

Johnatas Dutra Silva

Efeitos terapêuticos do LASSBio596 associado ao surfactante exógeno em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por ligadura e perfuração do ceco.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia).

Orientadoras:

Profa. Dra. Patricia Rieken Macedo Rocco

Profa. Dra. Cristiane Sousa Nascimento Baez Garcia

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Johnatas Dutra

Efeitos terapêuticos do LASSBio596 associado ao surfactante exógeno em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por ligadura e perfuração do ceco.

Orientadoras: Patricia Rieken Macedo Rocco

Cristiane Sousa Nascimento Baez Garcia

1. Lesão Pulmonar Aguda 2. Sepsis 3. Surfactante 4. Terapia Farmacológica – Teses.

I. Rocco, Patrícia Rieken Macedo (Orient.). II. Baez-Garcia, Cristiane Souza Nascimento (Co-Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Pós Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Johnatas Dutra Silva

Efeitos terapêuticos do LASSBio 596 associado ao surfactante exógeno em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por ligadura e perfuração do ceco.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)

APROVADA POR:

Profa. Patricia Rieken Macedo Rocco, Ph.D - Orientadora

Profa. Associada, IBCCF^o, UFRJ.

Profa. Cristiane Souza Nascimento Baez Garcia, Ph. D – Co-Orientadora

Pesquisadora, Laboratório de Investigação Pulmonar, IBCCF^o, UFRJ.

Profa. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, Ph.D

Pesquisadora titular, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz.

Profa. Claudia Farias Benjamim, Ph.D

Profa. Adjunta, ICB, UFRJ.

Prof. Marcelo Einicker Lamas, Ph.D

Prof. Adjunto, IBCCF^o, UFRJ.

Profa. Ana Acácia de Sá Pinheiro - Revisora

Profa. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ). Não houve conflito de interesse com os fabricantes do produto Survanta.

DEDICATÓRIA

A Deus,

pela força para caminhar com segurança e determinação, por ter me ajudado através de seus ensinamentos a enxergar a verdade, a valorizar a grande oportunidade da vida e por ter me mostrado que os sonhos são reais!

Aos meus pais, Melchior e Lêda,

que me deram à vida e formaram meu caráter e personalidade, meus maiores incentivadores neste caminho.

A minha irmã Janaina,

pelo companheirismo e incentivo que possibilitaram minhas escolhas.

Ao me cunhado Daniel Guilherme (*in memoriam*),

pela amizade, ajuda e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Natan e Samuel,

pelo amor e carinho, perdoem-me pelos momentos de ausência.

Todos da minha família, pelo apoio, carinho, confiança, reconhecimento pelos meus esforços e por toda ajuda durante este período. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer em especial a importantes pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo e para as conquistas ao longo deste período.

Prof^a. **Patrícia Rocco**, minha orientadora, pela excelência profissional e dedicação à pesquisa que deu qualidade ao meu estudo e partilhou seus conhecimentos. Contribuiu ainda mais para que eu optasse em seguir a carreira acadêmica.

Prof^a. **Cristiane Nascimento**, que iluminou meu caminho, orientadora e amiga, pelo incentivo para eu entrar para o laboratório. Minha gratidão por tudo que me ensinou.

À colaboradora do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Prof^a. **Lídia Moreira Lima**, pela grande contribuição neste trabalho desde a obtenção do fármaco, auxílio e paciência para responder as minhas dúvidas.

Ao Prof^o. **Jack Haitsma**, por ter me ensinado a técnica de instilação intratraqueal de surfactante exógeno.

A Prof^o. **Vera Capelozzi**, pela ajuda nas análises e interpretação dos dados de microscopia eletrônica e apoptose.

A **Emília Ribeiro** e **Francisco Ribeiro**, que me acolheram no Rio e possibilitaram a minha dedicação ao Mestrado.

A amiga **Gisele Pena**, pela amizade, pelos seus ensinamentos, pela imensa ajuda neste trabalho e momentos irreverentes.

Às colaboradoras e amigas do Laboratório de Investigação Pulmonar, **Gisele Padilha** e **Mariana Genuíno**, pela ajuda nos experimentos, análise dos resultados e pela amizade.

As amigas de mestrado **Cynthia Samary** e **Carla Araújo**, ingressamos e estivemos juntos durante o mestrado. Amigas que conquistei nesta jornada que compartilharam as preciosidades de suas vidas.

As amigas: **Soraia Abreu, Mariana Antunes, Raquel Santos e Adriana Lopes**, companheiras de caminhada, pelas conversas nos momentos difíceis, obrigado pelo apoio em todos os momentos. Pelos inúmeros momentos de alegria.

As amigas do Laboratório de Investigação Pulmonar: **Débora Xisto, Isabela Henriques, Fernanda Cruz, Lívia Fujisaki, Patrícia Marques, Tatiana Maron, Débora Ornellas, Cíntia Santos, Lillian Moraes** pela ajuda e companheirismo. Pelos momentos descontraídos no Laboratório de Investigação Pulmonar que o fizeram um ótimo lugar para trabalhar.

Ao apoio técnico de **Ana, André e Jaqueline** que me ajudaram sempre quando precisei.

Aos bioteristas, **Maicom, Verônica e Viviane**, pelo zeloso cuidado com os animais durante este período.

RESUMO

Silva, Johnatas Dutra. **EFEITOS TERAPÊUTICOS DO LASSBio 596 ASSOCIADO AO SURFACTANTE EXÓGENO EM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO SO CECO**. Orientadoras: Patricia Rieken Macedo Rocco e Cristiane Souza Nascimento Baez Garcia. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

A instilação traqueal de surfactante tem sido proposta como terapêutica adjuvante por melhorar a troca gasosa, minimizando as repercussões da LPA/SDRA induzida por sepse. Entretanto, a patologia sistêmica severa, como na sepse, tem potencial de limitar significativamente a eficácia do tratamento farmacológico, como a terapêutica de reposição de surfactante pulmonar. O objetivo deste estudo é de investigar os efeitos da LASSBio 596, que exibe potente efeito inibitório sobre TNF- α associado ao surfactante exógeno no pulmão e lesões de órgãos distal em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Para tal, os grupos C e CLP foram sub-divididos aleatoriamente em subgrupos recebendo solução salina [0,2 ml, SAL, via intraperitoneal (ip)], LASSBio 596 (10 mg/kg ip, 596), surfactante (Survanta ® 4 ml/kg, 0,1 ml intratraquealmente, S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Vinte e quatro horas após o tratamento, mecânica pulmonar (resistência das vias aéreas, pressão viscoelástica e elastância estática), a histologia do pulmão (microscopia de luz e eletrônica) e broncoalveolar e lavado peritoneal e sangue foram medidos celularidade. Adicionalmente, bioquímica no sangue [uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)] foram analisadas. A taxa de sobrevivência de todos os animais foram monitorados durante quatro dias após o CLP. O LASSBio 596 associado ou não ao surfactante melhorou significativamente a sobrevivência. O CLP induziu: a) deterioração da mecânica e histologia pulmonares; b) alterações ultraestruturais da membrana alveolar capilar; c) aumento do teor de fibras colágenas nos septos alveolares; d) apoptose das células epiteliais de pulmão, rim, fígado e intestino; e) insuficiência renal e hepática. O LASSBio 596 melhorou a mecânica pulmonar, diminuiu a fração de áreas de colapso alveolar, atenuou a apoptose das células epiteliais de pulmão e órgãos distais; reduziu os níveis de uréia, creatinina, AST e ALT e diminuiu a celularidade no lavado broncoalveolar, peritoneal e sangue. O surfactante melhorou a mecânica e histologia pulmonares, mas não sobre o processo de resposta inflamatória sistêmica. No presente estudo, uma única dose de LASSBio596 associada ou não com o surfactante pode modular o processo inflamatório não só reduzindo o risco de lesão pulmonar, mas também a insuficiência de órgãos distais. Estes resultados sugerem que LASSBio 596 pode

representar uma nova estratégia terapêutica promissora para o tratamento da LPA induzida por CLP.

