do início da lesão, quando ocorre um extenso remodelamento do pulmão através da deposição esparsa de colágeno, compondo um aspecto de "favos de mel", associados às áreas de fibrose difusa. Os espaços aéreos estão irregularmente alargados e existe fibrose nos ductos alveolares. O colágeno do tipo III é substituído pelo colágeno rígido do tipo I, enrijecendo o pulmão (Wallace e cols., 2002).

A tabela abaixo resume os principais achados histopatológicos de cada fase da SDRA, descritas anteriormente.

Tabela 2 – Achados histopatológicos da lesão pulmonar aguda:

Fase Exsudativa (1-7dias)	Fase Proliferativa (7-21 dias)	Fase Fibrótica (< 21 dias)
Lesão da barreira alvéolo-capilar	Inflamação crônica	Alvéolos fibróticos
Necrose de PI e PII	Hiperplasia de PII	Tortuosidades arteriais
Edema alveolar e intersticial	Migração de fibroblastos e miofibroblastos	Organização do exsudato intra-alveolar
Necrose de células endoteliais	Deposição de tecido de granulação	Produção de proteínas da matriz extracelular
Membrana hialina	Deposição de colágeno	Fibrose mural

Ingbar, 2000

É importante ressaltar que essas três fases, do ponto de vista patogênico, não são claramente definidas, não se comportam exatamente como descrito e nem todos os indivíduos irão desenvolver fibrose. Estes estágios podem sobrepor-se e, em um mesmo indivíduo, ocorrer de forma heterogênea no tempo e nas diferentes regiões do pulmão (Ingbar, 2000).

I.3 - Epidemiologia e Mortalidade na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

Uma estimativa precisa da incidência da LPA e da SDRA ainda não se encontra disponível em decorrência da falta de uma definição uniforme e pela

heterogeneidade das causas e manifestações clínicas.

A SDRA/LPA atinge cerca de 200.000 pacientes por ano nos Estados Unidos, sendo mais alarmante a estimativa de mortalidade: chega aproximadamente a 40%, ou 80.000 mortes ao ano (Martin, 2005). Embora tenha sido constatada uma queda nos índices de mortalidade nos últimos anos, graças ao desenvolvimento de medicamentos e a implementação de estratégias ventilatórias protetoras durante a ventilação mecânica, o índice de mortalidade permanece inaceitavelmente alto.

A maioria dos pacientes com SDRA/LPA evolui para óbito devido à falência de múltiplos órgãos, e não em consequência da hipoxemia (Montgomery e cols., 1985). O prognóstico é pior em pacientes com doença hepática crônica, disfunção orgânica não pulmonar, sepsis e idade avançada. Não há diferença na mortalidade entre homens e mulheres (Monchi e cols., 1998).

I.4 - Modelo de SDRA mediada por Lipopolissacarídeo

Na década de 30, as endotoxinas foram isoladas e caracterizadas como complexos de proteína, fosfolípido, e lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede externa de bactérias Gram negativas. Esforços subseqüentes revelaram que as proteínas livres e purificadas podiam produzir todos os efeitos fisiológicos da endotoxina, substância impura isolada anteriormente (Morrison e cols., 1983; Bone e cols., 1991).

Está claro que uma grande diversidade de receptores participa no reconhecimento celular do LPS, entretanto os TLR (*Toll-like receptors*) representam os principais desencadeadores da resposta inflamatória e

desempenham um papel fundamental na transdução do sinal desencadeado por LPS (Medzhitov e cols., 1997).

O TLR é um receptor especializado, que reconhece epítomos presentes em bactérias e outros organismos unicelulares (Belvin e cols. 1996). Atualmente já são conhecidos em mamíferos 10 tipos de TLR e novos receptores são freqüentemente descobertos. Em 1999, foi demonstrado que os TLR2 respondiam primariamente a bactérias Gram positivas, enquanto os TLR4 a bactérias Gram negativas (Underhill e cols., 1999; Diks e cols., 2001). Estes têm pequena afinidade por LPS e, portanto, proteínas adicionais, tais como CD14 (*differentiation cluster 14*) e LBP (*lipid-binding protein*), são necessárias como cofatores para a transdução do sinal (Lemaitre e cols., 1996) .

A internalização do LPS é importante para a transdução do sinal. A interação do LPS com as células imunológicas desencadeia a produção de vários mediadores, que orquestram a resposta inflamatória (Ulich e cols.,1993). A ativação dos fagócitos mononucleares tem um papel central, levando à liberação de diferentes citocinas, incluindo TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). A liberação de TNF- α induz a aderência de neutrófilos às células endoteliais, favorecendo a migração e infiltração destes nos espaços pulmonares (Ulich e cols.,1993; Albelda e cols., 1994). A ativação de neutrófilos causa a produção de radicais de oxigênio e a liberação de enzimas granulares, as quais podem ser associadas ao processo de lesão, especialmente no pulmão (Sibille e cols.,1990; Olivier e cols., 1996).

Em indivíduos normais, as bactérias gram negativas residem primariamente no trato gastrointestinal, onde barreiras previnem sua translocação para a circulação sistêmica (Bone e cols., 1991). Todavia, alguns fatores podem levar à translocação bacteriana, como: (1) alteração da flora do hospedeiro, resultando em crescimento bacteriano exagerado; (2) disfunção imunológica do indivíduo; e (3) aumento da permeabilidade através da barreira epitelial (Feltis e cols., 1994; Go e cols., 1995). Uma vez na circulação, o LPS interage diretamente com leucócitos e células parenquimatosas, induzindo a cascata inflamatória.

A sepse por bactérias gram negativas representa a condição precipitadora mais comum para o desenvolvimento da SDRA. Evidências sugerem que o LPS induz uma resposta inflamatória sistêmica que, por sua vez, medeia um dano orgânico, eventualmente culminando em uma falência orgânica múltipla. O pulmão é freqüentemente o primeiro órgão onde surge a falência, apresentando as características da LPA/SDRA: um edema pulmonar não-cardiogênico como consequência da lesão ao endotélio vascular pulmonar e inflamação pulmonar difusa (Brigham e cols., 1986; Welbourn e cols.1992).

O componente LPS das bactérias gram negativas desempenha o papel principal no disparo do processo inflamatório que resulta na LPA/SDRA. O LPS produz um modelo bem caracterizado de LPA, que pode mimetizar as alterações morfológicas e funcionais observadas na situação clínica secundária à presença de LPS circulante (Ulich e cols.,1993; Albelda e cols., 1994; Paulwelse cols., 1990; Delclaux e cols.,1997). Este também mimetiza a inflamação pulmonar secundária à exposição natural ao LPS, constituindo um modelo de lesão pulmonar direta (Meyrick e cols., 1986, Gonçalves de Moraes e cols.,1996).

A indução da lesão pulmonar por endotoxina também está associada com alterações da mecânica respiratória representadas por redução na complacência dinâmica e aumento da resistência pulmonar. As alterações da mecânica são atribuídas à presença de edema pulmonar seguido por desigualdades na relação ventilação-perfusão, ou constrição das vias aéreas (Esbenshade e cols., 1982; Hinson e cols., 1983; Burell e cols., 1988; Wheeler e cols., 1990; Faffe e cols., 2000).

I.5 Talidomida

I.7.2 - Histórico

A talidomida foi descoberta por uma série de fatores fortuitos e primeiramente relatada por Wilhelm Kunz, em 1953. Sua síntese foi realizada na indústria farmacêutica alemã “Chemie Grünenthal”, objetivando a preparação de pequenos peptídeos úteis na produção de novos antibióticos. Entretanto, durante a rota sintética proposta inicialmente, Wilhelm Kunz isolou um produto secundário, racêmico, não peptídico, que foi reconhecido pelo farmacologista da “Chemie Grünenthal”, Herbert Keller, como um análogo estrutural da glutetimida. Posteriormente, o perfil sedativo-hipnótico da talidomida foi bem caracterizado (Sneider e cols., 1985; Randall e cols., 1990).

Em 1957, a talidomida foi comercializada como fármaco sedativo-hipnótico, amplamente vendido em países europeus, asiáticos, no Canadá e América do Sul, tornando-se o medicamento mais vendido na Alemanha Ocidental para o tratamento da insônia (Powell e cols., 1996; Raje e cols., 1999).

No início da década de 60, a talidomida foi prescrita mundialmente como sedativo e agente antináuseas, indicada no alívio do mal-estar matinal comum em gestantes, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas, que foram, posteriormente, atribuídas ao seu perfil teratogênico (McBride e cols., 1961; Lenz e cols., 1962). Em 1961, após confirmação e divulgação destes graves efeitos colaterais, este fármaco teve sua licença para comercialização cancelada (Kelsey e cols., 1965).

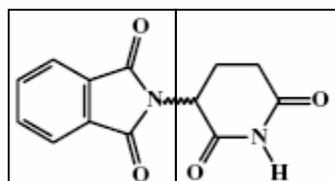
Quatro anos mais tarde, em 1965, o médico israelita Jacob Sheskin prescreveu a talidomida como sedativo para pacientes leprosos, observando fortuitamente acentuada redução da dor e do processo inflamatório associados ao leproma (Sheskin e cols., 1965; Bessis e cols., 1992), identificando as propriedades antiinflamatórias da talidomida, até então desconhecidas. Este intrigante perfil antiinflamatório incentivou diversos grupos de pesquisa ao estudo do provável mecanismo de ação relacionado às suas ações benéficas sobre os lepromas.

Em 1991, a Dra. Gilla Kaplan e colaboradores, da Universidade Rockefeller, Nova Iorque, em trabalho pioneiro (Kaplan e cols., 1991), demonstraram que pacientes leprosos apresentavam níveis sanguíneos aumentados de um modulador do sistema imunológico, identificado como uma citocina denominada TNF- α . Estes mesmos pesquisadores constataram, posteriormente, a participação da talidomida na inibição seletiva desta citocina, quando expressa em quantidade superior àquela necessária à manutenção do sistema imunológico normal, denotando, portanto, o potencial imunorregulador da talidomida.

Com base na descoberta das propriedades antiinflamatórias e imunorreguladoras da talidomida, a indústria norte-americana Celgene Co. solicitou ao FDA (*Food and Drug Administration*) sua aprovação para uso no tratamento da hanseníase, concedida em julho de 1998. Marcava-se de forma definitiva o renascimento deste fármaco, que representa, atualmente, um dos principais agentes terapêuticos (Calderon e cols., 1997).

Apesar do início trágico, a talidomida tornou-se um grande objeto de interesse graças a seu valor clínico recentemente demonstrado nas doenças infecciosas e neoplásicas (Grabstad e cols., 1965; Juliusson e cols., 1996; Calabrese e cols., 2000; Thomas e cols., 2000) atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu amplo espectro de ação.

I.5.2 - Composição e Análogos Estruturais da Talidomida



Talidomida

Figura 1- A talidomida é composta por duas subunidades: ftalimida (à esquerda) e glutarimida (à direita).

Os estudos acerca da relação entre a estrutura química e a atividade da talidomida e análogos revelam o potencial farmacofórico do anel ftalimídico, ao mesmo tempo que denotam a irrelevância do grupamento glutarimida na atividade

anti-TNF- α , mecanismo responsável pelos novos efeitos terapêuticos da talidomida (Shibata e cols., 1996; Miyachi e cols., 1997; Muller e cols., 1997). Estes dados também denotam o perfil toxicofórico do grupamento glutarimida, viabilizando o planejamento e síntese de novos candidatos a fármacos, análogos à talidomida, com maior eficácia terapêutica e desprovidos de seu efeito teratogênico (Miyachi e cols., 1997).

I.5.3 - Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação preciso da talidomida ainda não foi elucidado, graças à falta de comparações entre os efeitos *in vivo* com a atividade deste fármaco *in vitro*, e devido ao fato de que em soluções com pH fisiológico, ela sofre hidrólise espontânea não-enzimática gerando vários metabólitos (Amato e cols. 2002).

O efeito mais pronunciado da talidomida é certamente a sua ação sobre a produção de TNF- α (Sampaio e cols., 1991; Meierhofer e cols., 2001). Vários mecanismos para a inibição do TNF- α foram sugeridos, incluindo a degradação acelerada de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) para TNF- α (Moreira e cols., 1993) ou sua ligação ao ácido glicoprotéico- α 1, reconhecido por ter uma atividade anti-TNF- α (Turk e cols., 1996). Além disso, a talidomida parece bloquear a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Keifer e cols., 2001). O NF- κ B é um importante fator de transcrição envolvido na resposta imune e no crescimento celular. O NF- κ B pode se translocar para o núcleo e regular vários genes incluindo o gene do TNF- α (Baldwin e cols., 2001).

A talidomida inibe a produção de interleucina-6 (IL-6), provavelmente também bloqueando NF- κ B, e a produção de interleucina-12 (IL-12) pelos monócitos (Moller e cols., 1997). Em contrapartida, a talidomida aumenta a síntese das interleucinas 2, 4 e 5 (IL-2, IL-4 e IL-5, respectivamente) (Thomas e cols., 2000).

Os efeitos imunomodulatórios em linfócitos incluem uma redução das células T CD4⁺ (Gad e cols., 1985) e uma estimulação das células T CD8⁺ (Haslett, 1998), levando, então, a uma queda na relação CD4/CD8. Além disso, a talidomida parece induzir uma transformação dos linfócitos T *helper* do tipo 1 (Th1) em tipo 2 (Th2), isto é, gerando uma célula T mais citotóxica, dominando a resposta imune disparada principalmente por interferon gama (IFN- γ). A talidomida também inibe a proliferação de célula T em resposta a estímulos mitogênicos e antigênicos (Keenan e cols., 1991; Thomas e cols., 2000).

Além disso, a talidomida modifica vários receptores de integrinas e outros receptores de superfície para leucócitos, incluindo o receptor CD44 e a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) (Nogueira e cols., 1994). A talidomida também inibe a quimiotaxia dos neutrófilos e monócitos (Thomas e cols., 2000; Dunzendorfer e cols., 1997; Fauré e cols., 1981) e a fagocitose pelos neutrófilos. Os dados sobre a influência da talidomida sobre o IFN- γ são conflitantes.

I.5.4 - Atividade da Talidomida em Diferentes Doenças

Os primeiros estudos realizados em 1953 estabeleceram as propriedades ansiolíticas, hipnóticas, antieméticas e anestésicas adjuvantes da talidomida

(Fabro e cols., 1965; Smithells e cols., 1994). Subseqüentemente, observou-se que a talidomida era altamente eficaz na supressão do eritema nodoso hansênico (Sheskin e cols., 1965; Kaplan e cols., 1991). Com base nesses efeitos benéficos no tratamento das dermatoses inflamatórias associadas a esta condição específica, este fármaco vem sendo usado para o tratamento de outras alterações inflamatórias, auto-imunes, e ou dermatológicas (Calabrese e cols., 2000). Pesquisas recentes evidenciaram resultados promissores em pacientes com AIDS e câncer, que apresentam perda progressiva de peso e insônia (Grabstad e cols., 1965; D'Arcy e cols., 1994; Reyes-Teran e cols., 1996).

Mais recentemente, a talidomida provou possuir atividade anti-tumoral em pacientes com mieloma múltiplo e em uma gama de outros neoplasias (Fife e cols., 1998; Juliusson e cols., 2000; Eisen e cols., 2000; Patt e cols., 2000; Little e cols., 2000; Figg e cols., 2001)

I.6 - Tratamento com Inibidores Específicos de Fosfodiesterases

O estabelecimento do envolvimento dos segundos mensageiros nucleotídeos cíclicos na sinalização celular e homeostase fez com que a regulação dessa via pelos inibidores de fosfodiesterase (PDE) se tornasse uma área de considerável interesse (Essayan e cols., 1999).

As fosfodiesterases (PDE) constituem uma família de enzimas responsáveis pela degradação dos nucleotídeos cíclicos - monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina (AMP cíclico) e monofosfato cíclico de 3'5'-guanosina (GMP cíclico) – levando à formação do AMP e do GMP. Essas duas moléculas influenciam um grande número de processos celulares, incluindo a produção e a ação de mediadores

inflamatórios, a função dos canais iônicos, a contração muscular, a diferenciação celular, a apoptose, a lipogênese, a glicogenólise e a gliconeogênese. O AMPc é um mensageiro secundário intracelular ubíquo, que medeia respostas a diversos hormônios, a fatores de crescimento e a neurotransmissores. Por ser um agente importante na regulação de respostas relacionadas aos mecanismos patogênicos de diversas doenças, tem sido alvo de diferentes intervenções terapêuticas. O AMPc é produzido por uma família de enzimas (com nove isoformas) denominadas *adenilato ciclases* (AC), que convertem a adenosina trifosfato (ATP) em AMPc. As adenilato ciclases estão distribuídas diferentemente entre os vários tecidos, células e localizações intracelulares, gerando diferenças na regulação da síntese do AMPc (Hurley, 1999). A atividade da adenilato ciclase, por sua vez, é regulada pelas proteínas G, as quais são ativadas por uma grande família de receptores denominados receptores acoplados da proteína G (GPCR). Dessa forma, quando um agonista se liga ao GPCR, o receptor ativa as proteínas G_s, que por sua vez ativam a AC, levando à produção de AMPc (Neves e cols., 2002).

Uma vez produzido, o AMPc passa a ativar uma série de mecanismos em cadeia. O mais importante deles envolve a proteínquinase A (PKA). Quando ativada pelo AMPc, a PKA fosforila um grande número de substratos protéicos, modulando a função celular (Fimia e cols., 2001). A ativação do AMPc também desencadeia um mecanismo que leva à sua inativação através das PDE. O AMPc e o GMPc são inativados através da hidrólise da ligação 3'-éster catalisada pelas fosfodiesterases dependentes de nucleotídeos cíclicos (Figura 2). Dada a multiplicidade de respostas celulares moduladas pelo AMPc e pelo GMPc, fica

óbvio concluir que as células devem ter mecanismos enzimáticos regulando suas concentrações e a duração de seus efeitos (Perry e Higgs., 1998).

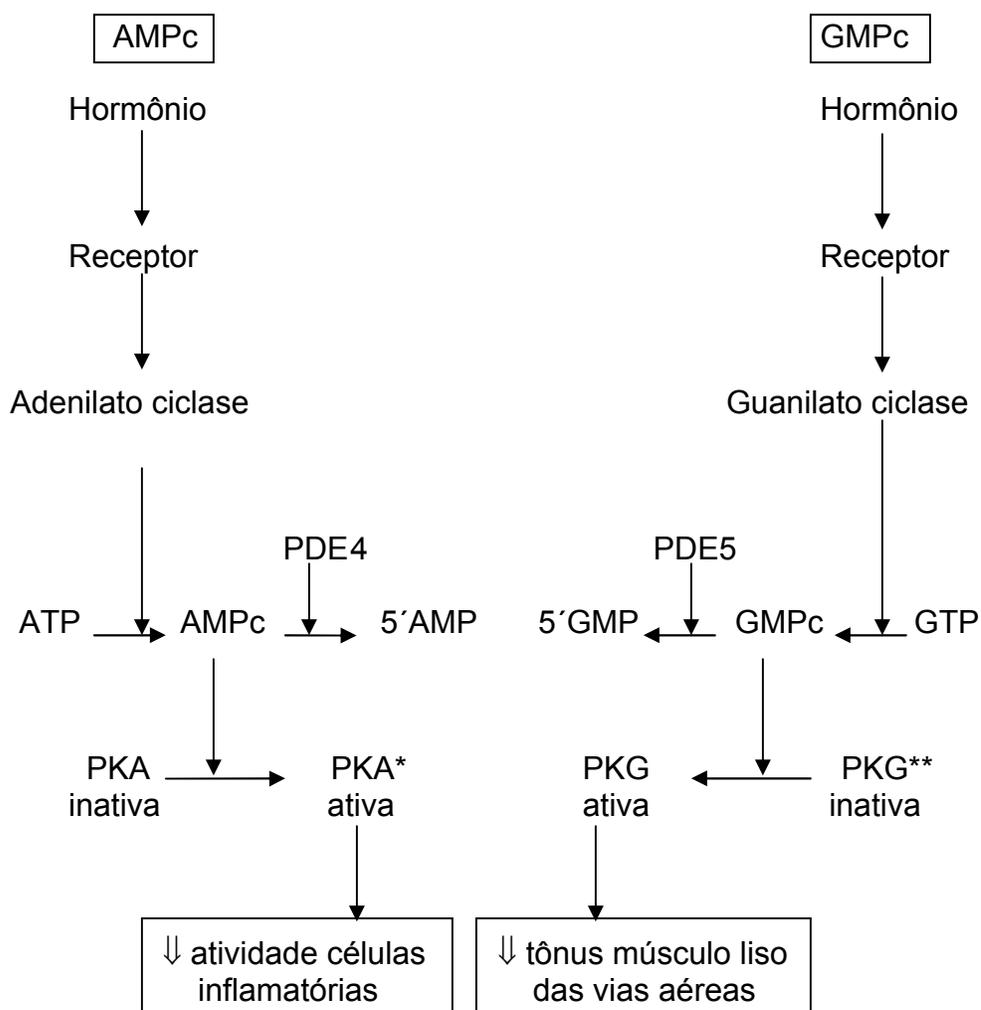


Figura 2 – Ações complementares úteis dos monofosfatos cíclicos de adenosina e guanosina na lesão pulmonar aguda e na síndrome do desconforto respiratório agudo. AMPc e GMPc, monofosfatos cíclicos de adenosina e guanosina, respectivamente; PKA*, proteínoquinase dependente do AMPc; PKG**: proteínoquinase dependente do GMPc; PDE, fosfodiesterase.

Até o momento, mais de cinquenta isoformas de PDE foram identificadas, agrupadas em onze famílias (ou tipos), e suas concentrações variam nos diferentes tecidos (Essayan e cols., 2001; Clayton e cols., 2004). Essas famílias

compreendem dois ou mais produtos genéticos (denominados A, B, C e assim por diante). Os meios alternativos de processamento do RNAm levam a múltiplas variantes para cada gene. Dessa forma, a diversidade molecular faz com que existam mais de cinquenta fosfodiesterases, com diferentes especificidades, características cinéticas, propriedades regulatórias e distribuição celular (Bolger, 1994; Beavo e cols., 1994; Beavo, 1995; Houslay e Milligan, 1997; Soderling e cols., 1998). Onze famílias de fosfodiesterases foram bem caracterizadas até o momento (Tabela 3). As PDE compartilham uma estrutura básica comum. Todas são compostas por três domínios. O domínio central, que mostra o maior grau de homologia entre todas as enzimas, é responsável pela hidrolização dos nucleotídeos cíclicos. Acredita-se que os domínios C-terminal e N-terminal tenham funções regulatórias (Kenan e cols., 2000; Essayan, 2001). Todas as PDE são reguladas pela fosforilação dos seus substratos protéicos (Polson e Strada, 1996). Com relação ao seu substrato, as PDE4, 7 e 8 são altamente específicas para o AMPc (de Boer e cols., 1992; Rabe e cols., 1993), enquanto as 5, 6 e 9 são seletivas para o GMPc. A PDE3 tem afinidade equivalente pelo AMPc e pelo GMPc, mas hidrolisa fracamente o GMPc, e, assim, pode ser considerada como funcionalmente específica para o AMPc (Perry e Higgs, 1998). As PDE10 e PDE11 são específicas para ambos. É importante ressaltar que a alteração local nos níveis de nucleotídeo cíclico através da ativação de uma família de PDE pode afetar a atividade de outras famílias através da regulação alostérica ou da competição pelo sítio (Essayan e cols., 1999).