Palavras-chave: Lesão Pulmonar Aguda, Sepsis, Surfactante, Terapia farmacológica.

ABSTRACT

Silva, Johnatas Dutra. **Respiratory and systemic effects of the association between LASSBio596 and surfactant in an experimental model of sepsis-induced acute lung injury.** Orientadoras: Patricia ricken Macedo Rocco e Cristiane Souza Nascimento Baez Garcia. *Abstract* da Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

The tracheal instillation of surfactant has been proposed as adjunctive therapy to improve gas exchange while minimizing the impact of ALI/ARDS induced by sepsis. However, severe systemic disease, such as in sepsis, has the potential to significantly limit the effectiveness of pharmacological treatment, as replacement therapy of lung surfactant. The aim of this study is to investigate the effects of LASSBio596, which exhibits potent inhibitory effect on TNF- α associated with exogenous surfactant in the lung and distal organ injury in an experimental model of acute lung injury induced by cecal ligation and puncture. For this, groups C and CLP were sub-divided into subgroups receiving saline [0.2 ml, SAL intraperitoneally (ip)], LASSBio596 (10 mg / kg ip, 596), surfactant (Survanta ® 4 ml / kg, 0.1 ml intratracheally, S) or 596 LASSBio596 associated with surfactant (S-596). Twenty-four hours after treatment, lung mechanics (airway resistance, viscoelastic pressure and static compliance), lung histology (light and electron microscopy) and bronchoalveolar and peritoneal fluid and blood cell counts were measured. Additionally, biochemical blood [urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)] were analyzed. The survival rate of all animals were monitored for four days after CLP. The LASSBio 596 with or without surfactant significantly improved survival. CLP induced: a) deterioration of lung mechanics and histology b) ultrastructural alterations of the alveolar capillary membrane, c) increasing content of collagen fibers in alveolar septa, d) apoptosis of lung epithelial cells, kidney, liver and intestine, and) kidney and liver failure. 596 LASSBio The improved pulmonary mechanics, decreased the fraction of alveolar collapse areas, attenuated the apoptosis of lung epithelial cells and distal organs, reduced levels of urea, creatinine, AST and ALT and decreased cellularity in bronchoalveolar lavage, and peritoneal blood. The surfactant improved lung mechanics and histology, but not on the process of systemic inflammatory response. In this study, a single dose of 596 LASSBio associated or not with the surfactant can modulate the inflammatory process not only reduces the risk of lung injury, but also distal organ failure. These results suggest that LASSBio596 may represent a promising new therapeutic strategy for treatment of ALI induced by CLP.

Key-words: Acute lung injury, sepsis, surfactant, pharmacologic therapy.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| Folha de Rosto..... | ii |
| Ficha Catalográfica..... | iii |
| Folha de Aprovação..... | iv |
| Agências Financiadoras..... | v |
| Dedicatória..... | vi |
| Agradecimentos..... | vii |
| Resumo..... | ix |
| Abstract..... | xi |
| Sumário..... | xiii |
| Índice de Figuras..... | xviii |
| Índice de tabelas..... | xx |
| Abreviaturas..... | xxi |
| 1. Introdução..... | 2 |
| 1.1. Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo..... | 2 |
| 1.1.1. Definição..... | 2 |
| 1.1.2. Etiologia..... | 3 |
| 1.1.3. Epidemiologia..... | 3 |
| 1.2. Sepses..... | 5 |
| 1.2.1. Epidemiologia..... | 5 |
| 1.2.2. Fisiopatologia..... | 5 |
| 1.3. A disfunção do surfactante na Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo..... | 9 |

| | |
|--|----|
| 1.4. Terapia de Reposição de surfactante na Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo..... | 12 |
| 1.4.1. Estudos Experimentais..... | 14 |
| 1.4.2. Estudos Clínicos..... | 15 |
| 1.5. LASSBio596..... | 18 |
| 2. Justificativa..... | 22 |
| 3. Objetivos..... | 25 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 25 |
| 3.2. Objetivo específico..... | 25 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 27 |
| 4.1. Animais utilizados..... | 27 |
| 4.2. Caracterização dos grupos experiemntais..... | 27 |
| 4.3. Modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda induzida por ligadura e perfuração do ceco..... | 30 |
| 4.3.1. Cirurgia de Ligadura e perfuração do ceco..... | 30 |
| 4.3.2. Cirurgia Sham..... | 31 |
| 4.4. Tratamento dos animais..... | 31 |
| 4.5. Mecânica pulmonar..... | 32 |
| 4.5.1. Método de oclusão ao final da inspiração..... | 34 |
| 4.6. Microscopia de Luz..... | 34 |
| 4.6. Remoção dos pulmões..... | 37 |
| 4.6.2. Microscopia de luz – Fixação e preparo das lâminas..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.6.3. Microscopia de Luz – Análise histológica e morfométrica..... | 38 |
| 4.6.4 Microscopia de luz – Quantificação de fibras colágenas..... | 39 |
| 4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 40 |
| 4.8. Análise do fluido do lavado broncoalveolar, lavado peritoneal e sangue..... | 41 |
| 4.9. Bioquímica plasmática..... | 41 |
| 4.10. Estudo da apoptose..... | 41 |
| 4.10.1. Remoção e preparo dos órgãos..... | 41 |
| 4.10.2. Detecção in situ de células apoptóticas..... | 42 |
| 4.11. Análise estatística..... | 43 |
| 5. Resultados..... | 45 |
| 5.1. Determinação da dose do LASSBio596..... | 45 |
| 5.1.1. Sobrevida..... | 45 |
| 5.1.2. Mecânica pulmonar..... | 46 |
| 5.1.3. Análise qualitativa e quantitativa do parênquima pulmonar..... | 47 |
| 5.2. Associação entre surfactante exógeno com o LASSBio596..... | 49 |
| 5.2.1. Sobrevida..... | 49 |
| 5.2.2. Mecânica Respiratória..... | 50 |
| 5.2.3. Microscopia de luz..... | 51 |
| 5.2.3.1. Análise Qualitativa do Parênquima Pulmonar..... | 51 |
| 5.2.3.2. Análise Morfométrica do Parênquima Pulmonar..... | 53 |
| 5.2.3.3. Análise Quantitativa e Qualitativa de Fibras Colágenas No Parênquima Pulmonar..... | 55 |