Tabela 3 – Distribuição das fosfodiesterases humanas

Família	Especificidade	Distribuição		
		Pulmão	Células inflamatórias*	Outros tecidos ⁺
PDE1	Ca ⁺⁺ /calmodulina	Sim		Coração
PDE2	Estimulada pelo GMPc	Sim		Coração
PDE3	Inibida pelo GMPc, seletiva para ao AMPc	Sim	Sim	Coração
PDE4	Específica para o AMPc	Sim	Sim	Rim
PDE5	Específica para o GMPc	Sim		Célula muscular lisa
PDE6	Específica para o GMPc		Sim	Fotorreceptores
PDE7	Específica para o AMPc	Sim	Sim	Cél. muscul. esquelética
PDE8	Específica para o AMPc		Sim	Testículo
PDE9	Específica para o GMPc	Sim		Rim
PDE10	Específica para ambos			Testículo, cérebro
PDE11	Específica para ambos			Próstata

PDE, fosfodiesterase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; GMPc, monofosfato cíclico de guanina; *- Neutrófilo, monócito/macrófago, linfócito e eosinófilo; ⁺- Outros tecidos além do pulmão e das células inflamatórias.
Adaptado de Essayan e cols., 1999

A possibilidade farmacológica de modular seletivamente a elevação intracelular do AMPc favorece o potencial terapêutico para o uso dos inibidores de PDE (iPDE). Uma outra perspectiva terapêutica para os iPDE advém do fato de eles serem capazes de modificar a resposta inflamatória através da modulação seletiva da produção de citocinas pró-inflamatórias (Tabela 4). A inibição seletiva da PDE1 bloqueia a síntese de IL-6 sem inibir o TNF- α . A inibição da PDE3 bloqueia a produção da IL-6 e atenua a produção de TNF- α . Inibindo a PDE4 ou a PDE5, a produção de IL-6 também fica bloqueada, mas o efeito sobre o TNF- α mostra-se bifásico, ou seja, excitatório /inibitório. A inibição da PDE3 e da PDE4 atenua a proliferação de músculo liso na camada íntima dos vasos e inibe a proliferação de músculo liso na via aérea (Billington e cols., 1999). A inibição simultânea das PDE5, 6 e 9 reduz, de modo dose-independente, a síntese da IL-6 e do TNF- α . Finalmente, a inibição não seletiva de PDE pela pentoxifilina suprime a secreção de IL-6 e TNF- α .

Tabela 4 – Expressão de fosfodiesterases e repercussões da sua inibição em células humanas inflamatórias/acessórias.

Basófilos	PDE3, PDE4 , PDE5	Reduziu a liberação de histamina Reduziu a produção de IL-4 e IL-13 Reduziu a produção de LTC4
Linfócitos B	PDE3, PDE4 , PDE7	Reduziu a síntese de IgE Aumentou a proliferação
Células Dendríticas	PDE1, PDE2, PDE3, PDE4 , PDE5 , PDE7	Reduziu o fluxo de cálcio Reduziu a produção de citocinas Reduziu a hiperpermiabilidade Reduziu a expressão de VCAM-1 e L-selectina

Eosinófilos	PDE3, PDE4	Diminui a expressão de CD11b/CD18 Reduziu a quimiotaxia Reduziu a degranulação Reduziu síntese de L-selectina Reduziu a produção de LTC4 Reduziu a produção de superóxidos	
Macrófagos	PDE1, PDE3, PDE4 ,	Reduziu a liberação de ácido araquidônico Reduziu a produção de TNF- α , IL- β e IL-10	
Mastócitos	PDE3, PDE4	Reduziu a produção de citocinas Reduziu a liberação de histamina	
Monócitos	PDE3, PDE4	Reduziu a liberação de ácido araquidônico Reduziu a produção de leucotrienos Reduziu a produção de TNF- α Nenhum efeito sobre a produção de IL- β e IL-6, IL-8	Nenhum efeito
Neutrófilos	PDE4	sobre a produção de superóxidos ou óxido nítrico Aumentou a produção de IL-10 Diminui a apoptose Diminui a sinalização do cálcio Diminui a expressão de CD11b Reduziu a degranulação Reduziu a secreção de elastase Reduziu a produção de leucotrienos Reduziu a produção de superóxidos	
Linfócitos T	PDE1, PDE2, PDE3, PDE4 , PDE5 , PDE7, PDE8	Reduziu a expressão de molécula moléculas de adesão Reduziu a blastogênese Reduziu resposta ploriferativa Reduziu a produção de citocinas (IL-2 ,IL-4, IL-5 ,IL-13,IFN- γ , TNF, GM-CSF)	de

PDE, fosfodiesterase; IL, interleucina; LTC4, leucotrieno C4; IgE, imunoglobulina E; VCAM-1, molécula de adesão vascular-1; CD11b, grupamento de diferenciação 1b ; CD18, grupamento de diferenciação 18; TNF- α , fator de necrose tumoral ; IFN - γ , Interferon gamma; GM-CSF, fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos.

Adaptado de Essayan e cols., 1999

Por outro lado, dada à importância do AMPc como um transdutor de sinal em diferentes mecanismos de ativação celular, os iPDE têm potencial para causar diversos efeitos indesejáveis. Por exemplo, o uso da teofilina, um iPDE inespecífico, é limitado pela indução de efeitos colaterais importantes, como convulsões e arritmias cardíacas, além de náuseas e de vômitos. Esses dois últimos são frequentemente relatados com os iPDE4 testados e são diretamente proporcionais à potência inibitória (Giembycz e cols., 2002).

Como a substância avaliada no presente estudo é um fraco inibidor específico de fosfodiesterases (PDE) 4 e 5, serão apresentados, a seguir, alguns detalhes destas PDE e de seus inibidores. A família PDE4 compõe-se por quatro subtipos (A, B, C e D). Cada subtipo é produto de um gene diferente, localizado em três cromossomos (Milatovich e cols., 1994; Horton e cols., 1995; Szpirer e cols., 1995). Todos os subtipos são específicos para o AMPc, mas diferem na distribuição tecidual, celular e subcelular, e também na sensibilidade aos inibidores. A PDE4 representa a PDE predominante nas células imunes e nas células inflamatórias, incluindo os mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos T e célula muscular lisa do pulmão. A elevação do AMPc intracelular foi relacionada com a inibição da função de vários tipos de células, incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células endoteliais e células epiteliais do pulmão (Nicholson e cols., 1991; Nicholson e Shahid, 1994) (Tabela 4). As ações supressivas dos iPDE4 incluem: 1) a inibição da geração de citocinas importantes na maturação e no recrutamento de linfócitos T e de eosinófilos (IL-2, IL-4, IL-5 e GM-CSF) e 2) a inibição da produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-8) (Torphy, 1998;

Au e cols., 1998). Mais ainda, os inibidores da PDE4 reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio e de mediadores pró-inflamatórios pelos basófilos, neutrófilos e eosinófilos, assim como atenuam a degranulação dessas células (Torphy, 1998). Inibidores seletivos das PDE4 reduzem ou abolem a migração de eosinófilos e de neutrófilos para o pulmão em resposta a antígenos, a histamina e a lipopolissacarídeo de membrana (LPS) (Barnette e cols., 1996a; Teixeira e cols., 1997; Torphy, 1998). É possível que os inibidores da PDE4 possam ter efeitos sobre o remodelamento brônquico (Wong e Leong, 2004).

Um outro mediador envolvido no mecanismo inflamatório da SDRA inclui o TNF- α . Trata-se de uma citocina que age como mediador primário da resposta inflamatória (Old, 1988). No pulmão, o TNF- α induz o seqüestro e a migração de neutrófilos, os quais desempenham importante função na patogênese da inflamação pulmonar (Deni e cols., 1994). Níveis elevados de AMPc inibem a produção de TNF- α em monócitos ativados e em células mononucleares periféricas sanguíneas e a inibição de PDE4 modula eficazmente a atividade do TNF- α (Verghese e cols., 1995), confirmando seu efeito antiinflamatório.

Todos os efeitos favoráveis causados pela inibição da PDE4 descritos acima motivaram a busca de agentes que a inibissem e que pudessem ser usados com segurança clínica (Torphy e Undem, 1991; Teixeira e cols., 1997; Torphy, 1998). No contexto da SDRA, acredita-se que os inibidores da PDE4 possam modular tanto a inflamação pulmonar como o tônus da musculatura lisa peribrônquica.

Inicialmente, iPDE4 testados produziam efeitos indesejáveis,

particularmente náuseas, vômitos e cefaléia, os mesmos habitualmente relacionados ao uso da teofilina, um inibidor fraco e não-seletivo das PDE (Polson e cols., 1978). Considerando-se que esses achados sejam decorrentes da inibição de um subgrupo particular da PDE4 (PDE4D), buscaram-se inibidores seletivos de subtipos que mantenham o efeito antiinflamatório, mas não os indesejáveis.

Foram descritos quatro subtipos de PDE4 (A, B, C e D), com múltiplas variantes em cada um deles. Aparentemente, a PDE4B é o subtipo predominante em neutrófilos e em monócitos. Nessas células, somente foi detectada a variante PDE4B2 (Wang e cols. 1999), o que faz dela um possível alvo para o desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios em doenças nas quais monócitos e/ou neutrófilos desempenhem papel importante na patogenia.

Aparentemente, há duas conformações de PDE4, uma de alta afinidade e outra de baixa, ambas com afinidades distintas para determinados inibidores, com distribuições teciduais únicas e com contribuições variáveis para os efeitos funcionais da inibição da PDE4. A conformação de alta afinidade de PDE4 predomina aparentemente no SNC e em parte do trato gastrointestinal, enquanto a forma de baixa afinidade parece ser mais importante nas células imunes e inflamatórias. Dessa forma, a maior parte dos efeitos antiinflamatórios dos iPDE4 estaria associada à inibição da forma de baixa afinidade (Barnette e cols., 1996b).

As PDE4 e 5 predominam nas células do epitélio brônquico. A PDE4 hidrolisa de 50 a 75% do AMPc total e a PDE5 hidrolisa 80% do GMPc total (Fuhrmann e cols., 1999). Os mecanismos de controle envolvidos na regulação do AMPc e do GMPc são complexos e relacionados. Através deles, ambos os

nucleotídeos cíclicos são capazes de modular a síntese, a degradação e a ação um do outro (Pelligrino e Wang, 1998). Outras similaridades entre as ações inibitórias do AMPc e do GMPc sobre o extravasamento microvascular (Torphy, 1994; Ortiz e cols., 1996; Torphy e cols., 1999) e sobre a atividade das células inflamatórias (Frossard e cols., 1981; Raeburn e cols., 1993; Torphy e cols., 1999) sugerem que a regulação farmacológica tanto o AMPc quanto o GMPc possa ser útil no tratamento da SDRA.

A PDE5 catalisa a hidrólise do GMPc com absoluta especificidade. O GMPc é o transdutor de sinal para o relaxamento endotelial mediado pelo óxido nítrico (NO) e para a diurese mediada pelo fator natriurético arterial (ANP). A elevação do GMPc via inibição da PDE5 estimula o relaxamento endotelial e a diurese, ação combinada útil no tratamento da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca congestiva (Sybertz e Czarniecki, 1997). Os estudos com iPDE5 em modelos de doença cardiovascular mostraram que eles são capazes de reduzir a pressão arterial pulmonar com efeitos mínimos sobre a frequência cardíaca, fazendo deles uma nova classe de vasodilatadores pulmonares seletivos (Saeki e Takese, 1996). Pauvert e colaboradores demonstraram que as PDE3, 4 e 5 são as principais enzimas envolvidas no controle do tônus vascular da artéria pulmonar (Pauvert e cols., 2002). A inibição da PDE5, com conseqüente aumento do GMPc, também promove o relaxamento da musculatura lisa (Rybalkin e cols., 2003), além de ter reduzido substancialmente o edema pulmonar em um modelo de transplante pulmonar (Korom, 2006).

I.7 - Sildenafil

1.7.1 - Histórico

O citrato de sildenafil (Viagra[®]) foi o primeiro medicamento oral aprovado para o tratamento da disfunção erétil. A descoberta deste fármaco em 1989 resultou de múltiplas pesquisas com agentes químicos que poderiam potencialmente ser úteis no tratamento das doenças cardíacas coronarianas. Os estudos clínicos preliminares com o sildenafil no início de 1990 não foram promissores a respeito do seu potencial antiangiogênico. Entretanto, vários voluntários que participavam desse estudo relataram um efeito colateral freqüente: o sildenafil parecia estimular a ereção peniana, o que em breve se tornou o principal foco de outros estudos. Mais de 10 milhões de homens foram tratados com sildenafil no mundo desde essa importante descoberta em 1998. Ele é altamente seletivo para a inibição de PDE5 com uma relativamente menor reatividade cruzada com PDE6 e possui uma estrutura química semelhante ao GMPc (Laties e Fraunfelder.,1999; Kurkreja e cols., 2005).

I.7.2 – Estrutura Química

O sildenafil tem uma estrutura química planejada a partir de similaridades identificadas com o substrato natural da PDE5, isto é o GMPc(Figura 3). Portanto, ele inibe a PDE5 através da sua ligação ao sítio catalítico da proteína competindo com o substrato GMPc (Corbins e Francis., 2002).

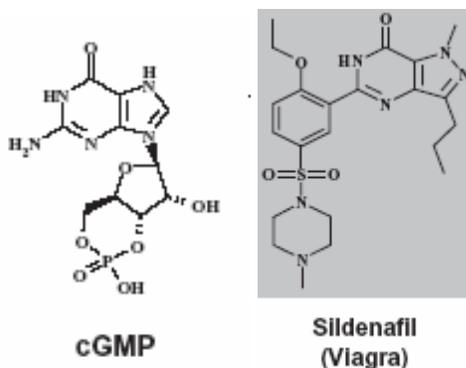


Figura 3- Estrutura molecular do GMPc e do sildenafil

I.7.3 - Mecanismo de Ação

O citrato de sildenafil tem uma potência 240 vezes maior que seu precursor, zaprinast (Ballard e cols., 1998). Seu mecanismo de ação envolve a inibição ativa da enzima PDE5, que resulta no aumento no monofosfato cíclico de guanina (GMPc). O GMPc, então, estimula a proteína quinase G (PKG), a qual inicia uma cascata de fosforilação de proteínas. Isso resulta em uma diminuição nos níveis de íon cálcio intracelular, levando a um relaxamento da musculatura lisa (Noss e cols., 1999). Os efeitos NO/GMPc na contração da musculatura lisa parecem ser mediados especificamente pela PKG, mas não pela PKA, porque em camundongos deficientes em PKG (PKG-I), a indução de relaxamento muscular aórtico foi completamente abolida, porém o relaxamento muscular dependente de AMPc não foi afetado (Hofmann e cols., 2000). Ao mesmo tempo, o sildenafil também é um potente vasodilatador pulmonar com resultados encorajadores no tratamento da hipertensão pulmonar grave (Ghofrani e cols., 2002).

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram a presença da PDE5 na musculatura lisa dos vasos, dos brônquios e em plaquetas (Senzaki e cols., 2001).

Portanto, o efeito do sildenafil foi estudado em dois modelos de doença das vias aéreas em cobaio. O primeiro usou o método de exposição ao LPS; o segundo, o da sensibilização pela ovalbumina (OVA). Enquanto a primeira técnica causou remodelamento brônquico, a última provocou respostas broncoconstrictoras imediata e tardia. Em ambos os modelos, o tratamento com sildenafil (1 mg/kg, intraperitoneal) não modificou as respostas broncoconstrictoras imediata e tardia, mas reduziu significativamente o remodelamento brônquico e o influxo de leucócitos (Toward e cols., 2004). Essa foi a primeira demonstração de efeitos antiinflamatórios do sildenafil.

O uso do sildenafil para o tratamento da hipertensão pulmonar é eficaz em seres humanos. Um estudo clínico com pacientes com hipertensão pulmonar primária grave mostrou uma dramática melhora da pressão sistólica pulmonar após o tratamento com sildenafil oral (Prasad e cols., 2000). Em outro trabalho mostrou-se um potente vasodilatador pulmonar, superior ao óxido nítrico, na redução da resistência vascular pulmonar (Wilkins e cols., 2001; Preston e cols., 2005). A combinação do tratamento com sildenafil e óxido nítrico produziu amplo efeito sinérgico. Portanto, a diminuição da resistência vascular pulmonar e da pressão capilar promoverá possivelmente a resolução do edema pulmonar e melhorará as trocas gasosas. Além disso, o sildenafil age seletivamente sobre os vasos pulmonares sem causar uma vasodilatação sistêmica, quando é administrado isoladamente (Sherkerdemian, 2002). Em um modelo de LPA induzida por LPS, o zaprinast aumentou a resposta vasodilatadora ao NO inalado (Holzmann e cols., 2001).

Em um modelo de isquemia-reperfusão cardíaca, a administração de sildenafil induziu um aumento transitório na expressão de RNA mensageiro para óxido nítrico sintase endotelial e induzida (eNOS e iNOS), resultando em uma elevação significativa nos níveis da proteína NO-sintase após 24 horas (Salloum e cols., 2003).

Demonstrou-se, em um modelo de transplante pulmonar, que o sildenafil estende o tempo de vida e previne a falência inicial do enxerto por aumentar a tolerância à isquemia. Além disso, o edema gerado após a reperfusão foi substancialmente diminuído (Schütte e cols., 2000; Korom e cols., 2006).

I.8 - LASSBio 596

O LASSBio 596 é um híbrido da talidomida modificada e do sildenafil, desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que inibe as PDE4 e 5 e o TNF- α (Lima e cols., 2002).

O LASSBio 596 foi desenhado por modificação molecular na estrutura da talidomida visando a otimização das suas propriedades farmacoterapêuticas e eliminação dos efeitos teratogênicos deste fármaco. Desta feita, LASSBio 596 foi planejado aplicando-se a estratégia de hibridação molecular entre os protótipos talidomida [1], sulfonamida [2] e do sildenafil [3], descritos como inibidores de TNF- α , PDE-4 e PDE-5, respectivamente (Figura 4).

A alteração estrutural da molécula do LASSBio 596 levou à retirada do anel glutarimídico (responsável pelos efeitos teratogênicos da talidomida) e do anel

responsável pelo priaprismo do sildenafil. Dessa forma, possivelmente os eventuais efeitos teratogênicos serão evitados. Em função de sua potência inibitória das PDE4 e 5 ser da ordem de 50% na concentração de 300 μ M, possivelmente o LASSBio 596 não apresenta os efeitos indesejáveis observados com o uso clínico dos demais inibidores de fosfodiesterases testados no tratamento da asma, SDRA e da DPOC (Piaz e Giovannoni, 2000; Murdoch e cols., 2002; Norman, 2002). Seu valor como antiinflamatório e como imunomodulador está demonstrado (Lima e cols., 2002). O efeito antiinflamatório do LASSBio 596 decorre de sua ação sobre a catabolização do AMPc e do GMPc e sobre a modulação do TNF- α . (Lima e cols., 2002).

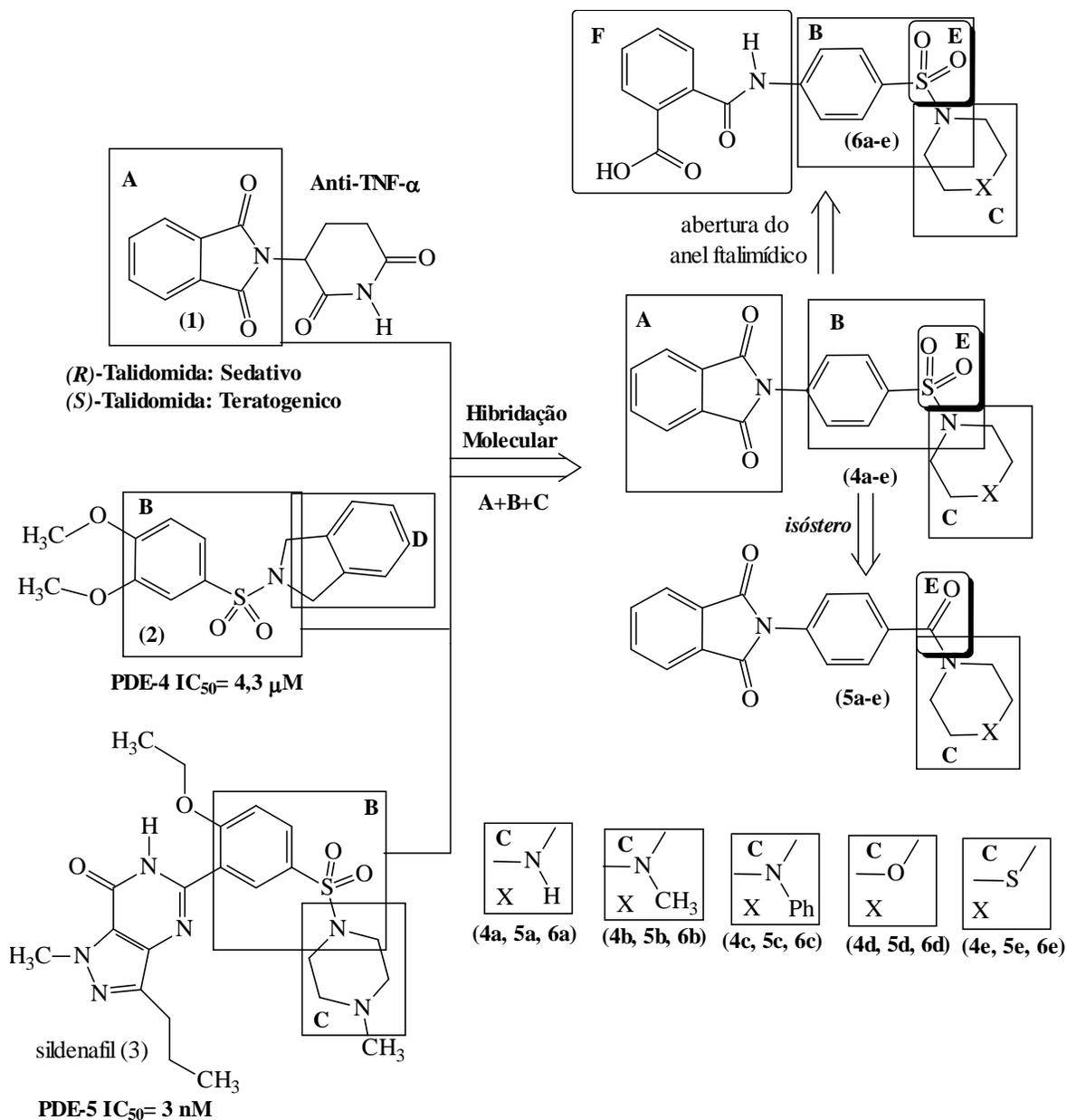


Figura 4- Gênese dos novos derivados duais (4a-e, LASSBio 468; 5a-e, LASSBio 595; 6a-e, LASSBio 596), inibidores de fosfodiesterases (PDEs) e das ações do TNF- α , desenhados pela hibridação molecular entre os protótipos talidomida (1), arilsulfonamida (2) e sildenafil (3).