| | |
|--|----|
| 5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 56 |
| 5.2.4.1. Análise Qualitativa do Parênquima Pulmonar..... | 56 |
| 5.2.4.2. Análise Semiquantitativa do Parênquima Pulmonar..... | 58 |
| 5.2.5. Celularidade no Lavado Broncoalveolar, Lavado Peritoneal e Sangue | 59 |
| 5.2.6. Bioquímica Plasmática..... | 61 |
| 5.2.6.1. Função Renal..... | 61 |
| 5.2.6.2. Função Hepática..... | 62 |
| 5.2.7. Apoptose de Pulmão, Fígado, Rim e Intestino..... | 63 |
| 5.2.7.1. Análise Qualitativa e Quantitativa..... | 63 |
| 6. Discussão..... | 69 |
| 7. Conclusão..... | 80 |
| 8. Perspectivas Futuras..... | 82 |
| 9. Referências Bibliográficas..... | 85 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática do reconhecimento do LPS e início da resposta séptica..... | 7 |
| Figura 2 – Esquema demonstrando as modificações do surfactante na LPA/SDRA... | 10 |
| Figura 3 - Mecanismo de ação da terapia de reposição do surfactante na LPA/SDRA. | 14 |
| Figura 4 – Estrutura química do LASSBio 596 desenhado pela hibridação molecular entre os protótipos talidomida, arilsulfonamida e sildenafil..... | 19 |
| Figura 5 – Desenho experimental e representação esquemática temporal do protocolo experimental..... | 28 |
| Figura 6 – Desenho experimental e representação esquemática temporal do protocolo experimental..... | 30 |
| Figura 7 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração..... | 36 |
| Figura 8 - Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar..... | 37 |
| Figura 9 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos..... | 39 |
| Figura 10 - Sobrevida dos animais em 24 horas após a cirurgia sham ou de ligadura e perfuração do ceco (CLP)..... | 45 |
| Figura 11 – Elastância estática pulmonar (Est,L) e variações de pressões para vencer os componentes resistivo ($\Delta P1$) e viscoelástico e/ou inhomogêneo ($\Delta P2$) do pulmão..... | 46 |
| Figura 12 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 – Percentagem de sobrevivência dos animais do grupo controle (C) (cirurgia Sham) e CLP (ligadura e perfuração do ceco)..... | 49 |
| Figura 14 – Est,L (elastância estática); $\Delta P1$, $\Delta P2$ e ΔP_{tot} (pressões resistiva e viscoelástica/inomogênea)..... | 50 |
| Figura 15 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina..... | 52 |
| Figura 16 – Fração de área de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar..... | 53 |
| Figura 17 – Fração de área de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e totais (TOT) por área de tecido no parênquima pulmonar..... | 54 |
| Figura 18 – Fotomicrografia eletrônica do parênquima pulmonar..... | 57 |
| Figura 19 – Número total de células no fluido do lavado broncoalveolar, lavado intraperitoneal e sangue..... | 60 |
| Figura 20 – Níveis séricos de uréia e creatinina no plasma..... | 61 |
| Figura 21 – Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma..... | 62 |
| Figura 22 – Fotomicrografias representativas dos pulmões..... | 64 |
| Figura 23 – Fotomicrografias representativas do fígado..... | 65 |
| Figura 24 – Fotomicrografias representativas dos rins..... | 66 |
| Figura 25 – Fotomicrografias representativas dos microvilos entéricos..... | 67 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Critérios para definição da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)..... | 2 |
| Tabela 2 – Mediadores inflamatórios e efeitos inibitórios no surfactante pulmonar..... | 11 |
| Tabela 3 – Estudos experimentais..... | 15 |
| Tabela 4 – Estudos clínicos..... | 17 |
| Tabela 5 – Fração de área de alvéolos normais e colapso alveolar e percentual de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) por área de tecido pulmonar | 47 |
| Tabela 6 – Análise quantitativa de fibras colágenas no parênquima pulmonar..... | 55 |
| Tabela 7 – Análise semi-quantitativa do parênquima pulmonar..... | 58 |
| Tabela 8 – Análise semi-quantitativa de células apoptóticas..... | 63 |

ABREVIATURAS

- ΔP** - Variação de Pressão
- $\Delta P1$** - Pressão resistiva
- $\Delta P2$** - Pressão viscoelástica e/ou inhomogênea
- ΔP_{tot}** - Variação total de pressão
- σ** - tensão superficial
- ALT** - Alanina aminotransferase
- AST** - Aspartato aminotransferase
- C** - controle
- CDR** - Domínio de reconhecimento de carboidratos
- CLP** - Cirurgia de Ligadura e Perfuração do Ceco
- cmH₂O** - centímetros de Água
- CRF** - Capacidade residual funcional
- DMH** - Doença da membrana hialina
- DPPC** - Dipalmitoilfosfatidilcolina
- E. coli*** - *Escherichia Coli*
- ECMO** - Oxigenação por membrana extracorpórea
- Est** - Elastância estática
- FiO₂** - Fração Inspirada de Oxigênio
- i.p.** - intraperitoneal
- i.t.** - intratraqueal
- i.v.** - intravenoso
- I:E** - Relação Inspiração:Expiração
- IL** - Interleucina
- iNOS** - Óxido nítrico sintetase induzida
- irpm** - incursões respiratórias por minuto
- L** - Pulmão
- LBA** - Lavado Broncoalveolar
- LP** - Lavado peritoneal
- LPA** - Lesão Pulmonar Aguda
- LPS** - Lipopolissacarídeo

MEC - Matriz Extracelular

mmHg - Milímetros de Mercúrio

NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B

NO - Óxido nítrico

PaO₂ - Pressão Parcial do Oxigênio no Sangue Arterial

PBS - Solução salina fosfato tamponada

PEEP - Pressão Positiva Expiratória Final

Pel - Pressão de retração elástica

Pi - Ponto de inflexão

PL - Pressão Transpulmonar

Pmáx - Pressão Máxima

PMN - Células Polimorfonucleares

PMN II - Pneumócitos tipo II

Ptr - Pressão Traqueal

Req - Resistência do equipamento

ROS - Espécies Reativas de oxigênio

S - Surfactante pulmonar

SAL - Solução Salina

SDMO - Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SDRRN - Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido

Sham - Simulação

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SP - Surfactante Pulmonar

SP-A - Proteína do surfactante A

SP-B - Proteína do surfactante B

SP-C - Proteína do surfactante C

SP-D - Proteína do surfactante D

TLR - Receptor semelhante a Toll

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UTIs - Unidades de Terapia Intensiva

V' - Fluxo

VSR - vírus sincicial respiratório

V_T - Volume Corrente

β - Beta

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

1.1.1. Definição

A primeira descrição da Lesão Pulmonar Aguda (LPA)/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi feita em 1967 por Ashbaugh e colaboradores ao relatarem 12 pacientes com falência respiratória aguda, cianose refratária à administração de oxigênio, redução da complacência pulmonar e evidência de infiltrados pulmonares bilaterais evidenciados nas radiografias de tórax (ASHBAUGH, 1967).