O mecanismo preciso pelo qual o LASSBio 596 atenua a inflamação no pulmão não é conhecido, mas há evidências de que iPDE4 e 5 podem inibir a liberação de citocinas inflamatórias (Turner, 1993; Sekut e cols., 1995; Miotla e cols., 1998), regular negativamente moléculas de adesão celular (Essayan, 2001), inibir a migração de leucócitos (Sekut e cols., 1995; Miotla e cols., 1998) e a função de diversas células envolvidas no processo inflamatório (macrófagos alveolares, neutrófilos, linfócitos e monócitos) (Kambayashi e cols., 1995; Sekut e cols., 1995; Miotla e cols., 1998; Essayan, 2001) e aumentar a produção de citocinas antiinflamatórias pelos macrófagos (Kambayashi e cols., 1995). Em um estudo sobre seu valor na lesão pulmonar aguda induzida por lipolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, o LASSBio 596 preveniu as alterações na mecânica pulmonar, evitando a redução do calibre das vias aéreas centrais, a liberação de TNF- α , o colapso alveolar e a deposição de fibras colágenas no septo alveolar (Rocco e cols., 2003). É possível que a ação benéfica do LASSBio 596 sobre a função pulmonar se deva à inibição da PDE4, que levaria ao relaxamento da musculatura lisa da via aérea, à modulação da atividade neural pulmonar e à supressão da ativação de células inflamatórias. Nesse estudo de Rocco e colaboradores foi demonstrado, também, que o papel antiinflamatório do LASSBio 596, inibindo a neutrofilia e o TNF- α , não elevou a susceptibilidade à infecção. Em um trabalho posterior, foi avaliado o efeito protetor do LASSBio 596 sobre a função pulmonar e o remodelamento em um modelo crônico de sensibilização alérgica (Campos e cols., 2006). Os animais foram tratados 24 horas antes de receber a primeira instilação intratraqueal de ovalbumina. O LASSBio 596 inibiu as

alterações da mecânica pulmonar, da celularidade, da broncoconstrição, assim como o remodelamento pulmonar. Evitou, também, as alterações morfométricas e bloqueou a fibroproliferação em modelo de sensibilização alérgica desenvolvido em camundongos BALB/c (Campos e cols., 2006).

Tais achados permitem supor que o composto 596, por possuir um perfil antiinflamatório duplo devido à hibridação molecular, agindo nas isoenzimas PDE e reduzindo os níveis de fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) possa apresentar uma ação tão boa, ou melhor, que a promovida pelos fármacos utilizados na sua concepção, administrados separadamente ou em associação.

I.9 Mecânica respiratória

I.9.1 - Noções básicas

Os efeitos funcionais dos fármacos testados no presente trabalho foram, também, estudados pela mecânica pulmonar. Inicialmente, será apresentada uma revisão dos parâmetros da mecânica pulmonar avaliados.

A respiração é um processo cíclico, envolvendo trabalho mecânico dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. Dois componentes, o pulmão e a parede torácica, formam o sistema respiratório. Como parede torácica subentende-se todas as estruturas que se movem durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, isto é, aquela gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das

moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (D'Angelo e cols., 1994); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica; d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (Hildebrandt, 1970); e) forças inerciais (dependem da massa dos tecidos e dos gases) (Mead, 1954); f) forças gravitacionais (incluídas nas forças elásticas) (Milic-Emili, 1977); e g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, as forças inerciais e de distorção da parede são consideradas desprezíveis (Rodarte e Rehder, 1986).

A elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após ter sido deformado por uma força sobre ele aplicada. Um corpo perfeitamente elástico, como uma mola, obedecerá a lei de Hooke, ou seja, a variação de comprimento é diretamente proporcional à força aplicada, até que seu limite elástico seja atingido. Em visão tridimensional, teríamos volume proporcional à pressão.

O tecido pulmonar e a parede torácica possuem propriedades elásticas e obedecem à lei de Hooke, ampliada, de modo que, quanto maior a pressão motriz, maior o volume de gás inspirado. A inclinação da curva volume-pressão ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado é conhecida como complacência do sistema respiratório (C_{rs}). Logo, $C_{rs} = \Delta V/P_{el,rs}$, onde $P_{el,rs}$ corresponde à pressão elástica do sistema respiratório.

Cabe ressaltar que, ao invés de complacência, é freqüentemente utilizada a elastância. Esta corresponde ao inverso da complacência ($E_{rs} = 1/C_{rs}$), ou seja, é

a relação entre a variação de pressão e o volume mobilizado resultante. O cálculo da elastância do sistema respiratório apresenta vantagens, já que as elastâncias do pulmão (EL) e da parede torácica (Ew) são adicionadas diretamente: $E_{rs} = EL + E_w$, enquanto que se somam os inversos das complacências: $1/C_{rs} = 1/CL + 1/C_w$.

Dois fatores geram o comportamento elástico do pulmão. Um deles é representado pelos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas). Acredita-se que o comportamento elástico do pulmão não dependa do simples alongamento das fibras de tecido conjuntivo, mas, principalmente, do seu arranjo geométrico. Todas as estruturas pulmonares encontram-se interligadas pela trama de tecido conjuntivo pulmonar, de forma que, quando há insuflação, todos esses componentes se distendem. Esse fenômeno, denominado interdependência, contribui para manter todos os espaços aéreos abertos.

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, os pulmões ainda apresentam um importante fator que contribui para as suas características elásticas: a tensão superficial exercida pelo líquido que recobre as mucosas pulmonares.

A tensão superficial numa interface ar-líquido aparece porque as moléculas do líquido são atraídas com maior intensidade para o interior do próprio líquido do que para a fase gasosa acima deste. A tensão superficial pode ser definida como a força que age sobre uma linha imaginária de 1 cm de comprimento na superfície de um líquido. Essa tensão surge porque as forças de atração entre as moléculas do líquido são muito maiores do que aquelas entre líquido e gás, resultando uma

área líquida a menor possível.

A tensão superficial tem a propriedade importante de gerar pressão no interior de uma bolha. A relação entre a tensão superficial na parede e a pressão desenvolvida dentro da esfera obedece a Lei de Laplace. Essa lei afirma que, por exemplo, para cada superfície de uma bolha, a pressão (P) é igual ao dobro da tensão (T) desenvolvida pelo raio (r), ou, para ambas as superfícies, $P = 4T/r$. Entretanto, quando somente uma interface está envolvida, como em um alvéolo esférico revestido por líquido na sua face interna, o numerador tem o número 2 em lugar de 4. Considerando-se dois alvéolos de diferentes tamanhos conectados através de uma via aérea comum, e com tensão superficial semelhante, pode-se depreender, com base na Lei de Laplace, que a pressão no alvéolo menor seria maior do que no alvéolo maior. Desta forma, os alvéolos menores esvaziar-se-iam nos maiores, resultando em muitos alvéolos colapsados e alguns hiperinsuflados. Contudo, isso não ocorre nos pulmões normais, pois a tensão superficial do surfactante, líquido de composição protéica e, principalmente, fosfolipídica secretado pelos pneumócitos tipo II, é consideravelmente menor do que a da solução salina que recobre as mucosas pulmonares e varia de acordo com o raio de cada alvéolo (alvéolos grandes apresentam tensão alta; alvéolos pequenos mostram tensão baixa), de modo a manter igual a pressão no interior de todos eles (Rhodes e Tanner, 1995).

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência. A resistência do sistema respiratório (Rrs) pode ser calculada

dividindo-se P_{res} por fluxo aéreo. P_{res} é a pressão resistiva do sistema respiratório, ou seja, a pressão necessária para vencer seus componentes resistivos. Semelhantemente à complacência, e pelas mesmas razões, a resistência do sistema respiratório pode ser subdividida em seus componentes pulmonar e de parede.

A resistência pulmonar, por sua vez, pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (R_{aw}), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (R_{tis}), determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela densidade e viscosidade do gás inspirado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade do deslocamento, o que é importante tanto durante a inspiração como na expiração. A resistência da parede torácica também é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação das moléculas que constituem os tecidos da parede torácica.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta, também, propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam queda da tensão, chamada de relaxamento de tensão ("*stress relaxation*"), ou simplesmente, relaxamento,

quando o corpo é estirado. Por outro lado, sob tensão constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “*creep*” (Dorrington, 1980). É importante notar que esta deformação não é irreversível, mas sim reproduzível, podendo ser repetida, desde que seja precedida por um período de tempo onde o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre ao nível do tecido pulmonar e da parede torácica e permite o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico, pode ser dissipada sob a forma de calor pelo componente resistivo.

I.9.2 - Estudo da Mecânica Respiratória

Todas as alterações humorais e celulares da SDRA têm suas expressões na mecânica respiratória e se caracterizam por redução da complacência e aumento da resistência pulmonar (Esbenshade e cols., 1990; Wheeler e cols., 1990; Faffe e cols., 2000).

A redução da complacência é manifestada clinicamente pela necessidade de altas pressões de via aérea para se conseguir um dado volume inspirado. O mecanismo pode incluir o aumento da tensão superficial e enrijecimento tecidual (e.g., redução dos volumes pulmonares por atelectasia e edema). O possível desenvolvimento posterior de fibrose parenquimatosa difusa como resultado do remodelamento do tecido pós-agressão, reduz ainda mais a complacência

pulmonar e torna mais difícil a expansão e a ventilação alveolares (Nobel e cols., 1975; Lamy e cols., 1976).

Os fatores que elevam a resistência pulmonar podem ser: aumento da resistência tecidual devido à inflamação, infiltração e/ou obliteração dos condutos aéreos, edema peribrônquico e áreas de insuflação e colapso gerando inhomogeneidade no sistema (Snapper e cols., 1983; Wright e Bernard., 1989; Bernard e cols., 1994; Hudson e cols., 1995).

Na tentativa de compreender a complexidade do sistema respiratório e seus componentes (pulmão e parede torácica), além dos diversos mecanismos envolvidos durante a respiração foram utilizados modelos matemáticos relativamente simples, que se aproximam ao máximo da realidade. Para isso, é necessária a interpretação fisiológica de variáveis mensuráveis como fluxo, volume e pressão na abertura das vias aéreas.

O modelo mais simples é composto de dois elementos, uma resistência (representada por um tubo) e uma elastância (representada por um balão) (Figura 5).

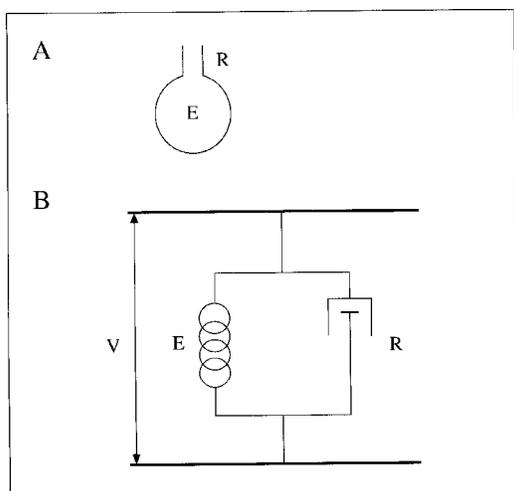


Figura 5 - Modelo linear uni-compartimental do sistema respiratório. Representação anatômica (A) e reológica (corpo de Voigt, B). R, resistência; E, elastância; V, variações de volume.

Esse modelo baseia-se na assertiva de que as propriedades mecânicas do sistema respiratório independem do volume pulmonar e do fluxo, e que os fatores inerciais são desprezíveis. A equação de movimento associada ao modelo é geralmente referida como "equação de movimento do sistema respiratório". Essa equação é dada por:

$$P(t) = E.V(t) + R.V'(t)$$

onde, em qualquer instante t , E e R são, respectivamente, a elastância e a resistência do sistema respiratório e P é a pressão motriz capaz de produzir volume (V) e fluxo aéreo (V'). Entretanto, apesar do modelo de compartimento único continuar sendo amplamente utilizado, essa equação de movimento não explica o decaimento lento da pressão traqueal observado após oclusão das vias aéreas ao final da inspiração (Don e Robson, 1965; Bates e cols., 1985a, 1985b), a dependência de frequência de R e E na faixa de 0-2 HZ (Barnas e cols., 1987; Brusasco e cols., 1989), bem como a presença de histerese na curva volume-pressão quase-estática em pulmões isolados.

Iniciou-se, então, o estudo da mecânica respiratória utilizando-se modelos bicompartimentais que consideravam a heterogeneidade de distribuição de gás nos pulmões (Mead, 1961) e a viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

Na década de 60, foram descritos os primeiros modelos bicompartimentais para estudo da mecânica respiratória, que associavam a natureza multicompartimental do sistema respiratório à heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões (Otis e cols., 1956; Mead, 1969) ou à viscoelasticidade dos tecidos torácicos (Mount, 1955).

Em 1985, Bates e colaboradores expandiram o modelo, originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e por elementos resistivos expressos por amortecedores (Bates e cols., 1985). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido a uma ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguido por uma oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão ocorre uma queda rápida da pressão traqueal ($\Delta P_{1,rs}$), indo do seu valor máximo ($P_{max,rs}$) até um ponto de inflexão ($P_{i,rs}$), seguida por uma queda lenta ($\Delta P_{2,rs}$) até atingir um platô aparente, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório ($P_{el,rs}$).

O modelo de Bates e colaboradores é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que, são submetidos à mesma variação de volume (Figura 6). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas ($R_{nit,L}$), em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática ($E_{st,L}$) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola ($E_{2,L}$) e um amortecedor ($R_{2,L}$), dispostos em série. $E_{2,L}$, $R_{2,L}$ e a constante de tempo correspondente ($\tau_{2,L}=R_{2,L}/E_{2,L}$) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência ($R_{nit,w}$) e pelo corpo de Kelvin, caracterizado pela elastância estática da parede torácica ($E_{st,w}$) e pelos parâmetros que correspondem a viscoelasticidade (E_{2w} , R_2 e τ_{2w}).

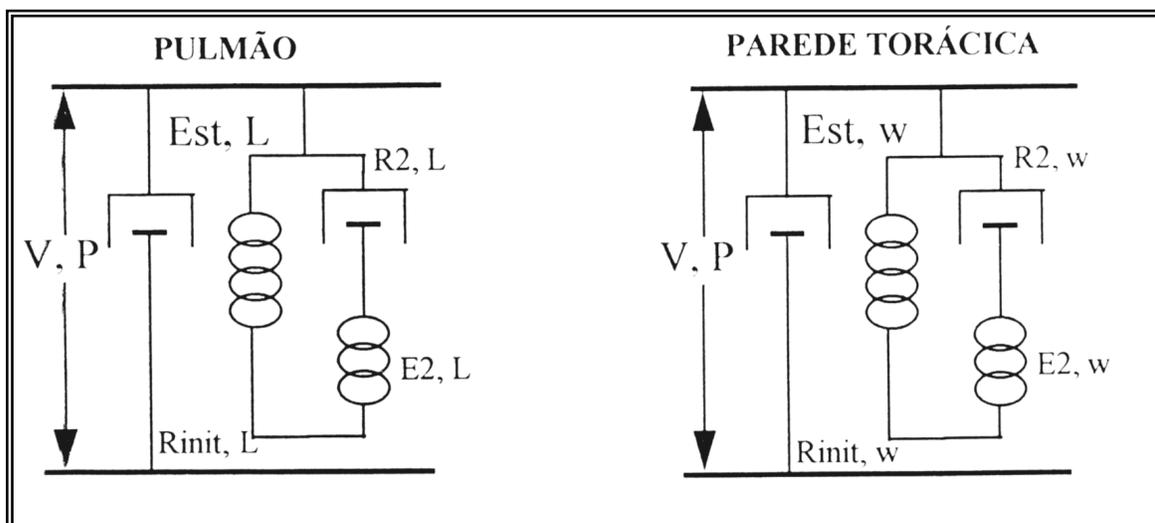


Figura 6. Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório à luz de um comportamento viscoelástico. Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ($R_{init,L}$ e $R_{init,w}$, respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; este composto por componente elástico (Est,L e Est,w , respectivamente) representando a elastância estática dos dois compartimentos em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série ($R2,L - E2,L$, e $R2,w - E2,w$, respectivamente) os quais representam o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga ao volume pulmonar (V) e a tensão entre elas é análoga da pressão de abertura das vias aéreas (P).

Quando esse modelo é alongado (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante (v), a carga da mola $E2$ aumenta com o tempo (T_i) e a velocidade do amortecedor $R2$ se aproxima da velocidade de alongamento (v). Assim, a força exercida pela mola $E2$ aproxima-se de $R2.v$. Se

uma manobra de interrupção de fluxo for realizada, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola E2 se reduz gradualmente até atingir seu comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico lento (ΔP_2), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como equivalente ao relaxamento da mola E2, resultando em dissipação calórica de energia no amortecedor R2.

Baseado no modelo de Bates e cols. (Bates e cols., 1988b), a queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades da constante de tempo e “stress relaxation”, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório. A queda mais lenta da pressão, que ocorre subsequente até ser atingindo o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inhomogeneidade do sistema, as quais são determinadas, respectivamente, pelo “stress relaxation” e “pendelluft” (Bates e cols., 1985; Bates e cols., 1988).

“Stress relaxation” pulmonar é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), o pulmão pode alterar sua tensão com o tempo. Logo, o gradiente de pressão se reduz progressivamente. O “stress relaxation” ocorre após alterações súbitas do comprimento, “strain”. Nesse caso, súbito significa que o tempo necessário para o estiramento é menor do que a constante de tempo (R2.C2). O “stress relaxation”

depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (Horie e cols., 1971). Já o “pendelluft” é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (Otis e cols., 1956; Bates e cols., 1985).

Vários fatores contribuem para o “stress relaxation” no pulmão, como o fenômeno de abertura e fechamento das vias aéreas e espaços alveolares, e as perdas de energia nos tecidos e na interface ar-líquido. As fibras de colágeno e elastina, isoladamente, apresentam pouca adaptação ao estiramento, mas o arranjo da matriz fibro-elástica apresenta contribuição significativa para este fenômeno (Horie e cols., 1971). Alguns autores ressaltam o papel da interface ar-líquido como o principal determinante do “stress relaxation” no pulmão (Horie e cols., 1971).

O comportamento não homogêneo da parede torácica não está completamente esclarecido. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representando pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdome (Peslin e cols., 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo afetada pela contração do diafragma e pela movimentação do abdome (D’Angelo e cols., 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal, ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após a oclusão das vias aéreas (Zin e

cols., 1989). A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento da elastância e resistência, provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (Zin e cols., 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates e colaboradores (Bates e cols., 1985), com subdivisão do sistema em seus componentes pulmonar e parede, foi realizado por Saldiva e colaboradores em 1987 (Saldiva e cols., 1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório (Auler e cols., 1987; Zin e cols., 1989; D'Angelo e cols., 1993), comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes pulmonar e de parede.

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do "pendelluft" (desigualdades de constantes de tempo) e do "stress relaxation" (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (Bates e cols., 1985; Bates e cols., 1988b; Kochi e cols., 1988). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo "stress relaxation" (Bates e cols., 1988; Kochi e cols., 1988; Similowski e cols., 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, através do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares, de parede e do sistema em relação ao fluxo e volume (Kochi e cols., 1988a e 1988b). Em condições de isovolume, as resistências pulmonares intrínsecas do pulmão ($R_{int,L}$), da parede ($R_{int,w}$) e do sistema respiratório ($R_{int,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto a resistência adicional (ΔR_L ;

ΔR_{w} ou ΔR_{rs}), determinada pela dissipação de energia para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo, se reduz. Esse comportamento se reflete na resistência pulmonar total ($R_{tot,L}$) que é maior em baixos fluxos do que em fluxos intermediários. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, $R_{init,L}$; $R_{init,w}$ e $R_{init,rs}$ decrescem, enquanto que $R_{tot,L}$; $R_{tot,w}$ e ΔR_{rs} aumentam (Kochi e cols., 1988; D'angelo e cols., 1989).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado através de estudos experimentais utilizando-se cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea nos pulmões, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (P_i) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostra comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (ΔP_2) ocorre em consequência a um fenômeno distal ao espaço alveolar, ou seja, no tecido pulmonar. Logo, ΔP_2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao stress (Bates e cols., 1988; Saldiva e cols., 1992).

Apesar de haver diversas técnicas que analisam a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração foi bastante utilizado no estudo da mecânica respiratória, tanto em animais, quanto em humanos anestesiados (Bates e cols., 1985; Auler e cols., 1987; Saldiva e cols., 1987; D'Angelo e cols., 1989; D'Angelo e cols., 1994). Este método foi utilizado no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas sobre o

componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.

II. OBJETIVOS

II.1- Objetivo Geral

Comparar os efeitos respiratórios da talidomida, sildenafil, talidomida e sildenafil e LASSBio596 (um híbrido da talidomida e do sildenafil) na lesão pulmonar aguda.

II.2 - Objetivos Específicos

1 - Pelo método de oclusão ao final da inspiração, avaliar as propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas e/ ou inomogêneas após o uso de diferentes inibidores de fosfodiesterase em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo de *E. coli*.

2 - Estudar as alterações morfométricas e a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar.

3 - Correlacionar os achados funcionais com as alterações histopatológicas pulmonares

III. JUSTIFICATIVA

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) /Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) apresenta alta morbidade e mortalidade. Até o momento, não

existe uma opção terapêutica eficaz e o tratamento é de suporte. Sabe-se que a SDRA apresenta fibroelastogênese, além do intenso processo inflamatório. Portanto, seria desejável o desenvolvimento de fármacos com um efetivo perfil antiinflamatório e antifibrogênico e poucos efeitos colaterais (Teixeira e cols., 1997).

Os trabalhos iniciais empregando o LASSBio 596 em modelos de SDRA e de asma demonstraram resultados promissores (Rocco e cols., 2003; Campos e cols., 2006), possivelmente em decorrência da dupla ação antiinflamatória do composto, agindo nas isoenzimas PDE4 e 5 e reduzindo os níveis de fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), como resultado da hibridização molecular utilizada na síntese do 596. Assim, com o objetivo de avaliar se a nova molécula apresenta eficiência terapêutica mais relevante do que a dos fármacos utilizados na sua concepção, separadamente e em associação, eles serão administrados a um modelo de Lesão Pulmonar Aguda induzida por lipopolissacarídeo de *E. coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV. MATERIAIS E MÉTODOS:

IV.1 - Grupos Experimentais:

O estudo utilizou duzentos e quarenta camundongos BALB/c, pesando 25 ± 5 g (média \pm DP), oriundos do biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, divididos aleatoriamente entre seis grupos experimentais tratados 1 ou 6 horas após a indução da lesão:

A - Grupo Controle (C): quarenta camundongos receberam salina e dimetil-sulfóxido (DMSO-veículo) intraperitonealmente (i.p) 1 h (n =20) ou 6 h (n=20) depois da instilação por via intratraqueal (i.t.) de 0,05 mL de salina (0,9% NaCl),

B- Grupo LPS (L): quarenta camundongos receberam salina e dimetil-sulfóxido (0,2 mL, i.p) 1 h (n = 20) ou 6 h (n =20) depois de ser instilada i.t. uma solução contendo 10 μ g de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (cepa 055:B5, Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, EUA) diluídos em solução salina (0,05 mL de solução final),

C- Grupo Talidomida (T): quarenta camundongos receberam talidomida (0,025 μ moles/kg, i.p) 1 h (n =20) ou 6 h (n =20) depois da administração de LPS.

D- Grupo Sildenafil (S): quarenta camundongos receberam sildenafil (0,025 μ moles/kg, i.p) 1 h (n = 20) ou 6 h (n = 20) depois da administração de LPS.