Em 1994, a Conferência do Consenso Americano-Europeu estabeleceu critérios clínicos, radiológicos e fisiológicos para o diagnóstico da LPA: 1) quadro de insuficiência respiratória de instalação aguda; 2) infiltrado pulmonar bilateral evidenciado na radiografia de tórax; 3) relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$, qualquer que fosse o nível da pressão positiva expiratória final (PEEP) utilizada; 4) pressão capilar pulmonar ≤ 18 mmHg, quando mensurada, ou nenhuma evidência clínica de hipertensão atrial esquerda. A grande distinção entre a LPA e, a sua forma mais grave, a SDRA seria o grau de hipoxemia, sendo a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ (Tabela 1) (BERNARD, 1994).

| | Falência Respiratória de Início | Radiografia de Tórax | Pressão de oclusão da artéria pulmonar | Oxigenação Relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| LPA | Agudo | Infiltrado Pulmonar Bilateral Difuso | < 18 mmHg | ≤ 300 |
| SDRA | Agudo | Infiltrado Pulmonar Bilateral Difuso | < 18 mmHg | ≤ 200 |

Tabela 1 – Critérios para definição da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Adaptada de BERNARD, 1994).

1.1.2. Etiologia

A etiologia da LPA/SDRA é multifatorial, podendo esta ser ocasionada tanto por uma agressão direta ao pulmão (LPA/SDRA pulmonar), cujo sítio primário da lesão é o epitélio alveolar, quanto indireta (LPA/SDRA extrapulmonar), resultante de uma resposta inflamatória sistêmica lesando primariamente o endotélio capilar pulmonar (ROCCO & PELOSI, 2008).

A causa mais freqüente da LPA/SDRA é a sepse levando a altas taxas de morbidade e mortalidade (COOKE, 2009).

1.1.3. Epidemiologia

Phua (2009) evidenciou que a taxa de mortalidade da LPA/SDRA entre os anos de 1994 e 2006 foi de 44% em estudos observacionais e 36% em estudos controlados.

1.1.4. Fisiopatologia

A LPA/SDRA parece diferir quanto à etiologia no que tange a fisiopatologia (ROCCO & ZIN, 2005; ROCCO & PELOSI, 2008; GARCIA, 2008). Na LPA/SDRA pulmonar, o epitélio alveolar é a primeira estrutura a ser lesada, acarretando ativação de toda uma cascata inflamatória, determinando, assim, o início da inflamação pulmonar. Além disso, há aumento da permeabilidade epitelial, levando à formação de edema alveolar. A perda da integridade do epitélio e a lesão das células tipo II, prejudica a produção e a reciclagem de surfactante bem como a depuração de fluidos do espaço alveolar. Em função dessas alterações, os alvéolos apresentam edema com fibrina, agregados neutrofílicos e/ou sangue (ROCCO & ZIN, 2001; LEITE-JUNIOR, 2008; ROCCO & PELOSI, 2008).

Na LPA/SDRA extrapulmonar, o primeiro alvo é a célula endotelial, lesada por mediadores inflamatórios circulantes liberados do foco extrapulmonar. O endotélio pulmonar é um tecido altamente especializado que possui funções fisiológicas, imunológicas e de síntese, além de armazenar inúmeras enzimas, receptores e moléculas de transdução, que interagem umas com as outras e com os constituintes da parede do capilar e células sanguíneas circulantes. A lesão no endotélio causa um aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de monócitos, leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e outras células. Além disso, ao contrário da lesão direta, na LPA/SDRA extrapulmonar, a principal alteração patológica é a congestão

microvascular e o edema intersticial, com posterior extravasamento para os espaços intra-alveolares (PELOSI, 2001; ROCCO & ZIN, 2001; ROCCO & PELOSI, 2008; GARCIA, 2008).

Independentemente da etiologia da LPA/SDRA, a lesão da barreira alvéolo-capilar acarreta grande influxo de células inflamatórias para dentro do pulmão. A lesão direta ao epitélio alveolar ou do endotélio pulmonar ocorre em função de liberação de mediadores inflamatórios. A infiltração de neutrófilos induz liberação de enzimas, tais como elastases (FUJISHIMA, 2008), e espécies reativas de oxigênio (contribuindo para a perpetuação da lesão pulmonar) (KUWAHARA, 2005). Os macrófagos e linfócitos também são recrutados para o pulmão e produzem grandes quantidades de citocinas pró- (fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-13), sendo o balanço dessas citocinas essencial para amplificar e perpetuar a resposta inflamatória local e sistêmica (STRIETER, 2002).

O lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina presente nas bactérias gram-negativas, atua como molécula pró-inflamatória, sendo de importância fundamental para a infiltração de neutrófilos nos pulmões. A molécula de LPS encontra-se presa à membrana externa pela porção lipídica de sua molécula (COHEN, 2002). A sinalização inflamatória é dependente da ligação do LPS ao seu principal receptor, receptor semelhante à Toll (*Toll-like receptor*)-4 (TLR-4), que é expresso em macrófagos, neutrófilos e em células endoteliais. A ligação da molécula de LPS aos receptores de superfície dos macrófagos leva à ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B). O NF- κ B é um fator de transcrição implicado na regulação de diversos fenômenos biológicos, incluindo: apoptose, sobrevivência, crescimento e divisão de células, imunidade inata, diferenciação celular e liberação de mediadores inflamatórios. IL-1 β , IL-6 e TNF- α são os principais mediadores pró-inflamatórios liberados no processo séptico. O TNF- α e a IL-1 β são citocinas derivadas predominantemente da ativação dos macrófagos que perpetuam a ativação e extravasamento de neutrófilos, assim como aumento da permeabilidade alvéolo-capilar (LIN, 2003). A IL-1 β ativa os neutrófilos e induz supra-regulação de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Adicionalmente, IL-1 β estimula a produção da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) pelas células do endotélio contribuindo para a vasodilatação característica do choque séptico. A IL-6 é produzida por monócitos/macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e células

musculares lisas (BHATIA, 2002; COHEN, 2002), e induz a ativação de células T e a atração de neutrófilos ao local da inflamação. A IL-8 também é responsável pelo influxo de neutrófilos para o pulmão (PUNNET, 2005).

Os neutrófilos produzem fatores que aumentam a permeabilidade alvéolo-capilar, como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e enzimas proteolíticas incluindo elastases. Juntos, estes produtos são considerados efetores primários no dano ao leito capilar alveolar, tornando este mais permeável e permitindo a transudação de plasma e células para o interstício e espaços alveolares, resultando em edema pulmonar e hemorragia. O fator de transformação de crescimento (TGF)- β é responsável por ativar fibroblastos induzindo fibrose pulmonar na LPA (SYNENKI, 2007). É interessante ressaltar que os perfis das citocinas estão associados e relacionados à gravidade e ao prognóstico da LPA/SDRA (BOZZA, 2007).

1.2. Sepses

A sepsis agrupa um conjunto de síndromes clínicas heterogêneas, sendo caracterizada por resposta inflamatória intensa e mecanismos de coagulação do hospedeiro frente a uma infecção. Clinicamente, a sepsis se manifesta pela ocorrência da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e progride, com frequência variável, para choque, síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) e morte (ACCP/SCCM, 1992).

1.2.1. Epidemiologia

A despeito do avanço técnico-científico, a sepsis grave e o choque séptico continuam sendo importantes problemas clínicos associados a altas taxas de morbidade e mortalidade (ANGUS, 2001; SILVA, 2006). A sepsis é a principal causa de morte nas UTIs nos Estados Unidos (MARTIN, 2003). Os estudos epidemiológicos referem uma taxa de mortalidade entre 20% e 60%. Vale ressaltar que a incidência da sepsis tem sido estimada em 751.000 casos por ano nos Estados Unidos e 400.000 novos casos por ano no Brasil (FRIEDMAN, 1998; SILVA, 2004; TELES, 2008).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 51% dos pacientes com sepsis grave são internados em UTIs por um longo período de tempo, acarretando um gasto

anual de aproximadamente US\$ 17 bilhões (OPAL, 2003). No Brasil, estima-se um gasto anual de US\$ 8,5 bilhões (MARSHALL, 2005).

1.2.2. Fisiopatologia

Diversos estudos descrevem a resposta do hospedeiro à infecção sistêmica como característica da sepse. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , caracterizam a sepse, e se correlacionam diretamente com a gravidade e a mortalidade da doença (MIRA, 1999).

A resposta inflamatória induzida pela sepse ocorre, em grande parte, devido à resposta do organismo do hospedeiro contra os efeitos diretos ocasionados pelo microorganismo invasor. Essa resposta se inicia com elementos bacterianos que possuem a capacidade de desencadear esta resposta. Conforme supracitado, as bactérias gram-negativas possuem, na parede celular, LPS que atua como um antígeno causando a sepse. Além disso, outros antígenos bacterianos são identificados e podem interagir de forma semelhante ao LPS promovendo diferentes respostas do organismo ao hospedeiro (SCHUMANN, 1990; COHEN, 2002).

Os receptores semelhantes à Toll (TLRs) desempenham um papel importante na resposta ao LPS e outros elementos patogênicos bacterianos. Apesar do TLR-4 ser apontado como o principal receptor para o LPS, outros receptores semelhantes a Toll (TLRs) parecem ser capazes de reconhecer esta endotoxina e ativar o sistema imune inato propagando o estado séptico. A ativação de TLRs pelos ligantes patogênicos bacterianos estimula vias de sinalização, que resultam em ativação de fatores de transcrição nuclear (Figura 1). Esses fatores resultam no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas para leucócitos, moléculas de adesão envolvidas no processo de migração e rolagem de leucócitos, prostaglandinas e iNOS (HARTER, 2004; TSUJIMOTO, 2008).

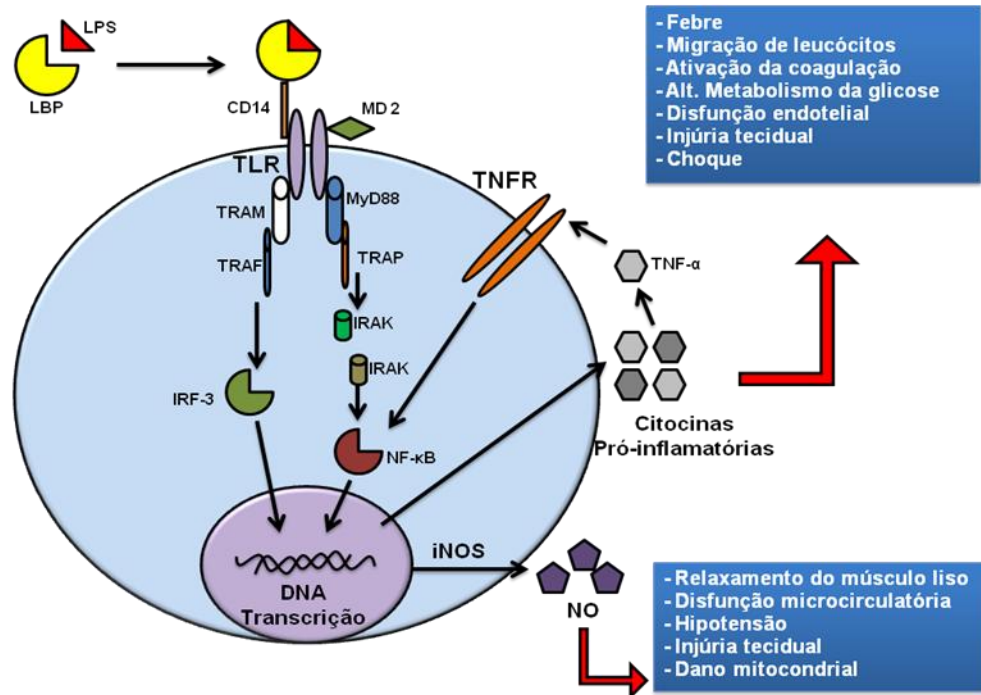


Figura 1 – Representação esquemática do reconhecimento do LPS e início da resposta séptica. LPS e outros produtos bacterianos são reconhecidos pelas células do hospedeiro que produzem resposta inflamatória via receptores semelhantes a Toll (TLRs) ativando vias de sinalização intracelulares. A ativação destas vias leva a ativação do fator de transcrição NF-κB e fatores liberadores de insulina (IRF-3), resultando em produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) que possuem um papel central na patogênese da sepse e podem propagar a resposta inflamatória (Adaptado de WEIL, 2009).

TNF- α , IL-1 e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias que desempenham um importante papel na resposta séptica. Essas citocinas contribuem para o desenvolvimento da fase aguda da resposta séptica do hospedeiro cujas manifestações clínicas incluem febre, leucocitose, alterações no metabolismo da glicose e muscular, e ativação do sistema de complemento e cascatas de coagulação (GRIBAR, 2008).

Além do papel destas citocinas pró-inflamatórias, os estudos têm apresentado a participação de ROS. O óxido nítrico (NO) é o ROS mais conhecido por desempenhar uma variedade de funções fisiológicas e patológicas. Seu papel na sepse ainda é bem discutido, os níveis de NO estão aumentados na sepse e parecem ocasionar vasodilatação pelo relaxamento da musculatura lisa vascular, hipotensão sistêmica e alterações microcirculatórias (INCE & SINAASAPPEL, 1999).

A complexidade da resposta imune do hospedeiro inclui não só a ativação de múltiplas vias celulares e seus produtos finais, mas também a variabilidade da

resposta a patógenos diferentes, dificultando a segmentação deste complexo antígeno-hospedeiro (GRIBAR, 2008).