E-Grupo Talidomida-Sildenafil (TS): quarenta camundongos receberam talidomida (0,025 μ moles/kg, i.p) associadamente ao sildenafil (0,025 μ moles/kg) 1 h (n = 20) ou 6 h (n = 20) depois da administração de LPS.

F- Grupo LASSBio596 (596): quarenta camundongos receberam LASSBio596 (0,025 μ moles/kg, i.p) 1 h (n = 20) ou 6 h (n = 20) depois da administração de LPS.

Não houve randomização entre os tempos de tratamento 1 ou 6 horas.

Vinte e quatro horas depois da instilação traqueal, as variáveis da mecânica pulmonar (pressões resistivas e viscoelásticas, e elastância estática) foram computadas. Os animais foram sacrificados após a realização da medida da mecânica respiratória *in vivo* e tiveram seus pulmões removidos para análise da morfometria pulmonar e quantificação da celularidade total.

Alguns animais foram descartados por problemas técnicos ou por apresentarem aspecto sugestivo de doença infecciosa não relacionada à LPA por *E.coli*.

A Tabela 5 mostra o número final de animais utilizados no cálculo das variáveis medidas.

Tabela 5 – Número final de animais utilizados por grupo

GRUPO TRATADO 1 h DEPOIS DA INDUÇÃO DA LESÃO		GRUPO TRATADO 6 h DEPOIS DA INDUÇÃO DA LESÃO	
CONTROLE (C)	11 animais	CONTROLE (C)	12 animais
LPS (L)	20 animais	LPS (L)	20 animais
TALIDOMIDA (T)	13 animais	TALIDOMIDA (T)	15 animais
SILDENAFIL (S)	15 animais	SILDENAFIL (S)	15 animais
TALIDOMIDA E SILDENAFIL (TS)	14 animais	TALIDOMIDA E SILDENAFIL (TS)	14 animais
LASSBio 596 (596)	13 animais	LASSBio 596 (596)	13 animais

LPS, lipopolissacarídeo; C, grupo controle; L, grupo que recebeu LPS; T, S, TS e 596, grupos que receberam LPS e foram tratados com talidomida, sildenafil, talidomida e sildenafil e LASSBio 596, respectivamente.

IV.2 - Mecânica pulmonar:

Nos dias dos experimentos os animais foram sedados com diazepam (0,4 mg/Kg, i.p), pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.). Essa combinação medicamentosa é suficiente para manter o animal em plano anestésico (supressão do reflexo córneo-palpebral) por 1 hora. As medidas de mecânica pulmonar não duraram mais do que 20 minutos.

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma pequena mesa sob foco cirúrgico, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia pela qual se introduziu um jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (0,005 mg/kg peso, através de administração intra-peritoneal).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) e ventilados com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 mL e fluxo de 1 mL/s.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdomen justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal.

Imediatamente antes da perfuração do diafragma a cânula traqueal foi conectada a um transdutor de pressão (ver abaixo). Perfurado o músculo, o traçado de pressão apresentou um deslocamento positivo correspondente à pressão de

retração elástica do pulmão. Essa mesma pressão (cerca de 2 cmH₂O) foi instalada no ventilador artificial como pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (Saldiva e cols., 1992).

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível das linhas axilares anteriores, em toda sua extensão, e seção transversal abaixo da clavícula.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi e cols., 1988a, 1988b; Simlowski e cols., 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (Mortola & Noworaj, 1983), sendo o ventilador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo é constituído por uma cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo, sendo o volume corrente obtido por integração do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão transpulmonar (PL).

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro no nosso circuito, provavelmente foram evitados erros de medida da resistência ao fluxo (Chang e cols., 1981; Loring e cols., 1979). O espaço morto do equipamento foi 0,2 mL. Todos

os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógico para digital (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em um computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData, Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 7).

Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

A mecânica pulmonar foi obtida através da captação de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração (descrito a seguir).

IV.3 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates e cols., 1985), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inomogêneo do sistema respiratório.

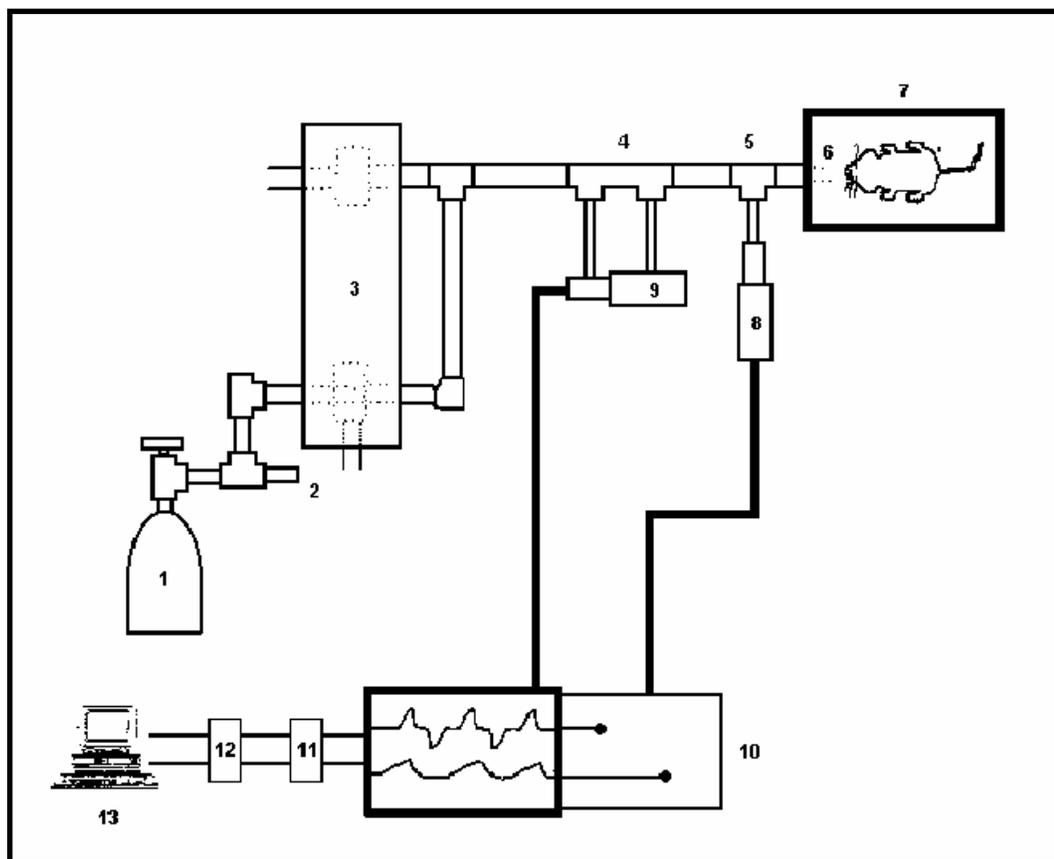


Figura 7 – Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor diferencial de pressão para medida de pressão transpulmonar.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais com amplificação dos sinais de fluxo e pressão transpulmonar.
- 11 - Filtros.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13 - Microcomputador.

Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão (P_i) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}). A diferença de pressão (ΔP_1) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial (P_{max}) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar. A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de pressão no pulmão (ΔP_{tot}) (Figura 8).

As elastâncias estáticas (E_{st}) e dinâmica (E_{dyn}) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se P_{el} e P_i , respectivamente, pelo volume corrente. ΔE é a diferença entre E_{dyn} e E_{st} .

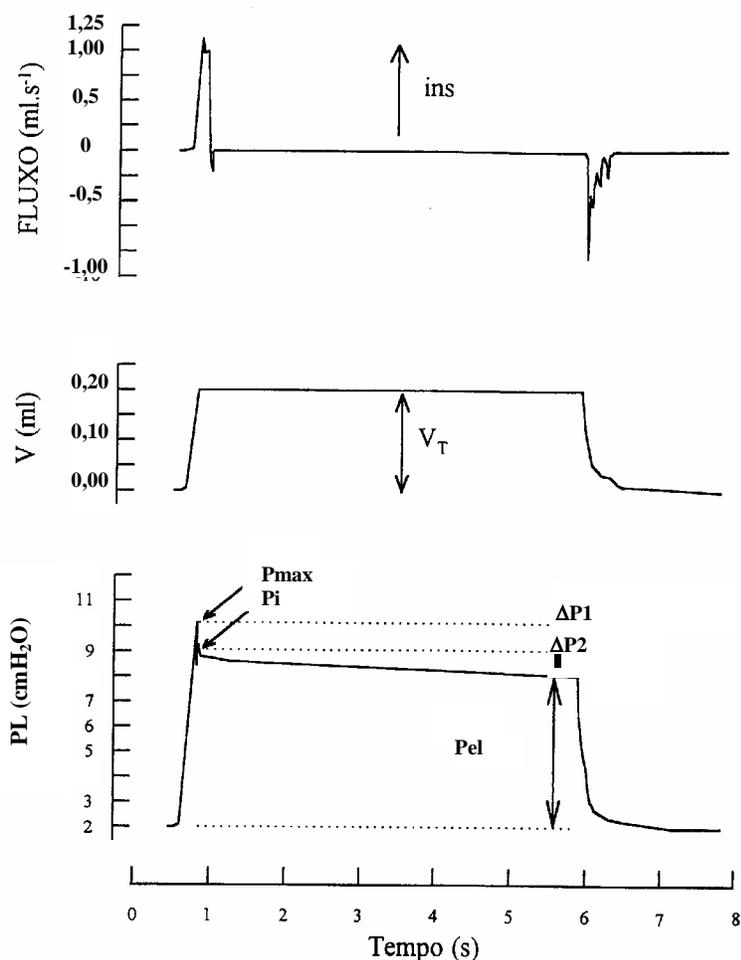


Figura 8 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1$) que corresponde a $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (neste animal).

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo durante os 10 ms em que se realiza a oclusão. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de P_i e P_{el} . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e colaboradores (Kochi e cols., 1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

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

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

$$\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$$

$$E_{st} = P_{el} / V_T$$

$$E_{dyn} = P_i / V_T$$

$$\Delta E = E_{dyn} - E_{st}$$

Onde:

ΔP_1 = variação de pressão dissipada para vencer o componente viscoso pulmonar

ΔP_2 = variação de pressão dispendida para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

P_{max} = pressão pulmonar máxima atingida

P_i = pressão pulmonar no ponto de inflexão

P_{el} = pressão de retração elástica pulmonar

E_{st} = elastância estática do pulmão

E_{dyn} = elastância dinâmica do pulmão

ΔE = diferença entre as elastâncias dinâmica e estática pulmonares

V_T = volume corrente

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 mL/s, foi de 0,8 cmH₂O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída de ΔP_{tot} e ΔP_1 , de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas.

IV.4 - Remoção dos pulmões e análise histopatológica:

Ao término do experimento injetou-se 1 mL de heparina na veia cava inferior e após 2 minutos os animais foram exangüinados por secção da aorta abdominal e veia cava inferior e a traquéia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago era suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração.

Os pulmões foram congelados por imersão rápida em nitrogênio líquido, (aproximadamente 3 min), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o

material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1 h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1h e, em seguida, a -4°C durante 24 h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3 μm de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos ("point-counting") (Gundersen e cols., 1988), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 9). A fração de volume de áreas de unidades alveolares normais, colapsadas ou hiperdistendidas (maior que 120 μm) foi determinada através da técnica convencional de contagem de pontos ("counting point") (Weibel, 1990), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 11). Foram avaliados 10 campos não coincidentes escolhidos randomicamente, em um aumento na ocular do microscópio óptico de 400X. A soma dos pontos que caíam em

área de alvéolo colapsado, normal ou hiperdistendido foi dividida pelo número total de pontos em cada campo analisado.

As células polimorfonuclear e mononuclear e o tecido pulmonar foram avaliados na ampliação 1000X. Os pontos que caem em células polimorfonuclear e mononuclear foram contados e divididos pelo número total dos pontos que caem na área do tecido em cada campo microscópico.

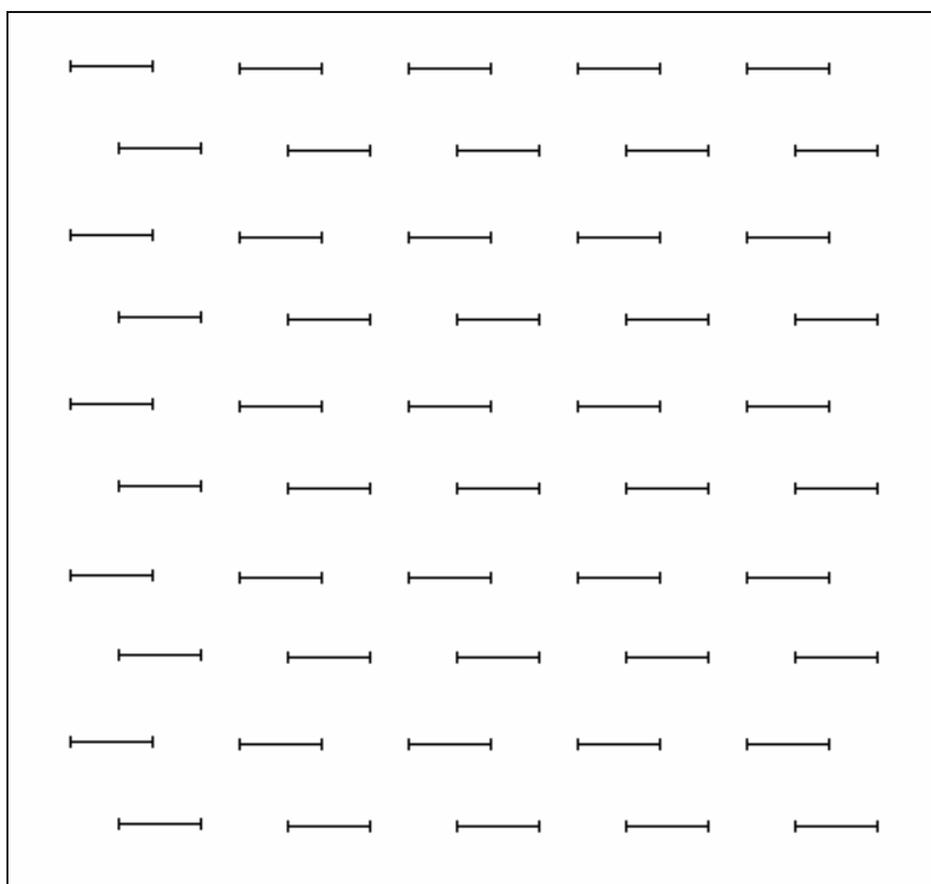


Figura 9 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos

IV.5 – Aspectos éticos

Os animais receberam cuidados em concordância com os “Principles of Laboratory Animal Care”, formulados pela National Society for Medical Research (Estados Unidos da América) e com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” preparado pela United States National Academy of Sciences. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

IV.6 - Análise estatística

Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) para avaliar a normalidade de suas distribuições. A seguir foi aplicado o teste da mediana de Levene para verificar a igualdade de variâncias. Se os dados satisfizessem ambos, eram aplicados testes paramétricos. No caso de qualquer um deles não ser satisfeito, testes não-paramétricos foram empregados.

Os parâmetros mecânicos dos grupos foram comparados através da análise de variância (one-way ANOVA). Quando múltiplas comparações foram necessárias, o teste de Tukey foi aplicado.

Os parâmetros de morfometria, e celularidade foram submetidos à transformada arcoseno, para posteriormente serem comparados através do one-way ANOVA (Zar, 1996), seguido de teste de Tukey quando múltiplas comparações foram necessárias

A relação entre parâmetros mecânicos e morfométricos foi avaliada pela correlação de Spearman.

Em todos os testes, o nível de significância foi 5%.

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SigmaStat v 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA).

RESULTADOS

V- RESULTADOS

V.1. Mecânica respiratória

As diferenças entre os parâmetros de mecânica respiratória (Est, Edyn, ΔE , $\Delta P1$, $\Delta P2$ e ΔP_{tot}) observadas entre os animais do grupo que recebeu salina i.t. e o veículo (DMSO-salina) i.p e dos grupos que receberam 10 μ g LPS i.t. e foram tratados com os diferentes fármacos ou com salina (i.p) uma hora ou seis horas após a indução da lesão, estão também representadas nas figuras 10, 11, 12 e 13. Os animais do grupo L que receberam 10 μ g de LPS apresentaram aumento significativo dos componentes viscoelástico e elástico pulmonar em relação ao grupo controle (C), confirmando a indução de lesão pulmonar.

A talidomida e o sildenafil, administrados 1 h após a indução da lesão pulmonar aguda independentemente ou combinados, apresentaram menor potencial em reduzir a Est em relação ao grupo L (T = 3%, S = 10%, e TS = 0%) (Figura 10) e Edyn (T = 5%, S = 10% e TS = 2%), do que o 596 (Est = 20%, Edyn = 19%) (Figura 10). Apesar de tratados, os animais dos grupos T, S, e TS permaneceram com Est e Edyn maiores do que os respectivos valores no grupo C. Além disso, Est e Edyn dos grupos T, S, e TS não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos do grupo L ao passo que o tratamento com LASSBio596 fez retornar estas variáveis a valores não diferentes dos controles (C), como apresentado na Figura 10.

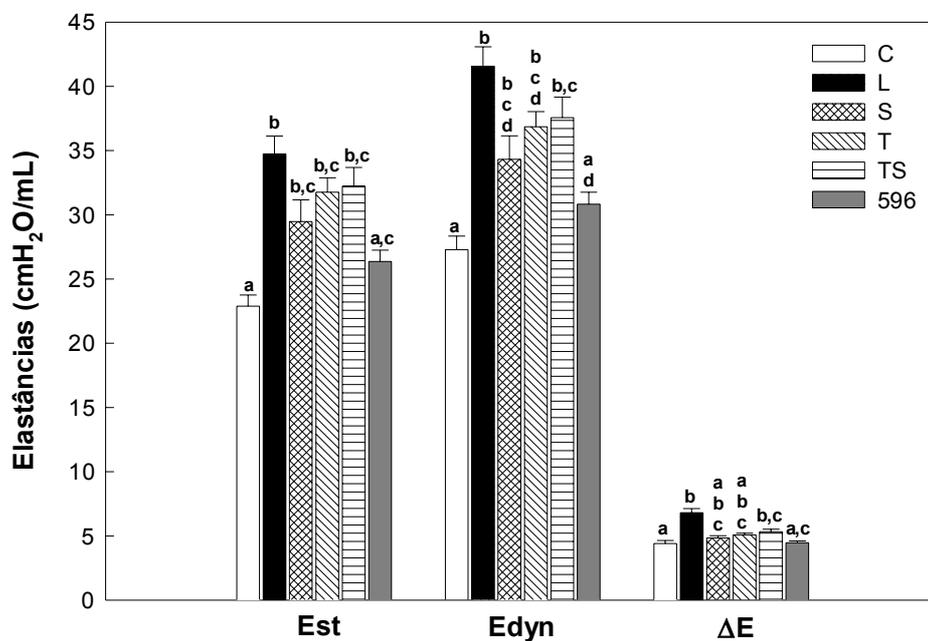


Figura 10 – Elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 1 hora depois da indução da lesão. Est (cmH₂O/mL): elastância estática do pulmão. Edyn (cmH₂O/mL): Elastância dinâmica do pulmão. ΔE (cmH₂O/mL): Edyn - Est. Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo ± erro padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Nos animais tratados 1 h após a lesão, os parâmetros ΔE e ΔP2 tiveram um comportamento semelhante entre si: os grupos T, S e TS apresentaram valores intermediários entre os dos grupos C e L. Em contraponto, o grupo 596 foi o único que não se assemelhou estatisticamente ao grupo L. O componente viscoso (ΔP1) foi similar nos 6 grupos (Figura 11).

O comportamento dos grupos S e 596 foi similar ao controle em relação à variação da pressão total (ΔP_{tot}). (Figura 11).

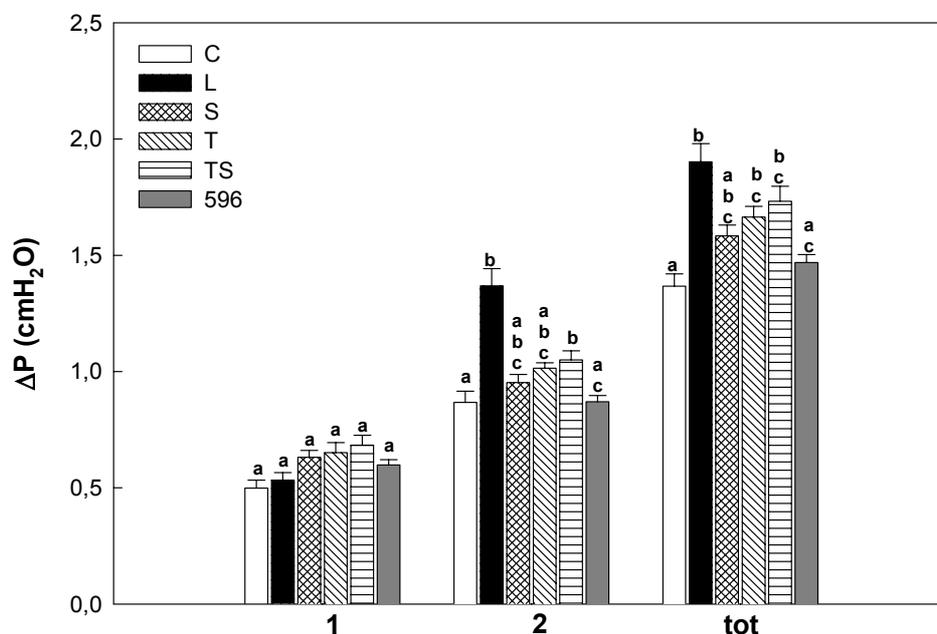


Figura 11 –Variações de pressões do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 1 hora depois da indução da lesão. $\Delta P_1(1)$ reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais e o componente viscoso de pulmão, $\Delta P_2(2)$ está relacionada ao relaxamento da tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar e eventual desigualdades mecânicas no pulmão, ΔP_{tot} reflete as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inhomogêneos pulmonares. $\Delta P_{tot}(tot) = \Delta P_1 + \Delta P_2$ (cmH₂O). Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A talidomida e o sildenafil, administrados 6 h após a indução da lesão pulmonar aguda independentemente ou combinados, apresentaram menor

potencial em reduzir a Est em relação ao grupo L ($T = S = 14\%$, $TS = 8\%$) e Edyn ($T = S = 15\%$, $TS = 8\%$), do que o tratamento com o 596 ($Est = 25\%$, $Edyn = 24\%$) (Figura 12). Apesar de tratados, os animais dos grupos T, S, e TS permaneceram com Est e Edyn maiores do que o grupo C. Além disso, Est e Edyn dos grupos T, S, e TS não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundos do grupo L ao passo que o tratamento com LASSBio596 fez retornar estas variáveis a valores não diferentes dos controles (C), como apresentado na

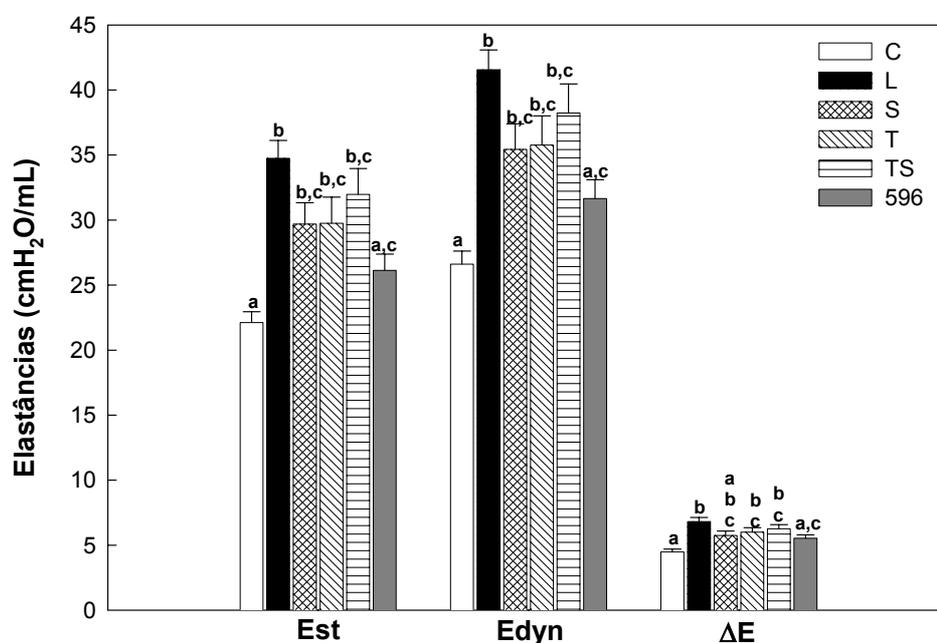


Figura 12. Qualitativamente, os tempos 1 e 6 horas se comportaram de forma similar.