Diversos mecanismos contribuem para a patogênese da lesão e SDMO na sepse. A fase aguda da sepse é caracterizada por uma resposta intensa do hospedeiro resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios, ativação de células do sistema imune, alterações metabólicas e circulatórias. Esta resposta também resulta em um estado pró-coagulatório intenso. Tem-se estabelecido que a inflamação e a coagulação estão intimamente correlacionadas e contribuem para a patogênese da sepse (BONE, 1997).

A sepse é o insulto mais comum para o desenvolvimento da SDMO (BARIE, 2009). A SDMO pode ser definida como disfunção progressiva, potencialmente reversível, de dois ou mais órgãos ou sistemas após distúrbio agudo da homeostasia sistêmica. A SDMO é a principal causa de morte em pacientes críticos, e acredita-se que tal síndrome se inicia pela intensa resposta inflamatória sistêmica (MARTIN, 2005, MIZOCK, 2009).

O principal órgão, embora não exista uma hierarquia de acometimento, a ser afetado pela sepse é o pulmão, seguido dos sistemas: hepático, hematológico, gastrointestinal e renal que são mais tardiamente acometidos e podem ou não evoluir para disfunção orgânica (CRYER, 2000). A lesão de órgãos se desenvolve secundariamente à ativação da resposta inflamatória ocasionada pela hipóxia tecidual, e é caracterizada inicialmente por ativação de macrófagos, secreção de citocinas e citotoxinas. Citotoxinas são liberadas principalmente por células CD8⁺ e agem localmente lesando as paredes celulares e as junções comunicantes (BARIE, 2009).

A infiltração de neutrófilos no tecido representa uma segunda característica importante no desenvolvimento da SDMO, sendo acompanhada por aumento da permeabilidade vascular resultando em manifestações periféricas, como o desenvolvimento de edemas pulmonar e cerebral. Na SDMO, a resposta inflamatória é acompanhada pelo desenvolvimento de trombose microvascular, resultante da ação de mediadores pró-inflamatórios que ativam fatores de coagulação e teciduais, ocasionando hipóxia e perpetuação da resposta inflamatória, aumentando assim o risco de SDMO (BARIE, 2009).

Os neutrófilos desempenham um papel importante na patogênese da sepse, liberando citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , que lesam diretamente os

tecidos. As alterações no endotélio microvascular aumentam a adesão de neutrófilos e transmigração para o tecido, resultando em oclusão microvascular e hipóxia de tecidos adjacentes (BROWN, 2006).

A SDMO é caracterizada por um intenso distúrbio na homeostasia ocasionado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios bem como um período distinto caracterizado por imunossupressão. Nesse período há aumento das concentrações séricas de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-13 e TGF- β , prejuízo na produção de anticorpos e anergia de linfócitos T. Essa resposta anti-inflamatória sistêmica compensatória (CARS) resulta em uma imunoparalisia, que leva a alta incidência de infecções nosocomiais (BARIE 2008).

Outra manifestação característica do desenvolvimento da SDMO é o estado de 'hibernação' que pode ser explicado por danos mitocondriais resultantes da fosforilação oxidativa. Nesse estado, as células produzem e gastam menos energia tornando o órgão, como um todo, menos funcional. Esta demanda de energia reduzida pode evitar a morte celular em face à diminuição da perfusão permitindo uma eventual recuperação funcional do órgão após a resolução do estado séptico. A capacidade de prevenir ou reverter o dano mitocondrial e resgatar o metabolismo celular possuem implicações no tratamento da sepse (MIZOCK, 2009).

1.3. A disfunção do surfactante pulmonar na Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

O surfactante pulmonar (SP) apresenta-se reduzido na luz alveolar decorrente da lesão dos pneumócitos do tipo II (PII) na LPA/SDRA (RANDHAWA & BELLINGAN 2007), bem como inativado devido a interações biofísicas e/ou químicas do SP com substâncias dentro dos alvéolos tais como plasma, proteínas do sangue, lipídeos de membrana, entre outros (ácidos graxos, espécies reativas de oxigênio, proteases e fosfolipases) (GÜNTHER, 2001).

A primeira evidência do comprometimento da função do SP na LPA/SDRA foi descrita, em 1979, por Petty e colaboradores, ao avaliarem os pulmões de pacientes que morreram por insuficiência respiratória. Estudos mais recentes, através da avaliação do fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com LPA/SDRA, relatam alterações nas propriedades tensoativas, além de alterações no perfil dos fosfolipídios e ácidos graxos, diminuição dos níveis de apoproteínas do SP,

diminuição do conteúdo de grandes agregados (corpos lamelares, mielina tubular e vesículas multilamelares), inibição do SP por extravasamento de proteínas do plasma e por mediadores inflamatórios (GÜNTHER, 2001; FRERKING, 2001).

Sob condições fisiológicas, 80-90% do material extracelular do SP é recuperado na fração dos grandes agregados, que se caracteriza por um alto teor de proteína B do surfactante (SP-B) e excelente atividade tensoativa. Na LPA/SDRA e em doenças inflamatórias pulmonares agudas ocorre aumento na fração de pequenos agregados caracterizado por perda de SP-B e de atividade tensoativa. Esses pequenos agregados representam produtos da degradação do filme de surfactante. A razão deste desequilíbrio entre pequenos e grandes agregados ainda não é bem estabelecido, mas acredita-se que seja em função da diminuição da secreção de material recém-sintetizado e da reciclagem do surfactante inativo, degradação de PII devido a mediadores inflamatórios aceleram este desequilíbrio. Outro mecanismo discutido é a ação de proteases, inibindo a função dos lipídios e das proteínas, principalmente a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e o SP-B (Figura 2) (GÜNTHER, 2001).