Figura 12 –Variações de pressões do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 6 horas depois da indução da lesão. Est (cmH₂O/mL): elastância estática do pulmão. Edyn (cmH₂O/mL): Elastância dinâmica do pulmão. ΔE

(cmH₂O/mL): Edyn - Est. Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Nos animais tratados 6 h após a lesão, ΔE e ΔP_2 se comportaram de forma muito semelhante: os grupos T, S e TS apresentaram valores similares entre si e aos do grupo L. Em contraponto, o grupo 596 foi o único que não se assemelhou estatisticamente ao grupo L, assemelhou-se ao controle, mas também não foi diferente dos demais tratamentos. O componente viscoso (ΔP_1) foi similar nos 6 grupos (Figura 13).

Em relação à variação da pressão total (ΔP_{tot}), o comportamento dos grupos S e 596 foi similar ao controle, diferentes de L e iguais aos grupos T e TS. (Figura 13).

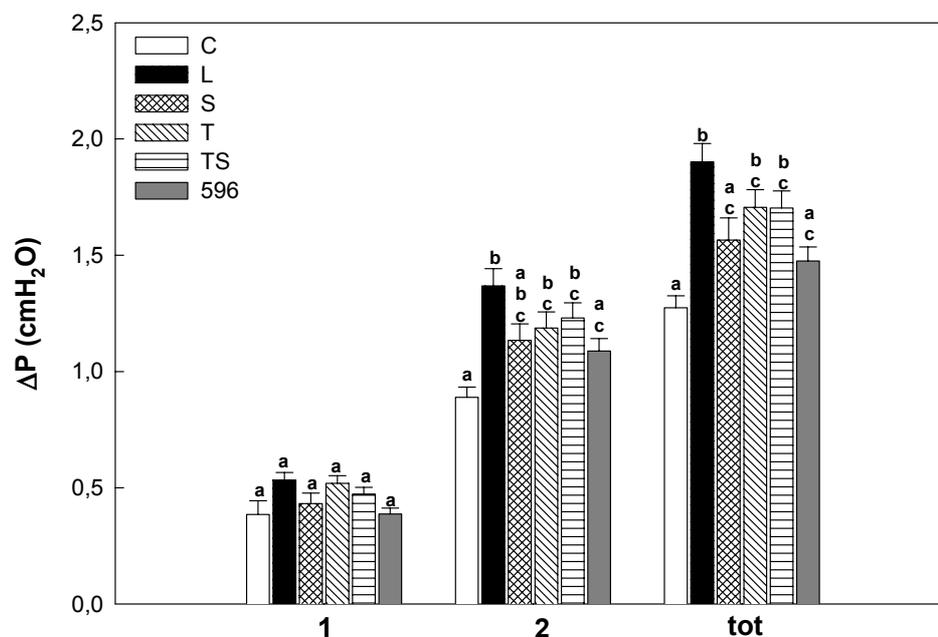


Figura 13 –Variações de pressões do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 6 horas depois da indução da lesão. $\Delta P1(1)$ reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais e o componente viscoso de pulmão, $\Delta P2(2)$ está relacionada ao relaxamento da tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar e eventual desigualdades mecânicas no pulmão, ΔP_{tot} reflete as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inhomogêneos pulmonares. $\Delta P_{tot}(tot)=\Delta P1+ \Delta P2$ (cmH₂O). Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$). Os valores de volume e fluvs.o utilizados durante o evs.perimento estão mostrados no anevs.o não variaram significativamente nos grupos estudados.

V.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

V.2.1. Análise qualitativa

A presença de espessamento de septo foi observada em todos os grupos com lesão pulmonar aguda apresentando-se menos acentuada no grupo 596 independente do momento da administração do fármaco. Nos animais com LPA todos os grupos apresentaram maior percentual de colapso, bem como menor percentual de áreas normais do que o grupo controle (Figuras 14 e 15).

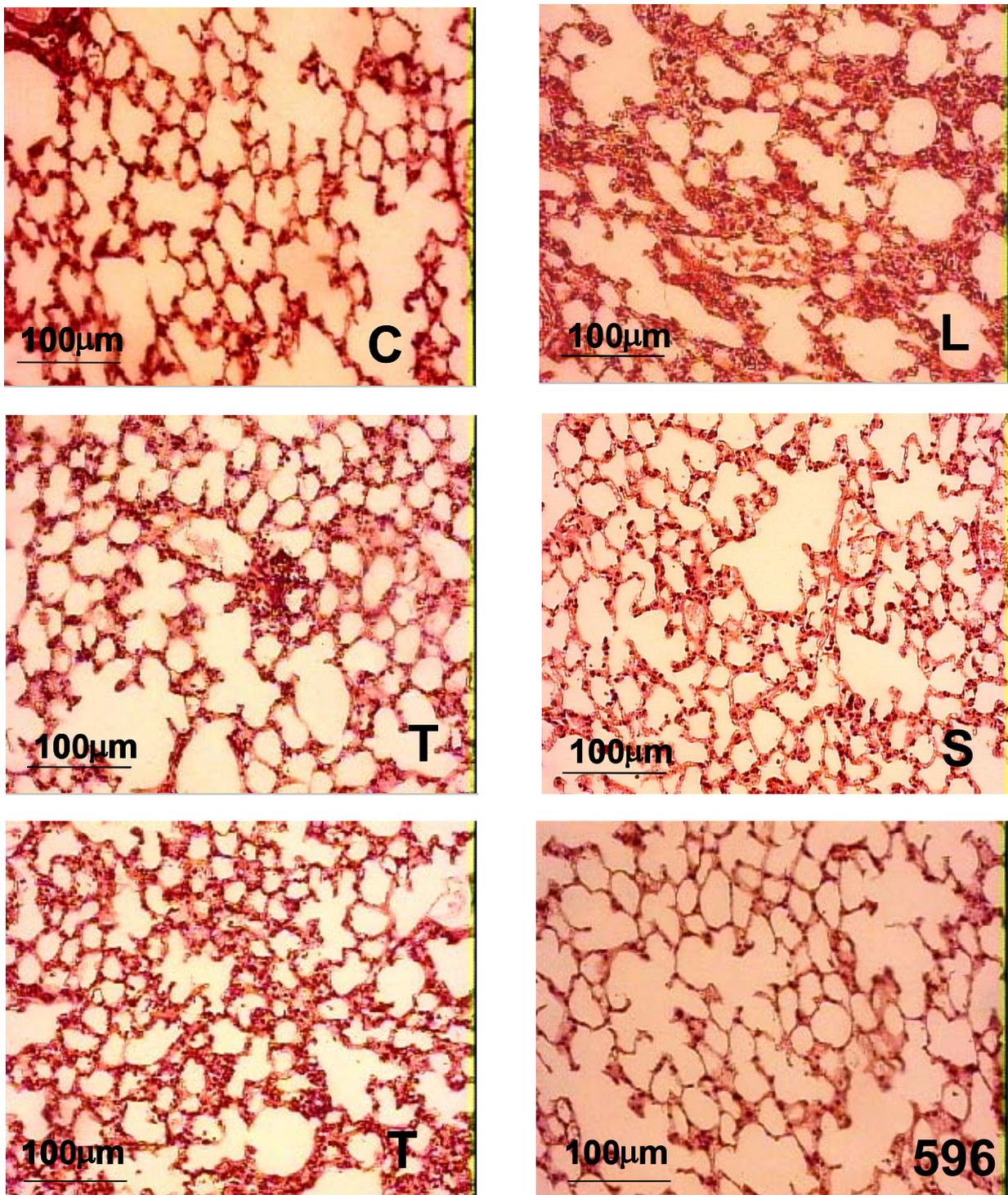


Figura14: Fotomicrografias de parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (C), LPS (L), talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS), LASSBio 596 (596) tratados 1 h após a instilação intratraqueal (i.t) Ampliação original: vs.400. Barras=100 µm.

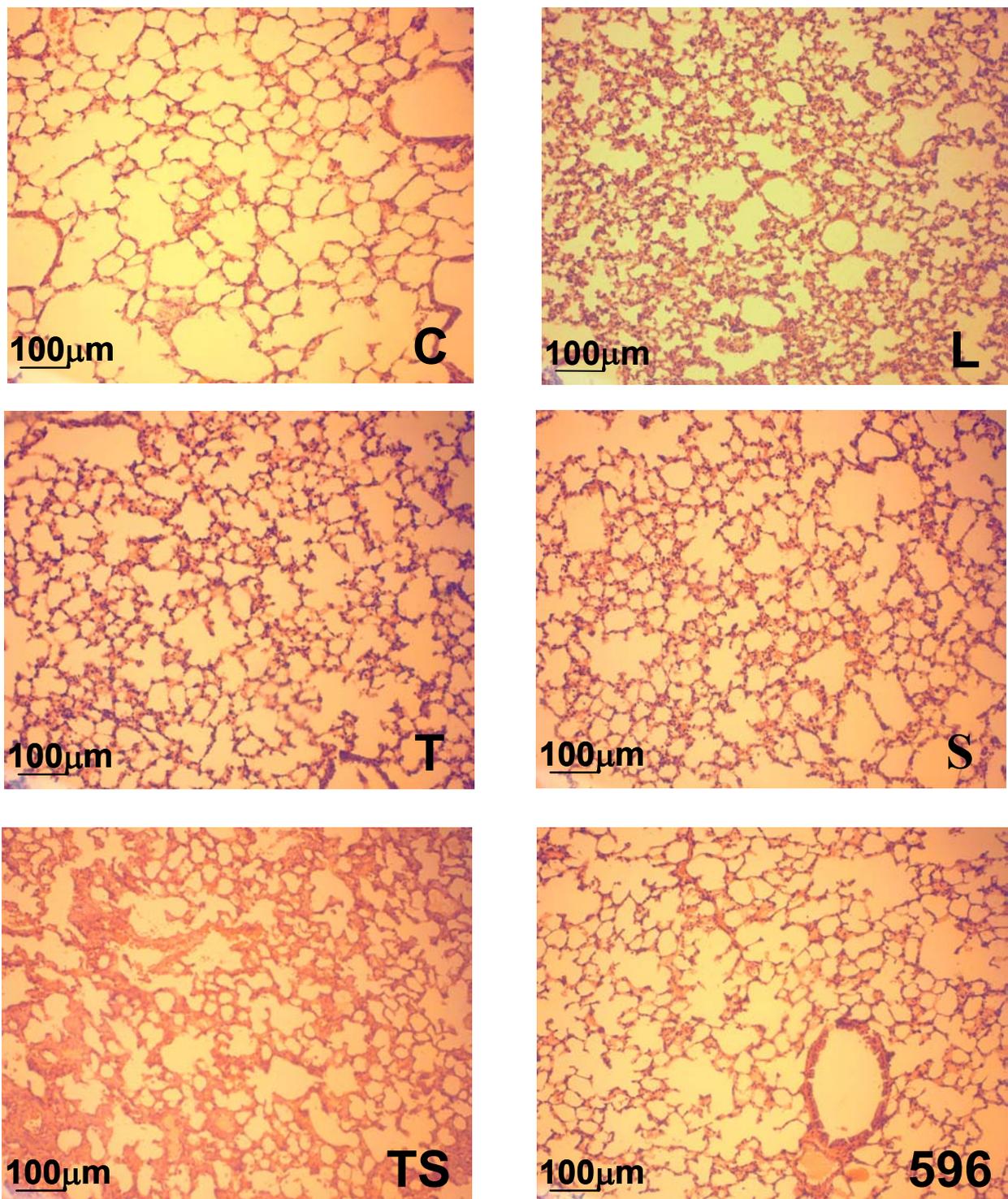


Figura15: Fotomicrografias de parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (C), LPS (L), talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS), LASSBio 596 (596) tratados 6 h após a instilação intratraqueal (i.t) Ampliação original: vs.200. Barras=100 µm.

V.2.2. Análise quantitativa

Os valores obtidos na análise quantitativa dos grupos C, L, T, S, TS e 596 são apresentados nas tabelas 8, 9, 10 e 11. Os valores representam a média de 10 lâminas por grupo, com a observação de 5 a 10 campos por lâmina. Sendo as tabelas 8 e 9 representativas da celularidade pulmonar e as tabelas 10 e 11 representativas da morfometria pulmonar.

No grupo que recebeu anti-inflamatórios 1 h após a indução da lesão, a quantificação dos campos analisados evidenciou aumento significativo de PMN total para os grupos L, T, S, TS, 596 (Tabelas 6). O número total de MN foi significativamente menor nos grupos T e 596, quando comparados ao grupo L, que não diferiu de S e TS. Todos os tratamentos foram eficientes em reduzir a quantidade de células PMN em relação a L, embora o fármaco 596 tenha apresentado uma melhor performance.

Os animais tratados 6 horas após a indução da lesão apresentaram uma redução significativa no número de PMN em relação a L em todos os tratamentos, com exceção de TS. O grupo 596 foi diferente dos demais tratamentos e aquele que mais se aproximou dos animais controle. Em relação aos MN apenas os tratamentos S e 596 mostraram-se significativamente diversos do grupo L. O grupo 596 foi o que mais se aproximou de C (Tabela 7).

Tabela 6 – Percentual de mononucleares e de polimorfonucleares dos grupos controle e submetidos a diferentes tratamentos uma hora após a lesão.

	C	L	T	S	TS	596
PMN	8,7±0,28 ^a	31,6±1,04 ^b	24,0±1,13 ^c	23,1±1,46 ^c	26,2±1,19 ^c	17,7±0,90 ^d
% de inibição de PMN	–	–	24,1	26,9	17,1	44,0
MN	28,9±0,95 ^a	17,8±1,27 ^b	21,7±0,51 ^c	17,1±0,66 ^b	16,8±0,82 ^b	21,5±0,69 ^c

Percentual de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) e percentual de inibição de células polimorfonucleares (PMN) pelos fármacos no tempo 1 hora depois da indução da lesão. Os valores correspondem à média de 5 a 10 campos por lâmina ± erro padrão (10 lâminas por grupo). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Percentual de mononucleares e de polimorfonucleares dos grupos controle e submetidos a diferentes tratamentos seis horas após a lesão.

	C	L	T	S	TS	596
PMN	10,8±0,65 ^a	38,1±0,79 ^b	32,9±0,67 ^c	24,6±1,08 ^d	35,6±1,30 ^{b,c}	17,2±0,73 ^e
% de inibição de PMN	–	–	13,6	35,4	6,6	54,9
MN	31,5±0,43 ^a	7,8±0,47 ^b	11,7±0,65 ^b	21,0±1,69 ^c	8,6±1,23 ^b	27,1±1,08 ^d

Percentual de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) e percentual de inibição de células polimorfonucleares (PMN) pelos fármacos no tempo 6 horas depois da indução da lesão. Os valores correspondem à média de 5 a 10 campos por lâmina \pm erro padrão (10 lâminas por grupo). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Na análise morfométrica do parênquima pulmonar dos animais tratados em 1 hora, observou-se uma redução significativa na fração de alvéolos normais nos grupos que receberam 10 μ g de LPS (i.t.) (Tabela 8). Nos animais tratados, houve diferenças significativas na seguinte ordem: TS < T = S < 596. Naturalmente a quantidade de colapso mostrou-se a imagem especular desses achados. Não foram encontradas unidades alveolares hiperinsufladas.

Tabela 8 – Morfometria do parênquima pulmonar uma hora após a lesão.

	C	L	T	S	TS	596
Normal (%)	96,3±0,58 ^a	47,3±1,19 ^b	78,5 ±2,40 ^c	79,7±1,39 ^c	60,3±1,08 ^d	88,9±0,94 ^e
Colapso (%)	3,7±0,58 ^a	52,7± 1,19 ^b	21,5±2,40 ^c	20,3±1,39 ^c	39,7±1,08 ^d	11,1±0,94 ^e
% de redução de Colapso	–	–	59,2	61,5	24,7	78,9

Fração de área de alvéolos normais e colapsados, dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S) e talidomida mais sildenafil (TS) administrados e LASSBio596 (596) e percentual de redução de fração de área de alvéolos colapsados pelos fármacos administrados 1 hora depois da indução da lesão. Os valores correspondem à média de 5 a 10 campos por lâmina ± erro padrão (10 lâminas por grupo). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No grupo 6 horas (Tabela 9) observou-se uma redução similar nos grupos L, T, S e TS em relação ao controle. O grupo 596 mostrou uma percentagem de alvéolos normais intermediária entre aquelas de C e dos outros grupos. As áreas colapsadas dos grupos L, T, S e TS foram iguais entre si e maiores do que nos animais controle (C). Uma vez mais, o grupo tratado com LASSBio 596 (596) apresentou-se em posição intermediária entre o grupo C e os demais grupos.

Tabela 9 – Morfometria do parênquima pulmonar seis horas após a lesão.

	C	L	T	S	TS	596
Normal (%)	95±0,41 ^a	47,3±2,05 ^b	55,2±3,85 ^b	55,5±3,81 ^b	57,5±4,11 ^b	71,3±2,83 ^c
Hiperinsuflação (%)	0 ±0,00 ^a	1,5±0,60 ^a	2,8±1,16 ^a	3,1±1,87 ^a	3,6±1,59 ^a	0,9±0,38 ^a
Colapso (%)	5±0,41 ^a	51,2±1,79 ^b	42±3,66 ^b	41,4±2,55 ^b	38,9±3,83 ^b	27,8±3,60 ^c
% de redução de Colapso	–	–	18,0	19,1	24,0	45,7

Fração de área de alvéolos normais e colapsados e hiperinsuflados, dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S) e talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) e percentual de redução de fração de área de alvéolos colapsados pelos fármacos administrados 6 horas depois da indução da lesão. Os valores correspondem à média de 5 a 10 campos por lâmina ± erro padrão (10 lâminas por grupo). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

V.3. CORRELAÇÃO ENTRE ACHADOS MECÂNICOS E MORFOMÉTRICOS

Foi observada uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre todos os parâmetros de mecânica pulmonar obtidos nos animais com LPA induzida por LPS e a fração de área de colapso alveolar, indicando que a melhora

funcional provocada pelos fármacos se relacionou diretamente com a prevenção do colapso alveolar e do recrutamento de células inflamatórias (PMN) independente do momento da administração dos fármacos.

Tabela 10 :Correlação dos parâmetros da morfometria e celularidade com a mecânica pulmonar Animais tratados 1 hora após a indução da lesão

Parâmetros	Coefficiente de correlação	Valor de P
ΔE VS. C	$r = 0,46$	$p < 0,001$
EST VS. C	$r = 0,58$	$p < 0,001$
$\Delta P2$ VS. C	$r = 0,42$	$p < 0,001$
ΔE VS. PMN	$r = 0,47$	$p < 0,001$
Est VS. PMN	$r = 0,52$	$p < 0,001$
$\Delta P2$ VS. PMN	$r = 0,47$	$p < 0,001$

Varição de elastância (ΔE), fração de área de alvéolos normais e colapsados (C), elastância estática do pulmão (Est), $\Delta P2$ (cmH₂O): pressões dissipadas para vencer a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares Percentual de células polimorfonucleares (PMN). A correlação entre os parâmetros funcionais e morfométricos foi determinada pelo teste de correlação de Spearman

Tabela 10 :Correlação dos parâmetros da morfometria e celularidade com a mecânica pulmonar Animais tratados 6 horas após a indução da lesão

Parâmetros	Coefficiente de correlação	Valor de P
ΔE VS. C	$r = 0,51$	$p < 0,001$
EST VS. C	$r = 0,49$	$p < 0,001$
$\Delta P2$ VS. C	$r = 0,52$	$p < 0,001$
ΔE VS. PMN	$r = 0,48$	$p < 0,001$
Est VS. PMN	$r = 0,44$	$p < 0,001$
$\Delta P2$ VS. PMN	$r = 0,50$	$p < 0,001$

Varição de elastância (ΔE), fração de área de alvéolos normais e colapsados (C), elastância estática do pulmão (Est), $\Delta P2$ (cmH₂O): pressões dissipadas para vencer a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares Percentual de células polimorfonucleares (PMN). A correlação entre os parâmetros funcionais e morfométricos foi determinada pelo teste de correlação de Spearman

DISCUSSÃO

O presente estudo é inédito pela comparação dos efeitos de conhecidos agentes farmacológicos (talidomida e sildenafil) com um fármaco concebido através da hibridação molecular destes (i.e., LASSBio 596) sobre a função pulmonar, morfometria e recrutamento de células inflamatórias em um modelo de LPA/SDRA. Estudo anterior com o mesmo modelo experimental (LPA induzida por LPS de *E. coli*) revelou que LASSBio 596 protegeu os camundongos, mantendo os valores das variáveis mecânicas idênticos àqueles do grupo controle, e apresentando menor colapso de espaços aéreos, com normalização do número de polimorfonucleares (Rocco e cols., 2003). Nosso trabalho amplia esses conhecimentos, estudando pela primeira vez os efeitos da talidomida e do sildenafil (e sua aplicação conjunta) sobre a mecânica, celularidade e morfometria pulmonares em camundongos portadores de LPA/SDRA. Além disso, aqueles tratamentos foram comparados entre si e com o LASSBio 596.

A comparação entre os efeitos dos fármacos testados foi feita com base: 1) na análise da mecânica respiratória (pressões elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares), 2) no estudo da morfometria pulmonar (fração de área de alvéolos normais e colapsados) e 3) na quantificação da celularidade pulmonar. Os fármacos testados nas doses do presente estudo demonstraram efeito inibitório sobre o recrutamento de células PMN e colapso alveolar. Em relação às disfunções da mecânica pulmonar observadas no modelo murino de LPA/SDRA, apenas o fármaco LASSBio 596 demonstrou ser significativamente eficaz em reduzir as alterações funcionais independentemente do momento da administração (Figuras 10 e 11).

VI.1 – Modelo

Na década passada, houve uma explosão no entendimento da fisiopatologia da LPA/SDRA. Todavia, a moderna farmacologia e a terapia intensiva falharam em alterar o curso clínico dessa complexa condição. O uso de modelos animais possibilitou enormemente o entendimento da lesão e possui papel central no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Existe uma enorme variedade de espécies animais disponíveis para a pesquisa biológica, e uma parte importante da interpretação dos resultados é a cuidadosa seleção da espécie. Como regra geral, a espécie filogeneticamente mais próxima à humana possui a melhor correlação clínica. Porém, algumas espécies são particularmente resistentes aos efeitos das endotoxinas, e nosso experimento exigia um número considerável de animais. Por esse motivo, escolhemos camundongos, já que eles reproduzem as características da LPA/SDRA humana e não necessitam de um período muito longo de tempo para se encontrarem em condições de uso, após seu nascimento. Além disso, a possibilidade de controlar as variáveis ambientais e patológicas em animais de experimentação justificou, no nosso experimento, a opção por pequenos animais. As condições predisponentes associadas à LPA/SDRA podem ser agrupadas naquelas que derivam de uma agressão direta ou indireta ao pulmão.

Vários modelos e substâncias têm sido utilizados para um melhor entendimento da patogênese da SDRA. Dentre eles, podemos citar aqueles produzidos por ácido oleico (Slutsky e cols., 1980; Schuster., 1994), bleomicina

(Snider e cols., 1978), embolia aérea (Clack e cols., 1984), paraquat (Manktelow, 1967; Mello, 1996) e o modelo de ligação/perfuração cecal (CLP) (Baker e cols., 1983). Porém, modelos que utilizam endotoxinas são utilizados com maior frequência porque o sistema respiratório está continuamente exposto aos baixos níveis de LPS presentes no ar, incluindo poeira orgânica (Rylander e cols., 1985), poluição atmosférica (Kline e cols., 1999) e fumaça de cigarro (Hasday e cols., 1999). Por fim a sepse por bactérias gram negativas constitui um dos maiores problemas nas unidades de terapia intensiva e o principal fator causal da SDRA (Hudson e cols., 1995; Bone, 1996a; Bone, 1996b; Nys e cols., 2000).

O LPS biologicamente ativo também pode ser encontrado em altas concentrações no tabaco dos cigarros (aproximadamente 0,2 µg de LPS/cigarro), a fase particulada da fumaça do cigarro contém níveis suficientes de para provocar bronquite crônica (Hasday e cols., 1999). Indivíduos que fumam vários maços de cigarros por dia estão expostos à mesma carga de LPS dos trabalhadores de fábricas têxteis de algodão (30 a 60 µg de LPS/dia), os quais são susceptíveis a desenvolver berrinose. Experimentos envolvendo a inalação de LPS nebulizado provocam um influxo de neutrófilos no espaço alveolar, obstrução de via aérea, hiperresponsividade brônquica e extravasamento de proteínas no tecido pulmonar. Por esse motivo, o estudo da endotoxemia provocada por LPS, inalado ou injetado intravenosamente, é muito freqüente e de grande importância. A administração intravenosa de pequenas doses de endotoxinas em seres humanos saudáveis é um modelo comumente utilizado para reproduzir as alterações que ocorrem nas fases iniciais de uma sepse por gram-negativos. A

resposta geralmente inclui febre, leucopenia seguida de leucocitose, ativação das células fagocíticas e endoteliais e liberação de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8), aumento do estímulo neuro-muscular respiratório e dispnéia (Preás e cols., 2001; Suffredini e cols., 1992).

Em modelos experimentais de SDRA, diferentes respostas pulmonares surgem quando a lesão é aplicada diretamente no alvéolo, como no caso de instilação intratraqueal de: endotoxina (Terashima e cols., 1994; Tasaka e cols., 1996), complemento (Shaw e cols., 1980), fator de necrose tumoral (Tutor e cols., 1994), bactérias (Johanson e cols., 1985) ou quando os pulmões são lesados indiretamente por substâncias tóxicas injetadas intravenosa (Muller-Leise e cols., 1993) ou intraperitonealmente (Seindenfeld e cols., 1986). Após uma lesão de causa direta, a primeira estrutura comprometida é o epitélio pulmonar. A lesão epitelial localiza as anormalidades no espaço intra-alveolar, com preenchimento dos espaços aéreos com edema, fibrina, colágeno, e agregados neutrofílicos, uma descrição característica de “consolidação pulmonar” (Pelosi, 2000). A lesão pulmonar decorrente de uma agressão indireta lesa principalmente o endotélio vascular pulmonar, com conseguinte aumento da permeabilidade da barreira endotelial, com ativação e recrutamento de várias células e mediadores inflamatórios.

O componente LPS das bactérias gram negativas desempenha o principal papel no disparo de processo inflamatório resultando em LPA/SDRA. O LPS produz um modelo bem caracterizado de LPA, mimetizando as alterações morfológicas e funcionais observadas na situação clínica secundária à exposição

natural ao LPS presente na atmosfera, constituindo um modelo de lesão pulmonar direta (Meyrick e cols. 1986, Gonçalves de Moraes e cols.,1996). O pulmão freqüentemente representa o primeiro órgão a apresentar falência com características de LPA/SDRA: edema pulmonar não-cardiogênico em consequência da lesão do epitélio pulmonar e inflamação pulmonar difusa (Brigham e cols., 1986; Welbourn e cols.,1992). Dessa forma, por replicar com alto grau de fidelidade muitos dos aspectos da LPA/SDRA no homem (Meyrick e cols., 1986) e por permitir, também, avaliar o efeito de fármacos sobre a inflamação pulmonar (Szelenyi, 2000), o modelo murino de LPA/SDRA, utilizando camundongos BALB /c, foi adotado no presente estudo.

Foi demonstrado por Menezes e colaboradores (2005), que a administração de 10 µg de LPS (i.t) era capaz de comprometer a função e a morfologia pulmonares, modificar níveis de citocina (IL-6, interleucina 6; KC,homólogo da função da interleucina 8 e IL-10, interleucina 10), provocar infiltração neutrofílica no BALF, aumentar o conteúdo de fibras elásticas e colágenas nos septos alveolares e induzir apoptose alveolar compatível com a fase inicial da LPA/SDRA. A análise de todos esses parâmetros foi realizada 24 horas após a indução da lesão. A dose de LPS de *E.coli* utilizada foi aquela capaz de produzir um aumento de 50% na elastância estática. Esse mesmo protocolo foi utilizado neste trabalho.

VI.2 – Fármacos

Durante a resposta imunológica normal, baixos níveis de TNF- α têm um importante papel na defesa contra agentes infecciosos, lesão tecidual e

tumores. Por outro lado uma superprodução de TNF- α pode induzir doenças inflamatórias, auto-imunes e neoplásicas. O fato que a superprodução de TNF- α está associada com uma vasta rede de condições patológicas tem induzido esforços em encontrar vias para diminuir a sua produção ou inibir seus efeitos. Várias drogas imunossupressoras são usadas para tal fim. Entretanto, como cresceu bastante a compreensão acerca dos mecanismos provavelmente envolvidos com a produção de TNF- α e sua ação nas células, surgiram estratégias mais específicas. Como resultado, houve a criação de novos fármacos e a modificação de fármacos já existentes com o objetivo de diminuir a toxicidade, e criar alternativas mais potentes e mais específicas (Kunkel e cols.,1996).

A talidomida é um fármaco usado para tratar diferentes doenças inflamatórias sendo também um inibidor da expressão de TNF- α . Em 1993 verificou-se que o mecanismo de inibição da indução de TNF- α por LPS desempenhado pela talidomida relaciona-se ao aumento da degradação do RNAm de TNF- α . A talidomida demonstrou diminuir a meia-vida do TNF- α de forma dose-dependente, sem afetar a síntese de proteínas totais ou a produção de outras citocinas, isto é, mantendo a imunidade intacta (Moreira e cols., 1993). Macrófagos do BALF (*bronchoalveolar lavage fluid*) de pacientes com tuberculose e outras doenças associadas com a ativação de macrófagos ao serem estimulados por LPS em combinação com talidomida ou dexametasona apresentam respostas similares em relação à habilidade de reduzir a produção de TNF- α independentemente da doença de base (Tavares e cols.,1997). Em 2001, foi documentada a capacidade da talidomida em bloquear a ativação de NF- κ B por

meio de um mecanismo envolvendo a inibição da atividade da quinase I κ B (Keifer e cols., 2001). Levando em consideração os sérios efeitos adversos relacionados ao uso da talidomida, novas estratégias vêm sendo desenvolvidas utilizando este fármaco como um protótipo para o desenvolvimento de novos compostos com uma melhor atividade seletiva anti-TNF- α , menor toxicidade e melhor biodisponibilidade.

Os inibidores da família de PDE podem ser uma opção terapêutica eficaz na LPA/SDRA, como relatado em alguns estudos clínicos recentes (Holzmann e cols.,2001; Kudoh e cols.,2001). A pentoxifilina, um inibidor de PDE (Kudoh e cols.,2001; Creamer e cols., 2001), produziu resultados benéficos em seres humanos com ARDS (Bursten e cols., 1996). Em contraste, um estudo recente executado em pacientes com LPA/SDRA fazendo uso do lisofilina, um composto antiinflamatório relacionado quimicamente à pentoxifilina (Bursten e cols., 1998), não mostrou nenhum resultado positivo (Browner e cols., 2001). Rolipram, um potente inibidor de PDE 4, inibiu eficazmente a LPA induzida pelo lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), quando administrado antes ou depois do LPS (Miotla e cols., 1998). Seu efeito protetor é associado com a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (Sekut e cols., 1995; Teixeira e cols., 1997), a inibição do acúmulo dos neutrófilos nos pulmões (Teixeira e cols., 1997), e a atenuação da ativação de polimorfonucleares (PMN) após seu sequestro (Teixeira e cols., 1997; Miotla e cols., 1998;).

O sildenafil, um inibidor seletivo de PDE 5, aumenta os níveis de GMPc e promove a vasodilatação pulmonar seletiva (sem vasodilatação sistêmica),

reduzindo a resistência vascular pulmonar pressão capilar e, assim, possivelmente promovendo a resolução do edema pulmonar e melhorando a troca gasosa (Ichinosee cols., 2000). Demonstrou-se, em um modelo de transplante pulmonar, que o sildenafil é capaz de estender o tempo de vida e prevenir a falência inicial do enxerto, aumentando, portanto, a tolerância à isquemia. Além disso, o edema gerado após a reperfusão foi substancialmente diminuído (Korom e cols., 2006; Schütte e cols., 2000). Além disso, o efeito do sildenafil foi estudado em dois modelos de doença das vias aéreas em cobaio. Essa foi a primeira demonstração de efeitos antiinflamatórios do sildenafil.

O LASSBio 596, projetado estruturalmente como híbrido de talidomida e sildenafil, exibe um amplo perfil antiinflamatório e imunomodulatório (Lima e cols., 2002). A molécula deste novo análogo da talidomida não contém o anel glutarimídio, responsável pelos efeitos teratogênicos da talidomida, o que garante a ausência de quaisquer eventuais efeitos teratogênicos no uso de LASSBio 596. O mecanismo pelo qual o 596 modula o processo inflamatório está relacionado à inibição dos tipos 4 e 5 da fosfodiesterase (PDE). Os tipos 4 e 5 das isoenzimas de PDE regulam a quebra dos segundos mensageiros intracelulares AMP-cíclico e GMP-cíclico, respectivamente. A inibição de PDE aumenta os níveis intracelulares do AMP-c e do GMP-c, conduzindo à inibição da função de vários tipos de células incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, e as células epiteliais do pulmão (Teixeira e cols., 1997). O composto 596 apresenta perfil antiinflamatório duplo, agindo sobre as isoenzimas de PDE e reduzindo os níveis TNF- α .

Vários compostos inibem, através da elevação do AMPc, a produção de TNF- α induzida por LPS por meio do aumento da produção de IL-10 (Hasko e cols, 1998; Marchant e cols.,1996), mas um estudo com rolipram comprovou a inibição de TNF- α na ausência de aumento na concentração de IL-10 (Eigler e cols.,1998). Em relação ao mecanismo de ação, não está ainda determinada a extensão dos efeitos benéficos do LASSBio 596 em relação ao TNF- α : se decorrem da supressão da produção de TNF- α ou da supressão da sinalização das citocinas ou por ambos os mecanismos.

São conhecidos os efeitos do 596 sobre a função e histologia pulmonar na dose de 10 mg/kg administrado por via intraperitoneal (Rocco e cols., 2003) e sabe-se que a talidomida na dose de 10 mg/kg promove uma visível redução no influxo de neutrófilos no fluído do lavado broncoalveolar (Lima e cols., 2002; Légora e cols., 2005). Entretanto, como os compostos apresentam diferentes pesos moleculares, a dose utilizada para cada fármaco foi calculada em relação ao peso molecular de cada um, isto é, 0,025 μ mol/kg de peso corporal permitindo estabelecer a potência comparativa entre os fármacos estudados e o LASSBio 596.

VI.3 – Desenho experimental

Os camundongos utilizados neste estudo sofreram randomização no tocante ao efeito dos tratamentos, mas não em relação ao tempo de aplicação dos bloqueadores das PDEs (1 ou 6 horas). Assim, não nos foi possível comparar os resultados dos diferentes tempos.

VI.4 - Mecânica Pulmonar

Nesse estudo, medidas da função pulmonar foram usadas como instrumentos para analisar o valor terapêutico dos fármacos (talidomida, sildenafil, talidomida - sildenafil em associação e LASSBio 596). Mensurar parâmetros da função pulmonar em animais tão pequenos quanto os camundongos representa um desafio. Entretanto, está comprovado que, com o equipamento adequado, como foi o caso do presente estudo, as medidas são fiéis e fornecem informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças pulmonares (Irvin e Bates, 2003).

Uma vez que os agentes farmacológicos a serem testados atuam no pulmão, optamos pela retirada da caixa torácica ântero-lateral, pois, assim, a medida da pressão na abertura das vias aéreas representa a pressão transpulmonar, isto é, aquela utilizada para movimentar o pulmão, simplificando a preparação. Ademais, evita-se o ruído mecânico introduzido nas medidas pelo batimento cardíaco, levando à maior precisão nos dados obtidos.

Em função dessa retirada, para evitar o colapso das vias aéreas e manter a capacidade residual funcional fisiológica o valor da PEEP a ser aplicado foi medido em cada animal e, em média correspondeu a 2 cmH₂O, como descrito em roedores por Saldiva e colaboradores (1992).

Além disso, durante a anestesia, há formação de áreas de atelectasia com conseqüente redução da capacidade residual funcional (CRF) (Powers e cols., 1973; Hedenstierna, 1990). A aplicação de PEEP fisiológica leva a pelo menos

três conseqüências fisiológicas individualizadas: manutenção do número de alvéolos ventilados (ou seja, não diminui a CRF), queda do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar (Powers e cols., 1973), sendo que os dois últimos são evitados pela remoção do plastrão esternal, como no presente estudo, pois não há compressão da veia cava e nem da aorta.

A análise da mecânica respiratória através do método de oclusão ao final da inspiração, com fluxo e volume constantes, permite o estudo das propriedades elásticas, viscosas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares (Bates e cols., 1985, 1988; Saldiva e cols., 1992). Este método tem sido amplamente utilizado, permitindo a avaliação da mecânica respiratória em animais e seres humanos anestesiados (Saldiva e cols., 1987; D'Angelo e cols., 1989, 1994), em procedimentos cirúrgicos (Auler e cols., 1987; Zin e cols., 1989; Rodrigues e cols., 1993; Moreira e cols., 1995; Rocco e cols., 1999), em teste de drogas (Aires e cols., 1997; Sakae e cols., 1992, 1994), assim como em diferentes situações clínicas (Augusto e cols., 1995; Auler e cols., 1992; Martins e cols., 1988; 1990; Moreira e cols., 1997; Sousa e cols., 1995). Por permitir a observação das alterações em inúmeros parâmetros: ΔP_{tot} , que reflete as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inomogêneos pulmonares, ΔP_1 reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais e o componente viscoso de pulmão, ΔP_2 está relacionada ao relaxamento da tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar e eventual desigualdades mecânicas no pulmão (Bates e cols., 1988; D'Angelo e cols., 1989; Saldiva e cols., 1992). As medidas da elastância estática pulmonar refletem melhor as propriedades

elásticas, pois espelham as variações ocorridas somente na pressão elástica do sistema respiratório, enquanto a medida da elastância dinâmica abrange as variações de pressões elásticas, viscoelásticas e não homogêneas. Por esse motivo medimos ΔE , que informa acerca dos componentes viscoelásticos e não homogêneos.

Em nosso experimento o grupo que recebeu LPS, apresentou um incremento do componente elástico do pulmão, refletido nas elastâncias estática (Est,L), dinâmica (Edyn,L) e a diferença de elastâncias (ΔE), como mostram as Figuras 10 e 12 esses achados foram semelhantes aos de Menezes (2005) e Santos (2006) confirmando a indução da lesão. Os fármacos, com exceção do 596, não foram capazes de reduzir a Est a valores significativamente diferentes do grupo com LPA. Este mesmo comportamento foi observado em relação à ΔE . Também não houve diferença qualitativa entre os resultados de 1 e 6 horas. As alterações da mecânica podem ser explicadas por nossos achados histopatológicos como diminuição do percentual de tecido normal e presença de colapso alveolar, como detalhado adiante. Em concordância com os nossos resultados, Rocco em 2003 demonstrou uma redução significativa da Est e ΔE ao ser administrar LASSBio 596 preventivamente (1 h antes) e 6 horas depois da LPA. Além disso, não houve diferença significativa da Est e ΔE entre o grupo C e o grupo 596.

O componente viscoelástico ($\Delta P2$) foi maior significativamente em relação ao grupo controle nos grupos que receberam LPS, excetuando-se o grupo 596, onde $\Delta P2$ não foi diferente do grupo C, equiparando-se aos achados de Rocco e

colaboradores em 2003. Os fármacos sildenafil, talidomida e a associação de ambos não foram eficazes em reduzir o ΔP_2 em relação ao grupo não tratado em ambos os tempos (Figuras 11 e 13). Esse comportamento pode estar correlacionado com o aumento do colapso alveolar, que acarreta inhomogeneidade pulmonar, como discutido adiante.

Esse aumento significativo em ΔP_2 levou a um aumento de ΔP_{tot} , que é corroborado pelos dados da literatura (Broseghini e cols., 1988; Tantucci e cols., 1992). Houve diferenças significativas entre o grupo L os grupos tratados com 596 e S, quando administrados 6 h após a indução da lesão. Essa redução em ΔP_{tot} em ambos os fármacos não foi significativamente diferente do grupo C. Esse comportamento foi visto, também, por Rocco aos ser administrado 596 6 h após a lesão. Em relação ao sildenafil, há poucos relatos na literatura a respeito da sua ação sobre a função pulmonar. Os artigos existentes se referem a casos clínicos em que pacientes portadores de DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) foram submetidos a espirometria antes e depois da ingestão do fármaco. Foram demonstrados por Charan (2001) um aumento de 38% na capacidade residual funcional (CRF) e um aumento de 24% no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) ao realizar a espirometria em um paciente com DPOC imediatamente antes e uma hora depois da ingestão de 100 mg de sildenafil. Guazzi e colaboradores (2004) avaliaram os efeitos do sildenafil sobre a eficiência ventilatória durante o exercício em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, observando uma queda (9%) na relação $V'E$ (volume expirado por minuto) / $V'CO_2$ (volume de gás carbônico produzido por minuto) e um aumento da $V'O_2$ (volume

de oxigênio consumido por minuto), 19,7%, concluindo que a administração de sildenafil aumentou a eficiência ventilatória.

O componente viscoso ($\Delta P1$) foi similar nos 6 grupos em ambos os tempos (Figuras 11 e 13). Alguns autores relatam ter encontrado uma diferença significativa em relação ao $\Delta P1$ ao ser administrada a endotoxina (Rocco e cols., 2003, Brandão e cols., 2006). Por outro lado, esse comportamento não foi evidenciado por Faffe e colaboradores (2000). Esses diferentes achados podem ser devidos, talvez, à variabilidade natural existente entre ninhadas de animais utilizadas nos trabalhos, aos diferentes lotes de endotoxina, ou a variações sazonais.

Em relação à talidomida e seus efeitos sobre a mecânica pulmonar existe apenas um relato na literatura (Forsyth e cols., 1996) de um caso clínico em que um homem de 29 anos, submetido a transplante de medula, teve complicações no pós-operatório por complicação pulmonar crônica grave resultante de rejeição. O uso da talidomida resultou em um aumento importante da sua função pulmonar, o qual foi mantido mesmo após sua retirada.

É importante ressaltar que as influências das variações de V e V' sobre os parâmetros de mecânica foram evitadas em nossos experimentos com a utilização de V e V' praticamente idênticos (Tabelas do apêndice), não contribuindo, assim, para as diferenças encontradas nas resistências dos grupos. Tal assertiva é sustentada por Kochi e colaboradores (1988a, 1988b) e Similowski e colaboradores (1989), que relataram serem as resistências observadas durante a

insuflação com fluxo constante, na realidade, dependentes de fluxo, volume e da duração da inspiração.

VI.5 - Microscopia Óptica

Quando os fármacos foram administrados mais precocemente (1 h após a indução lesão) todos os tratamentos demonstraram-se capazes de reduzir significativamente o colapso alveolar em relação ao grupo não tratado (Tabela 8), sendo que no grupo 596 essa redução foi mais importante, mas não a ponto de atingir valores semelhantes ao controle. Entretanto, LASSBio 596 foi o único a apresentar uma redução significativa de $\Delta P2$, Est, Edyn, ΔE em relação ao grupo L e produzir valores semelhantes ao controle, sugerindo, portanto, apresentar uma ação mais potente e importante do que os demais compostos estudados.

Quando os fármacos foram administrados mais tardiamente (6 h após a indução da lesão) os tratamentos resultaram em maior percentual de colapso alveolar, inclusive no grupo 596 (Tabela 9). Este achado poderia ser explicado pelo maior tempo de exposição ao LPS, resultando de forma mais importante a lesão da superfície epitelial, o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, maior tempo de atuação das citocinas alterando as propriedades biofísicas do surfactante gerando maior inativação do surfactante pulmonar com subsequente formação de edema alveolar, causando perda da complacência pulmonar (Piantadosi e cols., 2004). O comportamento distinto do LASSBio 596 pode ser provavelmente explicado pelo seu triplo efeito antiinflamatório. O comportamento mecânico dentre os tratamentos foi idêntico àquele de 1 h.

O fato de que o LASBBio 596 não ter sido suficientemente eficiente para reduzir o colapso a valores similares ao do grupo C provavelmente decorre de efeitos ligados à dose utilizada, a necessidade de repetição de aplicação do fármaco, ou ao tempo de atuação do fármaco. Este resultado está em concordância com os dados publicados por Rocco e colaboradores em 2003, que demonstram uma redução do colapso alveolar quando o 596 foi administrado 1 h antes ou 6 h depois do LPS. Além disso, os grupos 596 são significativamente diferentes, a administração 6 h depois apresentou maior percentual de colapso (20,4%) (Rocco e cols., 2003), sendo este resultado similar aos dados encontrados em nosso estudo. A atelectasia pulmonar sabidamente afeta os valores de elastância, pois é necessária maior pressão para a manutenção de um mesmo volume corrente. Além do mais, nos casos em que há aumento das desigualdades de constantes de tempo, o “pendelluft” pode exercer uma influência maior na dissipação da pressão no componente viscoelástico do pulmão. Essa correlação entre colapso alveolar e alterações dos parâmetros viscoelásticos, foi bem definida por Bates e cols. (1988), ao realizar a medida da pressão alveolar em cães com tórax aberto, bem como em outros modelos experimentais (Faffe, 2000).