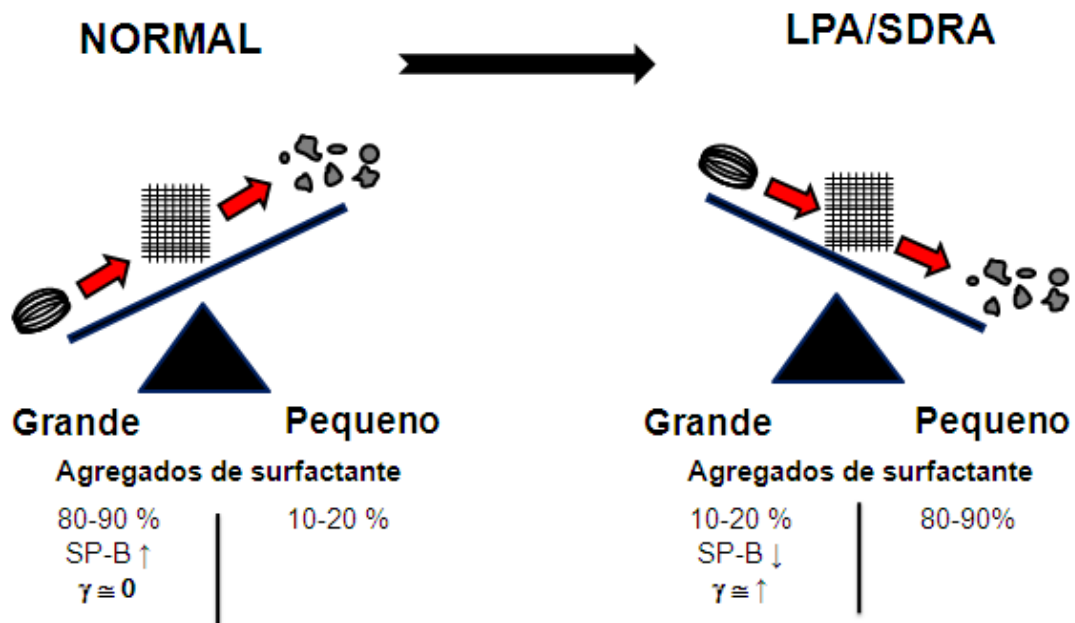


Figura 2 – Esquema demonstrando as modificações do surfactante na LPA/SDRA. Em condições fisiológicas, 80-90% do material extracelular do surfactante é constituído de frações de grandes agregados, altas concentrações de SP-B e tensão superficial próxima a zero. Na LPA/SDRA ocorre um aumento da fração de pequenos agregados, diminuição do conteúdo de SP-B e aumento da tensão superficial (Adaptado de GÜNTHER 2001)

O extravasamento de proteínas plasmáticas, tais como albumina, hemoglobina e fibrinogênio, para o espaço alveolar devido à lesão da barreira alvéolo-capilar é um evento precoce na patogênese da LPA/SDRA e contribui substancialmente para as alterações das propriedades biofísicas do surfactante (FRERKING, 2001; HAITSMAN, 2004). No espaço alveolar, o fibrinogênio é convertido em fibrina, devido a uma elevada atividade pró-coagulatória. A função do surfactante é inibida pela incorporação de componentes hidrofóbicos do surfactante (fosfolípidios, SP-B e SP-C) na fibrina polimerizada, com conseqüente perda de suas atividades tensoativas nas áreas com fibrina e membrana hialina. A persistência deste material resulta em atividade fibroproliferativa com conseqüente diminuição da complacência pulmonar (FRERKING, 2001).

Uma rede complexa de mediadores inflamatórios, produzidos no compartimento alveolar por neutrófilos e macrófagos ativados, células epiteliais e fibroblastos, inibe diretamente o SP (Tabela 2) (GÜNTHER, 2001).

| Impacto de mediadores inflamatórios na função do surfactante pulmonar | |
|---|--|
| Mediador inflamatório | Efeitos |
| Fosfolipase | |
| PL-A ₂ , PL-C | Formação de lisofosfolípidios Formação de ácidos graxos livres Diminuição da atividade tensoativa Maior sensibilidade para inibição por proteínas plasmáticas |
| Citocinas | |
| TNF- α | Efeitos inibitórios sobre a expressão de SP-A e SP-B |
| Proteases | |
| Elastase | Degradação de SP-A, SP-B e SP-C; diminuição da atividade tensoativa |
| Tripsina | Degradação de SP-A |
| Surfactante 'convertase' | Aumento da conversão de grandes agregados em pequenos agregados |
| Radicais de oxigênio | |
| ROS, ozônio | Diminuição da atividade tensoativa Induz peroxidação lipídica Inibição de SP-A |
| Mediadores lipídicos | |
| Ácido araquidônico | Diminuição da atividade tensoativa |
| Atividade neutrofílica | Diminuição da atividade tensoativa Degradação de SP-A |

Tabela 2 – Mediadores inflamatórios e efeitos inibitórios no surfactante pulmonar. PL-A₂ = Fosfolipase A₂, PL-C = fosfolipase C, TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa, ROS = Espécies reativas de oxigênio (adaptada de GÜNTHER 2001).

Independentemente da causa da disfunção do surfactante, há alterações funcionais pulmonares, tais como: diminuição da complacência pulmonar e capacidade residual funcional (CRF); atelectasia; distúrbios de troca gasosa e edema (CHRISTMANN, 2009).

1.4. Terapia de reposição de surfactante pulmonar na Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

O objetivo da utilização da terapia de reposição do surfactante exógeno na LPA/SDRA é reverter principalmente os efeitos determinados pela disfunção do SP endógeno (Figura 3). Os estudos sobre a terapia com SP exógeno na LPA/SDRA mostraram melhora da função pulmonar, oxigenação arterial, da necessidade de oxigenioterapia suplementar ou de pressões elevadas durante a ventilação mecânica. Além disso, o uso profilático ou precoce do SP exógeno mostrou-se eficaz em diminuir a gravidade da evolução da doença (RAGHAVENDRAN, 2008).

Os efeitos benéficos da administração do SP seguem uma ordem temporal. Após a instilação do SP exógeno, observa-se uma melhora rápida da oxigenação arterial, entretanto, o aumento da complacência pulmonar ocorre mais lentamente. Nas primeiras horas após a administração do SP exógeno, observa-se um aumento da CRF, decorrente do recrutamento dos alvéolos colapsados e da estabilização dos alvéolos ainda abertos. O aumento da CRF propicia uma maior área de superfície para as trocas gasosas, melhora na relação ventilação-perfusão e diminuição do *shunt*. Nas horas subseqüentes, com o recrutamento de novas unidades alveolares, há diminuição do trabalho respiratório (JOBE, 1993, LEWIS & VELDHUIZEN, 2003).

Dois tipos de surfactante exógeno estão disponíveis para a terapêutica de reposição: o natural e o sintético. O surfactante natural é extraído de suíno ou bovino. Esse produto contém proteínas do surfactante hidrofóbicas, SP-B e SP-C. Comparados a preparações sintéticas, os surfactantes naturais têm melhor atividade biofísica e maior resistência à inativação por proteínas do plasma e mediadores inflamatórios. Os surfactantes sintéticos possuem a vantagem de possuírem uma composição mais uniforme e não oferecem risco de transmissões de doenças (ex.: encefalopatia bovina) ou sensibilização às proteínas do surfactante. Nos últimos anos, novos surfactantes sintéticos têm sido desenvolvidos contendo proteínas recombinadas e/ou análogos das proteínas do SP. No entanto, os surfactantes naturais são os únicos, no momento, disponíveis para utilização. Estudos estão sendo realizados para analisar os efeitos dos surfactantes sintéticos cujos componentes são análogos das proteínas e peptídeos encontrados no surfactante natural (RAGHAVENDRAN, 2008).