Não existem relatos na literatura sobre o estudo da morfometria pulmonar em seres humanos ou animais tratados com sildenafil ou talidomida. O aumento da celularidade tecidual, com conseqüente espessamento do interstício alveolar (Tabela 6 e 7, Figura 14 e 15), também pode ter ocasionado aumento significativo nos valores de ΔP_2 , ΔE e Est, auxiliando a explicar, juntamente com o colapso

acima discutido, as associações encontradas neste estudo. Os PMNs na LPA/SDRA iniciam uma série de eventos como a degranulação de proteases, liberação de espécies reativas de oxigênio, alterações na expressão de moléculas de adesão bem como alterações do citoesqueleto, que culminam com a lesão do parênquima pulmonar, contrastando com sua atuação protetora em outras afecções, como em uma pneumonia não complicada (Chollet-Martin, 2000).

Todos os tratamentos foram eficientes em reduzir a quantidade de PMN em relação ao grupo L, embora o fármaco 596 tenha apresentado uma melhor resposta independentemente do momento da administração (1 ou 6 horas). A quantidade de PMN e a celularidade total foi maior quando os tratamentos foram administrados mais tardiamente, em concordância com os achados de Asti e colaboradores (2000) e à luz das razões já apresentadas acima.

As alterações da mecânica respiratória e da histologia pulmonar, observadas em 24 h já estavam presentes antes, 6 h após a indução da LPA, embora menos intensas (Asti e cols., 2000). Estes autores observaram uma intensa marginalização de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar e no BALF com a mesma dose de LPS (10 µg) intratraqueal utilizada no presente estudo. Eles demonstraram um aumento significativo na atividade da mieloperoxidase em 4 h (131% de aumento em relação ao controle) e 6 h (147% de aumento em relação ao controle), refletindo-se em acúmulo de PMNs nos pulmões. Observaram, também, um significativo aumento dos PMNs no BALF em 4 ($1,47 \pm 0,3$) e 6 h ($4,14 \pm 0,3$), atingindo posteriormente um platô entre 12 ($13,2 \pm 1,8$) e 24 h ($13,4 \pm 1,85$). Com base nestes achados resolvemos administrar as

fármacos quando a disfunção pulmonar já estava presente e após a cascata inflamatória ter sido iniciada.

A observação dos dados numéricos da mecânica e, principalmente, dos índices de significância da celularidade demonstram melhor resposta terapêutica ao sildenafil comparado à talidomida em alguns dos parâmetros medidos. Esse comportamento pode ser explicado pelo duplo mecanismo de ação do sildenafil: (1) relaxamento do músculo liso, gerando uma vasodilatação (2) antiinflamatório, descrito pela primeira vez por Toward e colaboradores (2004). Esses autores, em um estudo avaliando o efeito do sildenafil (iPDE5) em modelo animal de doença de via aérea, cuja sensibilização foi feita com por LPS (30 $\mu\text{g/ml}$), sugeriram que o fármaco atenuaria a hiperreatividade brônquica e a inflamação, vista através de redução significativa (65%) de neutrófilos no BALF. Corroborando os achados de Toward e colaboradores, também verificamos uma redução no recrutamento de células inflamatórias ao ser administrado sildenafil em ambos os tempos.

Os efeitos da talidomida sobre a quimiotaxia de leucócitos PMN vêm sendo descrito em artigos desde 1980. Faure e colaboradores (1980), em um estudo *in vitro*, descreveram que a pré-incubação de PMNs com talidomida causa uma marcante inibição dose-dependente da quimiotaxia. Mais tarde, Barnhill e colaboradores (1984) observaram *in vitro* que a talidomida (10 $\mu\text{g/ml}$) reduz significativamente a fagocitose de esferas de látex pelos leucócitos e células PMN após uma hora de incubação. Chien-Sheng Chen (2004) verificou que administração de Talidomida 2h antes da injeção de LPS reduziu a permeabilidade microvascular pulmonar e a concentração de proteínas no BALF. Também em

2004, Tadesse e colaboradores demonstraram que a talidomida, assim como várias outras drogas, era capaz de estabilizar a membrana dos neutrófilos PMN, reduzindo, portanto, a produção de radicais livres, além de reduzir o recrutamento de células, exibindo seu efeito antiinflamatório sobre elas.

Certamente, os diversos efeitos antiinflamatórios resultantes da inibição da PDE4 (Sekut e cols., 1995; Miotla e cols., 1998; Essayan, 2001) e da PDE5 (Ichinose e cols., 1998; Ichinose e cols., 2001, Toward e cols., 2004) e o efeito sobre o TNF- α (Lima e cols., 2002) contribuíram para os resultados favoráveis do LASSBio 596 observados no presente estudo.

Por fim, também foi verificado no presente estudo que a análise morfométrica/morfológica identifica alterações em situações não detectadas pela análise mecânica, como já descrito anteriormente (Rocco e cols., 2003; Campos e cols., 2006), provavelmente por razões de grau de sensibilidade dos métodos. Assim, justifica-se a normalização da mecânica pulmonar após o uso do LASSBio 596, enquanto a celularidade e o grau de colapso de espaços aéreos, embora tendendo à normalidade, ainda se mostrassem elevados. O mesmo raciocínio se aplica aos demais tratamentos testados.

Apesar do modelo experimental empregado neste estudo refletir muitas das alterações observadas em pacientes com LPA/SDRA, os resultados aqui apresentados não devem ser extrapolados diretamente para seres humanos. Os efeitos benéficos dos fármacos aqui estudados sugerem que eles possam se tornar ferramentas importantes do arsenal terapêutico contra a LPA/SDRA, respeitadas as características farmacológicas dos mesmos.

CONCLUSÕES

VII – CONCLUSÕES

- O tratamento com 596 foi o único capaz de reverter as alterações funcionais induzidas pelo LPS
- Todos os tratamentos, aplicados 1 h após a indução da lesão, resultaram em menor grau de colapso alveolar provocado pelo LPS, mas o 596 foi mais eficaz
- Com o tratamento instituído passadas 6 h da agressão, só o 596 foi capaz de prevenir o colapso
- Todos os tratamentos resultaram em menor inflamação pulmonar do que o grupo não tratado. O LASSBio 596 apresentou o melhor desempenho, independentemente do momento da administração.
- O LASSBio 596 é mais eficaz no tratamento da LPA induzida por LPS do que seus precursores, isoladamente ou associados.
- A hibridação molecular de talidomida e sildenafil e as modificações na sua composição parecem ter propiciado maior potencial terapêutico ao composto formado, quando este é comparado aos seus precursores sozinhos ou combinados.

PERSPECTIVAS

VIII. Perspectivas Futuras

Até o presente momento avaliou-se o efeito de diferentes inibidores de fosfodiesterases sobre a mecânica pulmonar em um modelo de lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo provocado pela instilação intratraqueal de lipopolissacarídeo de *E. coli*. Além disso, avaliou-se a microscopia óptica do parênquima pulmonar, visando dar suporte anatômico para os achados funcionais.

Pretendemos, doravante, quantificar o conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar, avaliar se o 596 apresenta um efeito colateral comum aos inibidores de fosfodiesterase: a êmese e verificar, através de necrópsia, se os fármacos gerarão efeito colateral em algum outro órgão.

Para a melhor compreensão dos efeitos e magnitude dos diferentes fármacos, alguns pontos ainda devem ser investigados, tais como: Qual a repercussão dos diferentes inibidores de fosfodiesterase em um modelo de LPA de origem indireta? Se a melhora funcional gerada pelos fármacos é mantida após um tempo mais prolongado?

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

IX. Referências Bibliográficas:

- Aberle DR, Wiener-Kronish JP, Webb WR, Matthay MA (1988). Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema: diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology* 168(1), 73-9
- Adriansson M (2000). Frequent good partial remissions from thalidomide including best response ever in patients with advanced refractory and relapsed myeloma. *Br J Haematol* 109,89-96.
- Albeda SM (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8,504-512.
- Amato RJ (2002). Thalidomide: An antineoplastic agent. *Curr Oncol Rep* ,4:56–62.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 12; 2(7511), 319-23.
- Asti C, Ruggieri V, Porzio S, Chiusaroli R, Melillo G, Caselli GF (2000). Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm Pharmacol Ther*. 13(2):61-69.
- Au BT, Teixeira MM, Collins PD, Williams TJ (1998). Effects of PDE4 inhibitors on zymosag-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol. *Br J Pharmacol* 123, 1260-6.
- Augusto, VM, Sousa, AS, Moll, RJ, Duarte, JGC, Zin, WA. (1995). Respiratory mechanics and morphometry after progressive intraperitoneal effusion. *Respir Physiol*. 102, 217-224.

- Auler, JOC, Zin WA., Caldeira, MPR, Cardoso WV, Saldiva PHN (1987). Pre - and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. *Chest*. 984-990.
- Auler JO Jr, Zin WA, Martins MA, Younes RN, Negri EM, Hoelz C, Santos MA, Santos RL, Carvalho MJ, Saldiva PH (1992). Respiratory system mechanics in patients treated with isotonic or hypertonic NaCl solutions. *Circ Shock*. Apr;36(4):243-248.
- Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE (1983). Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation puncture model. *Surgery* 94,331-335.
- Baldwin AS (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest*;3,107:241–246.
- Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Price ME, Naylor AM (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol* 159: 2164-71.
- Barnas GM, Yoshino K, Loring SH, Mead J (1987). Impedance and relative displacements of relaxed chest wall up to 4 Hz. *J Appl Physiol* 62(1):71-81.
- Barnette MS, Bartus JO, Burman M, Christensen SB, Cieslinski LB, Esser KM, Prabhakar US, Rush JA (1996a). Association of the anti-inflammatory activity of phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors with either inhibition of PDE4 catalytic activity or competition for [3H] rolipram binding. *Biochem Pharmacol* 51, 949-56.

- Barnette MS, Christensen SB, Underwood DC, Torphy TJ (1996b). Phosphodiesterase 4: biological underpinnings for the design of improved inhibitors. *Pharmacol Rev Commun* 8,65-73.
- Barnhill RL, Doll NJ, Millikan LE, Hastings RC (1984). Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Am Acad Dermatol*. 11:814-9.
- Bar-Yishay E, Hyatt RE, Rodarte JR (1986). Effect of heart weight on distribution of lung surface pressures in vertical dogs. *J Appl Physiol*. Aug;61(2),712-8.
- Bates, J.H.T.; Rossi, A.; Milic-Emili, J. 1985. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*. 58: 1840-1848.
- Bates JHT, Baconnier P, Milic-Emili J (1988b). A theoretical analysis of the interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol*. 64: 2204-2214.
- Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ (1994). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 46,399-405.
- Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterase: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75,752-748.
- Belvin MP (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 12, 393-416.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149,818-824.

- Billington CK, Joseph SK, Swan C, Scott MGH, Jobson TM, Hall IP (1999). Modulation of human airway smooth muscle proliferation by type 3 phosphodiesterase inhibition. *Am J Physiol* 276, L412-419.
- Bone, RC (1991) Let's agree on terminology: definitions of sepsis. *Critical Care Medicine* 19, 973-976.
- Bone RC (1991). Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest* 100(3), 802-808.
- Bone RC (1996a). The sepsis syndrome – Definition and general approach to management. *Clin. Chest Med.* 17,175-80.
- Bone, RC (1996b). Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.* 24: 162-72.
- Brigham KL, Meyrick B (1986). Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis*,133(5),913-927.
- Brusasco V (1989). Delivered volume during high-frequency ventilation. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 90,70-1.
- Burrell R (1988). Mediators of pulmonary injury induced by inhalation of bacterial endotoxin. *Am. Rev Respir Dis* 137,100-105.
- Bursten SL, Federighi D, Wald J, Meengs B, Spickler W, Nudelman E (1998). Lisofylline causes rapid and prolonged suppression of serum levels of free fatty acids. *J Pharmacol Exp Ther.*284(1):337-45
- Calabrese L, Fleischer AB (2000). Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 108, 487-95.
- Campos HS, Xisto DG, Oliveira MB, Teixeira I, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Lima LM, Barreiro EJ, Faffe DS, Zin WA, Lapa e Silva JR, Rocco PR (2006).

- Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. *Braz J Med Biol Res.* 39(2),283-287.
- Chang HK & Mortola JP (1981). Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurements. *J Appl Physiol.* 51, 218-225.
- Charan NB (2001). Does sildenafil also improve breathing? *Chest.* 120(1):305-306.
- Chen CS, Perng WC, Chen CW, Huang KL, Wu CP, Yen MH (2004). Thalidomide reduces lipopolysaccharide/zymosan-induced acute lung injury in rats. *J Biomed Sci.* 11(5), 591-8.
- Chollet-Martin S (2000). Polymorphonuclear neutrophil activation during the acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 26(10), 1575-1577.
- Clayton RA, Dick CAJ, Mackenzie A, Nagasawa M, Galbraith D, Hastings SF, MacKenzie SJ (2004).The effect of selective phosphodiesterase inhibitors, alone and in combination, on a murine model of allergic asthma. *Respir Res* 5: 4-12.
- Clack MC, Flick MR (1984). Permeability pulmonary edema caused by venous air embolism. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, 633-635.
- Corbin JD, Francis, SH, 2002. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int. J. Clin. Pract.* 56, 453– 459.
- Creamer KM, McCloud LL, Fisher LE, Ehrhart IC (2001). Pentoxifylline rescue preserves lung function in isolated canine lungs injured with phorbol myristate acetate. *Chest.* Jun;119(6):1893-1900.
- D'Angelo E, Sant'Ambrogio G, Agostoni E (1974). Effect of diaphragm activity or paralysis on distribution of pleural pressure. *J Appl Physiol.* 37(3),311-315.

- D'Angelo E, Calderine E, Torri G, Robatto FM, Bono D, Milic-Emili J(1989). Respiratory mechanics in anesthetized paralysed humans: effects of flow, volume and time. *J Appl Physiol.* 67(6), 2556-2564.
- D'Angelo E, Prandi E, Milic-Emili J (1993) Dependence of maximal flow-volume curves on time course of preceding inspiration. *J Appl Physiol.* 75(3),1155-1159.
- D'Angelo E, Prandi E, Tavola M, Calderini E, Milic-Emili J (1994). Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralysed humans. *J Appl Physiol.* 77: 883-887.
- D'Arcy PF, Griffin JP(1994). Thalidomide revisited. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 13:65-76.
- Delclaux C (1997). Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol* 273: L104 -L112.
- Deni M, Guojian M, Widmer M, Cantin A (1994). A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 658-64.
- Don HF, Robson JG (1965). The mechanics of the respiratory system during anesthesia. the effects of atropine and carbon dioxide. *Anesthesiology.* 26,168-78.
- Dorrington KL. 1980. The theory of viscoelasticity in biomaterials In: *The mechanical properties of biological materials* (XXXIV Symposium of the Society for Experimental Biology). Cambridge. *Cambridge University Press:* 289-314.
- Dunzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ (1997). Effects of thalidomide on neutrophil respiratory burst, chemotaxis,

- and transmigration of cytokine- and endotoxin- activated endothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:529–535.
- Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann S, Endres S (1998). Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* 63,101–107.
- Eisen T, Boshoff C, Mark I, Sapunar F, Vaughan MM, Pyle L, (2000). Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 82:812-7.
- Esbenshade AM (1982). Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol* 53, 967-976.
- Esbenshade AM, Newman JH, Lams PM, Jolles H, Brigham KL (1982). Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J. Appl. Physiol.*, 53: 967-76.
- Essayan DM (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol* 108,671–680.
- Fabro S, Schumacher H, Smith RL, Stagg RB, Williams RT(1965). The metabolism of thalidomide: some biological effects of thalidomide and its metabolites. *Br J Pharmacol* 25,352-62.
- Faffe DS, Seidll VR.; Chagas PS, Gonçalves de Moraes VL, Capelozzi VL, Rocco PR, Zin WA (2000). Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur. Respir. J.* 15,85-91.
- Faffe DS (2000). Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J* 15, 85-91.

- Faure M, Thivolet J, Gaucherand M (1980). Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. *Arch Dermatol Res.* 269(3):275-280.
- Fauré M, Lejeune JP, Gaucherand M, Thivolet J (1981). PMN leukocytes chemotaxis: inhibition by thalidomide. *Pathol Biol* 29,601–604.
- Fein AM, Calalang-Colucci MG (2000). Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* 16(2),289-317.
- Feltis BA (1994). Bacterial translocation and lipopolysaccharide-induced mortality in genetically macrophage-deficient op/op mice. *Shock* 2(1), 29-33.
- Fife K, Howard MR, Gracie F, Phillips RH, Bower MA (1998). Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma and correlation with HHV8 titre. *Int J STD AIDS* 9,751-755.
- Figg WD, Bergan R, Brawley O, Tompkins A, Linehan M, Duray P (2001). Randomized phase II study of thalidomide in androgen-independent prostate cancer (AIPC). Genitourinary Cancer. *ASCO Program/Proceedings* 1997;16:a1189.
- Fimia GM, Sassone-Corsi P (2001). Cyclic AMP signaling. *J Cell Sci* 114,1971-1972.
- Forsyth CJ, Cremer PD, Torzillo P, Iland HJ, Young GA (1996). Thalidomide responsive chronic pulmonary GVHD. *Bone Marrow Transplant.*17(2):291-293.
- Frossard N, Landry Y, Pauli G, Ruckstuhl M (1981). Effects of cyclic AMP- and GMP-phosphodiesterases on immunological release of histamine and on lung contraction. *Br J Pharmacol* 73: 933-8.
- Fuhrmann M, Jahn HU, Seybold J, Neurohr C, Barnes PJ, Hippenstiel S, Kraemer HJ, Suttorp N (1999). Identification and function of cyclic nucleotide

phosphodiesterase isoenzymes in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 292-302.

Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kiimura G, Kwanami O, Masugi Y (1987). The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am. J. Pathol* 126, 171-182.

Gad SM, Shannon EJ, Krotoski WA, Hastings RC (1985). Thalidomide induces imbalances in T-lymphocyte subpopulations in the circulating blood of healthy males. *Lepr Rev*,56:35–39.

Galhardo, F.P.L. & Martinez, J.A.B (2003) Síndrome do desconforto respiratório agudo. *Medicina*, Ribeirão Preto 36, 248-256.G

Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A (1998). Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med*. 158(1), 3-11

Ghofrani HA, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F (2002). Sildenafil for treatment of severe pulmonary hypertension and commencing right-heart failure. *Pneumologie* 56, 665-72.

Giembycz MA (2002). Development status of second generation PDE4 inhibitors for asthma and COPD: the story so far. *Monaldi Arch Chest Dis* 57, 48-64.

Go LL (1995) The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro. *Arch Surg* 130(1),53-58.

Goncalves de Moraes VL, Boris Vargaftig B, Lefort J, Meager A, Chignard M (1996). Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP

- formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. *Br J Pharmacol.* 117(8),1792-1796.
- Grabstad H, Golbey R (1965). Clinical experience with thalidomide in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 6:298-302.
- Guazzi M, Tumminello G, Di Marco F, Fiorentini C, Guazzi MD (2004). The effects of phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil on pulmonary hemodynamics and diffusion capacity, exercise ventilatory efficiency, and oxygen uptake kinetics in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 44(12), 2339-2348.
- Gundersen HJG, Bendtse TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengarrd, J.R, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathiol. Microbiol. Immunol. Scand.* 96,379-394.
- Hasday, JD, Bascom. R, Costa, JJ, Fitzgerald, BS, Dubin, W (1999). Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 115, 829-35.
- Hasko G, Szabo C, Neeth ZH, Lendvai B, Vizi ES (1998). Modulation by dantroiene of endotoxin-induced Interleukin- 10, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*;124,1099–106.
- Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G (1998). Thalidomide co-estimates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med* ,187:1885–92.

- Hedenstierna G (1990). Gas exchange during anaesthesia. *Br J Anaesth.* Apr;64(4):507-514.
- Hildebrandt J (1970). Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. *J Appl Physiol.* 28(3): 365-372.
- Hinson JM Jr (1983). Effect of granulocyte depletion on altered lung mechanics after endotoxemia in sheep. *J Appl Physiol.* 55, 92-99.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. (2000) Rising behind NO: cGMPdependent protein kinases. *J Cell Sci.* 113:1671–1676.
- Holzmann A, Manktelow C, Weimann J, Bloch KD, Zapol WM (2001). Inhibition of lung phosphodiesterase improves responsiveness to inhaled nitric oxide in isolated-perfused lungs from rats challenged with endotoxin. *Intensive Care Med.* Jan;27(1):251-257.
- Horie T.& Hildebrant J (1971). Dynamic compliance, limite cicles, and static equilibria of excised cat lung. *J Appl Physiol.* 31(3): 423-430.
- Horton YM, Sullivan M, Houslay MD (1995). Molecular cloning of a novel splice variant of human type IVA (PDE-IVA) cyclic AMP phosphodiesterase and localization of the gene to the p13.2-q12 region of human chromosome 19. *Biochem J* 308, 683-91.
- Houslay MD, Milligan G (1997). Tailoring cAMP signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22, 217-224.
- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ (1995). Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 293-301.

- Hurley JH (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 274, 7599-7602.
- Ichinose F, Adrie C, Hurford W, Bloch K, Zapol W (1998). Selective pulmonary vasodilation induced by aerosolized Zaprinast. *Anesthesiology* 88, 410-416.
- Ichinose F, Erana-Garcia J, Hromi J, Raveh Y, Jones R, Krim L, Clark MW, Winkler JD, Bloch KD, Zapol WM (2001). Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 29, 1000-1005.
- Ingbar, DH (2000). Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury. *Clin. Chest Med.*, 21:589-615.
- Irvin CG, Bates JH (2003). Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res.* 4:4.
- Johanson, WG, Higuchi, JH, Woods. DEGP, Coalson, JJ (1985). Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection in hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 358-61.
- Keenan RJ, Eiras G, Burckart GJ, Stuart RS, Hardesty RL, Vogelsang G, (1991). Immunosuppressive properties of thalidomide. Inhibition of in vitro lymphocyte proliferation alone and in combination with cyclosporine or FK506. *Transplantation* 52:908–910.
- Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS (2001). Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* 276,22382–22387.
- Kenan Y, Murata T, Shakur Y, Degerman E, Manganiello VC (2000). Functions of the N-terminal region of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE 3) isoforms. *J Biol Chem*; 275: 12331-12338.

- Kline JN, Codwen JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt, JL, Wohlford, CL, Powers LS, Jones MP, Schwarts DA (1999). Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 297-303.
- Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J (1988a). Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol.* 64(6), 441-450.
- Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. 1988b. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol.* 64,2636-2646.
- Korom S, Hillinger S, Cardell M, Zhai W, Tan Q, Dutly A, Leskosek B, Weder W (2006). Sildenafil extends survival and graft function in a large animal lung transplantation model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 29(3),288-93.
- Kudoh I, Miyazaki H, Ohara M, Fukushima J, Tazawa T, Yamada H (2001). Activation of alveolar macrophages in acid-injured lung in rats: different effects of pentoxifylline on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production. *Crit Care Med.* Aug;29(8):1621-1625.
- Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L (2005). Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol.* 42(5-6),219-32.
- Kunkel SL, Lukas NW, Strieter RM, Chenseu SW (1996). Th1 and Th2 response regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 13,120– 8.
- Lamy M, Fallat RJ, Koeniger E (1976). Pathologic features and mechanisms of hypoxemia in adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 114, 267-84.

- Laties AM, Fraunfelder FT (1999). Ocular safety of Viagra (sildenafil citrate). *Trans.Am.Ophthalmol. Soc.* 97,115– 128.
- Lemaitre B (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette Spaetzle/Toll/cactus control the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lima LM, Fraga CAM, Barreiro, EJ. (2001).O renascimento de um fármaco: talidomida. *Quím. Nova.*, São Paulo, v. 24, n. 5 .
- Lima LM, Castro P, Machado AL, Fraga CA, Lugnier C, de Moraes VL, Barreiro EJ. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues (2002).*Bioorg Med Chem.* 10(9),3067-73.
- Little RF, Wyvill KM, Pluda JM, Welles L, Marshall V, Figg WD (2000). Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*;18:2593-2602.
- Loring, S.H.; Elliot, E.A.; Drazen, J.M (1979). Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. *Lung* 156, 33-42.
- Mantktelow BW (1967). The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning: a model for the study of respiratory distress syndrome. *Brit. J. Exp. Pathol.* 48: 366-369, 1967.
- Marchant A, Amraoui Z, Gueydan C, Bruyins C, Le Moine P, Vandenabeele P, (1996) Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxemia. *Clin Exp Immunol* 106,91–96.
- Martin, TR (2005). Cytokines and lung injury: Searching for useful biomarkers. *Crit Care Med.* 33: 230-232.

- Martins MA, Saldiva PH, Caldeira MP, Vieira JE, Zin WA. Respiratory system, lung, and chest wall mechanics in guinea pigs (1988). *Braz J Med Biol Res.*;21(2):353-363
- Martins MA, Zin WA, Younes RN, Negri EM, Sakae RS, Lin CA, Hoelz C, Auler Junior JO, Saldiva PH (1990). Respiratory system mechanics in guinea pigs after acute hemorrhage: role of adrenergic stimulation. *Crit Care Med.* 18(5):515-519.
- Mead J & Whittenberg JL. 1954. Evaluation of airway interruption technique as a method for measuring pulmonary air-flow resistance. *J Appl Physiol.* 6: 408-416.
- Mead J (1961). Mechanical properties of lungs. *Physiol Rev.* 41,281-330.
- Medzhitov R (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meierhofer CH, Dunzendorfer S, Wiedermann CHJ (2001). Theoretical basis for the activity of thalidomide. *Bio Drugs*15:681–703.
- Mello MMS (1996). Análise histopatológica e da mecânica respiratória em modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo induzida por paraquat em ratos. Pernambuco. Tese de mestrado (Fisiologia). Centro de Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco.
- Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR (2005). Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol* 98(5),1777-83.
- Meyrick BO (1986). Direct effects of E.coli endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. *Am J Pathol* 122, 140-151.

- Michel O, Duchateau J, Sergysels R (1989). Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J. Appl.Physiol.* 66:1059-64.
- Michel O, Ginannie R, Le Bon, B (1992). Inflammatory response to acute inhalation of endotoxin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 352-357.
- Milatovich A, Bolger G, Michaeli T, Francke U (1994). Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. *Somat Cell Mol Genet* 20, 75-86.
- Milic-Emili J (1977). Recent advances in the evaluation of respiratory drive. *Int Anesthesiol Clin.* 15(2),39-58.
- Miotla JM, Teixeira MM, Hellewell PG (1998). Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18(3):411-420.
- Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM, Ma X, Wahl L, Flockhart DA (1997). Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J Immunol* 1997;159:5157–61.
- Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F(1998).Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J of Respir and Crit Care Med.* 158,1076-1081
- Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD (1985). Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.*132(3): 485-489, 1985.
- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G(1993). Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993;177:1675–1680.

- Moreira LF, Aires ST, Gobbi CF, Saldiva PH, Zin WA (1995). Respiratory system, lung, and chest wall mechanics after longitudinal laparotomy in rats. *Eur Respir J.* Jan;8(1):105-108.
- Moreira LF, Gobbi CF, Feijoo M, Rocco PR, Zin WA (1997). Respiratory mechanics and morphometric changes during pneumoperitoneum in normal rats. *Eur Respir J.* Jun;10(6),1321-1326.
- Moreira MSA, Takiyac CM., Arrudad LB, Pascarellic B, Gomese RN., Neto HCF, Lima LM, Barreiro EJ (2005). LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF-a and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. *International Immunopharmacology* 5, 485–494.
- Morrison DC (1983). Bacterial endotoxins and pathogenesis. *Rev. Infect. Dis* 5 (Suppl.4), 733-S747.
- Mortola JP & Novoraj A (1983). Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol.* 55: 250-253.
- Mount LE (1955). The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. *JPhysiol.* 127,157-167.
- Muller-Leisse C, Klosterhalfen B, Hauptmann S (1993): Computed tomography and histologic results in the early stages of endotoxin-injury lungs as a model for adult respiratory distress syndrome. *Invest Radio.* 28, 39-45.
- Murray JF, Mattahy, MA, Luce, JM; Flick, MR (1988) An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 720-23.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002). G protein pathways. *Science* 296,1636-1639.

- Nicholson CD, Chaliss RAJ, Shahid M (1991). Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 12, 19-27.
- Nicholson CD, Shahid M (1994). Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes - their potential utility in the therapy of asthma. *Pulm Pharmacol* 7, 1-17.
- Nobel WH, Kay JC, Obdrzalck J (1975). Lung mechanics in hypervolemic pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.*, 38, 681-85.
- Noss MB, Christ GJ, Melman A (1999). Sildenafil: A new oral therapy for erectile dysfunction. *Drugs Today* 35: 211-217.
- Nys M, Ledoux D, Canivet J.L, De Mol P, Lamy M, Damas P (2000). Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar laavage fluid of ventilated patients. *Crit. Care Med.* 28:2825-30.
- Old LJ(1988). Tumor necrosis factor. *Sci Am* 1988; 258: 59-60, 69-75.
- Olivier D (1996). Immunological defences in airways. In: ChreÁtien J, Dusser D, eds. *Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair*. New York, USA, *Marcel Dekker Inc* 3, 43-69
- Otis AB, Mckerrow CB, Bartlett RA, Mead J, Mcilroy MB, Selverstone NJ, Rodford EP (1956). Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. *J Appl Physiol.* 8: 427-443.
- Ortiz JL, Valles JM, Marti-Cabrera M, Cortijo J, Morcillo EJ (1996). Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor and antigen-induced airway hyperreactivity, eosinophil accumulation, and microvascular leakage in guinea pigs. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353, 200-206.

- Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Ellis LM, Peterson JA, Waugh KA (2000). Durable clinical response of refractory hepatocellular carcinoma to orally administered thalidomide. *Am J Clin Oncol* 23:319-321.
- Pauvert O, Salvail D, Rousseau E, Lugnier C, Marthan R, Savineau JP (2002). Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. *Biochem Pharmacol* 63, 1763-72.
- Pauwels RA (1990). The effects of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. *Am Rev Respir Dis* 141, 540-545.
- Pelligrino DA, Wang Q (1998). Cyclic nucleotide cross-talk and the regulation of cerebral vasodilatation. *Prg Neurobil* 56, 1-18.
- Pelosi P (2000). What about primary and secondary ARDS. *Minerva Anest.* 66,779-85. Meyrick, BO, Ryan US, Brigham KL (1986). Direct effects of E coli endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. *Am. J. Pathol.* 122:140-51, 1986.
- Peslin R, Papon J, Duvivier C, Richalet J. (1975). Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. *J Appl Physiol.* 39 (4): 523-534.
- Perry MJ, Higgs GA(1998). Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. *Current Opinion in Chem Biol* 2, 472-481.
- Piantadosi C.A, Schwartz D.A (2004). The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* 21;141(6), 460-70,2004.
- Polson JB, Kazanowski JJ, Goldman AL, Szentivanyi A (1978). Inhibition of human pulmonary phosphodiesterase activity by therapeutic levels of theophylline. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 5: 535-9.

- Polson JB, Strada SJ (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 403-27.
- Powers SR Jr, Mannal R, Neclerio M, English M, Marr C, Leather R, Ueda H, Williams G, Custead W, Dutton R (1973). Physiologic consequences of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation. *Ann Surg.* 178(3):265-272.
- Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA (2000). Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 343 (18),1342.
- Pratt CP, Vollmer RT, Shelburne JS, Crapo JS (1979). Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. *Am. J. Pathol.* 95,191-214.
- Preas II, HJ, Jubran, A, Vandivier, W, Reda, D, Godin, PJ, Banks, SM, Tobin, MT, Suffredini, AF (2001). Effect of endotoxin on ventilation and breath variability – Role of cyclooxygenase pathway. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 620-626.
- Preston IR, Klinger JR, Houtches J, Nelson D, Farber HW, Hill NS (2005). Acute and chronic effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2005 Dec;99(12):1501-1510.
- Rabe KF, Tenor H, Dent G, Webig S, Magnussen H (1993). Phosphodiesterase isoenzymes modulating inherent tone in human airways: identification and characterization. *Am J Physiol* 264, L458-64.
- Raeburn D, Sauness JE, Tomkinson A, Karlsson J-A (1993). Isoenzyme-selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: biochemistry, pharmacology and therapeutic potential in asthma. *Prog Drug Res* 1993; 40: 9-32.

- Reyes-Teran G, Sierra-Madero JG, Martinez del Cerro V, Arroyo-Figueroa H, Pasquetti A, Calva JJ(1996). Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *AIDS* 10:1501-1507.
- Rocco PR, Fonseca SM, Pinto AP, Medeiros AS, Contador RS, Zin WA (1999). Effects of prosthetic reconstruction of the abdominal wall on respiratory mechanics in rats. *Respir Physiol.* 115(1),35-43.
- Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Legora-Machado A, Koatz VL, Lima LM, Barreiro EJ, Zin WA.(2003). Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* 22(1),20-7.
- Rocco PR, Zin WA (2005). Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? *Curr Opin Crit Care.* Feb;11(1):10-7, 2005.
- Rodrigues AC, Moreira LF, de Souza CL, Pettersen PC, Saldiva PH, Zin WA. Moreira LF, Gobbi CF, Feijoo M, Rocco PR, Zin WA (1993). Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. *Chest.* Dec;104(6):1882-1886.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JÁ (2003). Cyclic GMP phosphodiesterase and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93, 280-91.
- Rylander R, Hanglind P, Lundholm M. (1985) Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton works in an experimental cardroom. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131,209-213.

- Rylander R, Bake B, Fischer J.J (1989). Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:981-86, 1989.
- Saeki T, Takese Y (1996). Phosphodiesterase 5 inhibitors in development for cardiovascular therapy. *Exp Opin Invest Drugs* 1996; 5: 1477-86.
- Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocinio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH, Martins MA (1994). Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol.* 266,L23-29.
- Sakae RS, Martins MA, Criado PM, Zin WA, Saldiva PH (1992). In vivo evaluation of airway and pulmonary tissue response to inhaled methacholine in the rat. *J Appl Toxicol.*12(4),235-238.
- Saldiva PH, Cardoso MP, Caldeira MPR, Zin WA (1987). Mechanics in rats by the end-inflation occlusion and single-breath methods. *J Appl Physiol.* 63(5), 1711- 1718.
- Saldiva PHN, Zin WA, Santos RLB, Eidelman DH, Milic-Emili J (1992).Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J Appl Physiol.* 72: 302-306.
- Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC (2003). Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circ Res* 2003;92:595—7.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G (1991).Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173:699–703.
- Santos FB, Nagato LK, Boechem NM, Negri EM, Guimaraes A, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR (2006).Time course of lung parenchyma

- remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol.* 100(1),98-106.
- Schuster DP (1994). ARDS: Clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 149, 245-60.
- Scütte.H (2000).The pde inhibitor zaprinast enhances NO-mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs. *Am J Physiol Lung cell Mol Physiol* 279 (3),L496-L502.
- Seidenfeld, JJ, Curtix, MR, Fowler, SR, Johanson, WG (1986). Bacterial infection and acute lung injury in hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:22-6.
- Sekut L, Yarnall D, Stimpson SA, Noel LS, Bateman-Fite R, Clark RL, Brackeen MF, Menius JA Jr, Connolly KM (1995). *Clin Exp Immunol.* 100(1),126-132.
- Shaw, JO, Henson, PM, Webster, RO (1980). Lung inflammation induced by complement derived chemotactic fragments in the alveolus. *Lab. Invest.* 42,547-58.
- Shelhamer, JH, Neumann, RD, Brenner, M, Baltaro, RJ, Parrilo, J.E (1992). Pulmonary and oxygen transport effects of intravenously administered endotoxin in normal humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:1398-1403.
- Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ (2002). Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165,1098–1102.
- Sibille Y (1990).Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141, 471-501.
- Similowski T, Levy P, Corbeil C, Albala M, Pariente R, Derenne JP, Bates JHT, Jonson B, Milic-Emili J (1989). Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. *J. Appl. Physiol.* 67, 2219-2229.

- Slutsky, A.S.; Scharf, S.M.; Brown, R.; Ingran, R.H. 1980. The effect of oleic acid-induced pulmonary edema on pulmonary and chest wall mechanics in dogs. *Am Rev Respir Dis.* 121, 91-96.
- Snider GL, Celli BR, Goldstein RH, O'Brien JJ, Lucey EC. (1978). Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: lung volumes, volume pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studies. *Am Rev Respir Dis.* 117, 289-297.
- Smithells RW (1966). The thalidomide syndrome: comprehensive care. *Clin Pediatr (Phila)* 5,255-8.
- Snapper, J.R.; Hutchinson, A.A.; Ogletree, M.L.; Brigham, K.L (1983). Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanesthetized sheep. *J. Clin. Invest.* 72: 63-76.
- Sneader, W (1985). *Drug Discovery: The evolution of modern medicines* John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.1
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998). Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*; 273, 1553-1558.
- Souza P, O'Brodovich H, Post M, Broseghini C, Brandolese R, Poggi R, Polese G, Manzin E, Milic-Emili J, Rossi A (1995). Lung fluid restriction affects growth but not airway branching of embryonic rat lung. *Int J Dev Biol.* 39(4),629-37.
- Souza P, O'Brodovich H, Post M, Broseghini C, Brandolese R, Poggi R, Polese G, Manzin E, Milic-Emili J, Rossi A (1988). Respiratory mechanics during the first day of mechanical ventilation in patients with pulmonary edema and chronic airway obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1988 138(2),355-361.

- Sybertz E, Czarniecki M (1997). Inhibitors of PDE1 and PDE5 cGMP phosphodiesterases. *Exp Opin Ther Patents* 1997; 7: 631-639.
- Szelenyi I, Hochhaus G, Heer S, Kusters S, Marx D, Poppe H, Engel J. Loteprednol etabonate (2000): a soft steroid for the treatment of allergic diseases of the airways. *Drugs Today (Barc)*. May;36(5):313-320.
- Szipirer C, Szipirer J, Riviere M, Swinnen J, Vicini E, Conti M (1995). Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP-specific phosphodiesterases 3 and 4. *Cytogenet Cell Genet* 69, 11-14.
- Tadesse A, Sandoval F, Shannon EJ (2004). Stabilization of red blood cell membranes by thalidomide in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 26(4):501-509.
- Tantucci C, Corbeil C, Chasse M, Robatto FM, Nava S, Braidy J, Matar N, Milic-Emili J (1992). Flow and volume dependence of respiratory system flow resistance in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.*, 355-360.
- Tavares JL, Wangoo A, Dilworth P, Marshall B, Kotecha S, Shaw RJ(1997). Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. *Respir Med*.91(1):31-39
- Tasaka S, Ishizaka A, Sayama K (1996). Heat-killed *Cornebacterium parvum* enhances endotoxin lung injury with increased TNF production in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 153:1047-1055.
- Teixeira M, Gristwood R, Cooper N, Hellewell P (1997). Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? 18, 164-171.

- Terashima T, Kanazawa M., Sayama K (1994). Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 149, 1295-1303.
- Thomas DA, Kantarjian HM (2000). Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr Opin Oncol* 12,564-573.
- Tomashefski JF Jr (2000). Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* Sep;21(3),435-66.
- Torphy TJ, Undem BJ (1991). Phosphodiesterase inhibitors: new opportunities for the treatment of asthma. *Thorax* 46, 512-523
- Torphy TJ (1994). β -adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 370-4.
- Torphy TJ (1998). Phosphodiesterase isoenzymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 351-70.
- Turk BE, Jiang H, Liu JO (1996). Binding of thalidomide to alpha1-acid glycoprotein may be involved in its inhibitory action on tumor necrosis factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 93,7552–7556.
- Tutor, JD, Mason, CM, Dobard, E, Beckerman, RC, Summer, WR (1994). Nelson, S. Loss of compartmentalization of alveolar tumor necrosis factor after lung injury. *Am. J. Crit. Care Med.* 149, 1107-11.
- Ulich TR (1993). Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. IV. The soluble tumor necrosis factor receptor type I inhibits acute inflammation. *Am. J. Pathol* 142, 1335-1338.
- Underhill, DM (1999).The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401,811-815.

- Verghese MW, McConell RT, Strickle AB, Gooding RC, Stimpson SA, Yarnall DP, Taylor JD, Furdon PJ (1995). Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1313-20.
- Wang P, Wu P, Ohleth KM, Egan RW, Billah MM (1999). Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergo differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils. *Mol Pharmacol* 56, 170-4.
- Ware LB (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342, 1334–1348.
- Welbourn CR, Young Y (1992). Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg.* 79(10):998-1003.
- Weston MC, Anderson N, Peachell PT (1997). Effects of phosphodiesterase inhibitors on human lung mast cell and basophil function. *Br J Pharmacol.* 121(2):287-95.
- Wheeler AP, Jesmok G, Brigham KL (1990). Tumor necrosis factor's effects on lung mechanics, gas exchange, and airway reactivity in sheep. *J. Appl. Physiol* ,68, 2542-2549.
- Wilkens H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, Bohm M, Sybrecht GW (2001) Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 104,1218–1222.
- Wong WS, Leong KP (2004). Tyrosine kinase inhibitors: a new approach for asthma. *Biochim Biophys Acta* 1997: 53-69.

Wright PE, Bernard GR (1989). The role of airflow resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 1169-1174.

Zin WA, Caldeira MPR, Cardoso WV, Auler JOC, Saldiva, PHN (1989). Expiratory mechanics before and after uncomplicated heart surgery. *Chest.* 95: 21- 28.

APÊNDICE

X. Apêndice

X.1. Mecânica respiratória

Os valores de volume e fluxo utilizados durante o experimento estão mostrados nas tabelas 6 e 7 e não variaram significativamente nos grupos estudados.

Tabela 1 – Fluxo aéreo, volume corrente, variações de pressões e elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 1 hora depois da indução da lesão.

Variáveis	C	L	T	S	TS	596
Fluxo	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a
Volume	0,20±0,00 ^a	0,20±0,00 ^a	0,20±0,00 ^a	0,20±0,00 ^a	0,20±0,00 ^a	0,20±0,00 ^a
ΔP_{tot}	1,37±0,04 ^a	1,62±0,06 ^b	1,66±0,05 ^{b,c}	1,58±0,05 ^{a,b,c}	1,73±0,06 ^{b,c}	1,47±0,03 ^{a,c}
ΔP_1	0,50±0,03 ^a	0,53±0,06 ^a	0,65±0,04 ^a	0,63±0,03 ^a	0,68±0,04 ^a	0,60±0,02 ^a
ΔP_2	0,87±0,05 ^a	1,09±0,04 ^b	1,01±0,02 ^{a,b,c}	0,95±0,03 ^{a,b,c}	1,05±0,04 ^b	0,87±0,03 ^{a,c}
Est	22,89±0,83 ^a	32,81±1,51 ^b	31,76±1,12 ^{b,c}	29,48±1,68 ^{b,c}	32,23±1,46 ^{b,c}	26,36±0,89 ^{a,c}
Edyn	27,29±1,00 ^a	38,29±1,51 ^b	36,85±1,19 ^{b,c,d}	34,32±1,83 ^{b,c,d}	37,56±1,61 ^{b,d}	30,83±0,94 ^{a,c}
ΔE	4,40±0,24 ^a	5,48±0,23 ^b	5,09±0,12 ^{a,b,c}	4,84±0,18 ^{a,b,c}	5,33±0,20 ^{b,c}	4,47±0,14 ^{a,c}

Fluxo (mL/s) e Volume (mL). ΔP_1 , ΔP_2 (cmH₂O): pressões dissipadas para vencer o componente viscoso e a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, respectivamente. $\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$ (cmH₂O). Est (cmH₂O/mL): elastância estática do pulmão. Edyn (cmH₂O/mL): Elastância dinâmica do pulmão. ΔE (cmH₂O/mL):

Edyn - Est. Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Fluxo aéreo, volume corrente, variações de pressões e elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle (C), LPS (L), e dos grupos talidomida (T), sildenafil (S), talidomida associada ao sildenafil (TS) e LASSBio596 (596) administrados 6 horas depois da indução da lesão.

Variáveis	C	L	T	S	TS	596
Fluxo	1,00 \pm 0,00 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a
Volume	0,20 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,00 ^a
ΔP_{tot}	1,27 \pm 0,05 ^a	1,90 \pm 0,08 ^b	1,71 \pm 0,08 ^{bc}	1,57 \pm 0,09 ^{a,c}	1,70 \pm 0,07 ^{bc}	1,48 \pm 0,06 ^{a,c}
ΔP_1	0,38 \pm 0,06 ^a	0,53 \pm 0,03 ^a	0,52 \pm 0,03 ^a	0,43 \pm 0,05 ^a	0,47 \pm 0,03 ^a	0,39 \pm 0,03 ^a
ΔP_2	0,89 \pm 0,04 ^a	1,37 \pm 0,07 ^b	1,19 \pm 0,07 ^{b,c}	1,13 \pm 0,07 ^{a,b,c}	1,23 \pm 0,06 ^{b,c}	1,09 \pm 0,05 ^{a,c}
Est	22,12 \pm 0,84 ^a	34,75 \pm 1,38 ^b	29,76 \pm 2,01 ^{bc}	29,70 \pm 1,64 ^{b,c}	31,97 \pm 1,99 ^{b,c}	26,13 \pm 1,24 ^{ac}
Edyn	26,61 \pm 1,00 ^a	41,56 \pm 1,52 ^b	35,76 \pm 2,25 ^{bc}	35,44 \pm 1,97 ^{bc}	38,23 \pm 2,24 ^{bc}	31,67 \pm 1,43 ^{ac}
ΔE	4,49 \pm 0,21 ^a	6,81 \pm 0,32 ^b	6,00 \pm 0,34 ^{bc}	5,74 \pm 0,35 ^{a,bc}	6,26 \pm 0,32 ^{b,c}	5,53 \pm 0,26 ^{a,c}

Fluxo (mL/s) e Volume (mL). ΔP_1 , ΔP_2 (cmH₂O): pressões dissipadas para vencer o componente viscoso e a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, respectivamente. $\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$ (cmH₂O). Est (cmH₂O/mL): elastância estática do pulmão. Edyn (cmH₂O/mL): Elastância dinâmica do pulmão. ΔE (cmH₂O/mL): Edyn - Est. Os valores correspondem à média de 11 a 20 animais por grupo \pm erro

padrão da média. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)