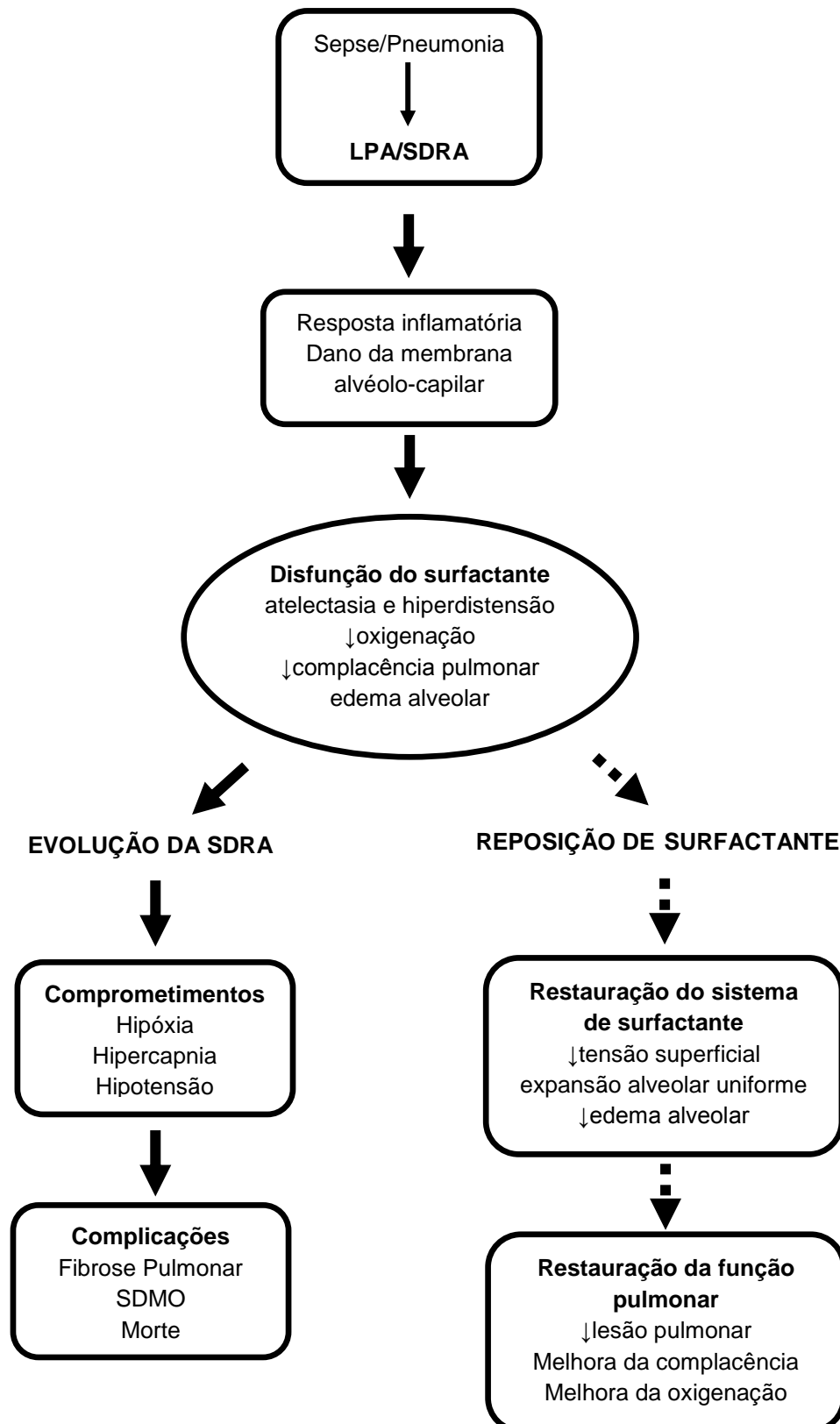


Figura 3 - Mecanismo de ação da terapia de reposição do surfactante na LPA/SDRA. Insultos contribuem para a resposta inflamatória inicial acarretando modificações no sistema do surfactante pulmonar endógeno que predispõe o pulmão a uma disfunção pulmonar progressiva (seta cheia). A terapia de reposição do surfactante visa resgatar a atividade tensoativa do sistema de surfactante pulmonar endógeno nos alvéolos pulmonares de modo a obter impacto sobre a função pulmonar (seta pontilhada). SDMO = Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SILVA 2009).

Algumas questões ainda perduram, tais como: o melhor momento de administração do surfactante. Adicionalmente, diversos fatores influenciam a resposta a terapia de reposição de SP: (1) a natureza e a gravidade da lesão pulmonar; (2) o tipo de surfactante utilizado; (3) a dose, a frequência e o método de instilação traqueal do surfactante; (4) o tempo de administração do surfactante na doença; e (5) o modo ventilatório utilizado durante e depois da administração do SP.

1.4.1. Estudos Experimentais

A capacidade da terapia de reposição do SP em melhorar a mecânica pulmonar e a oxigenação foi bem estabelecida em modelos experimentais de LPA/SDRA, com um importante impacto sobre a mortalidade (KOBAYASHI, 1990; LEWIS, 1992; EIJKING, 1993; BALARAMAN, 1998; STROHMAIER, 2005; CALKOVSKA, 2005; COLVERO, 2008; DREYER, 2008; HILGENDORFF, 2008). Alguns resultados destes estudos podem ser observados na tabela 3.

Rasaiah e colaboradores investigaram os efeitos do tratamento com SP exógeno em modelo de LPA induzida por cirurgia de ligadura e perfuração de ceco (CLP). Nos animais CLP, as alterações do sistema de SP pulmonar endógeno foram observadas assim como aumento nas concentrações de IL-6 no LBA quando comparado ao grupo controle. A administração do surfactante exógeno não afetou a mecânica pulmonar ou os níveis de IL-6 nos grupos CLP e controle. Contudo, os animais CLP tratados com surfactante exógeno apresentaram uma maior taxa de sobrevivência (RASAI AH, 2003). Apesar dos efeitos precoces da terapia de reposição de surfactante sobre a função pulmonar estarem bem documentados na literatura em modelos de LPA/SDRA, tais efeitos são controversos quando avaliados a longo prazo (EIJKING, 1993; BALARAMAN, 1998; DREYER, 2008).

| AUTOR | MODELO | VIA DE ADMINISTRAÇÃO | RESULTADOS |
|-------------------|-------------------------------|----------------------|---|
| SUN, 2009. | LPA induzida por ácido oleico | Aerossol | Melhora da sobrevivência, Melhora a função pulmonar, ↓ edema pulmonar, ↑ fosfolípidos no LBA, ↓ proteína total do LBA e dos níveis de TNF- α |
| COLVERO, 2008. | Aspiração de Mecônio | Intra-traqueal | Melhora da oxigenação |
| DREYER, 2008. | Isquemia e reperfusão | Intra-traqueal | ↓ edema intra-alveolar, ↓ formação de atelectasias |
| CALKOVSKA, 2005. | Lavagem Pulmonar | Intra-traqueal | Melhora da oxigenação, ↓ shunt direito-esquerdo, ↓ resposta inflamatória |
| STROHMAIER, 2005. | Contusão pulmonar | Intra-traqueal | Melhora da função pulmonar, melhora da contusão pulmonar |
| BALARAMAN, 1998. | Lavagem Pulmonar | Intra-traqueal | Melhora da oxigenação, melhora da função pulmonar |
| EIJKING, 1993. | Aspiração ácida | Intra-traqueal | Melhora da oxigenação, ↓ concentração de proteínas no LBA |

Tabela 3 – Estudos experimentais (SILVA, 2009).

1.4.2. Estudos Clínicos

As primeiras tentativas de reposição do SP exógeno foram em neonatos nas décadas de 60-70, após o relato de que a deficiência da substância tensoativa seria o principal fator na patogenia da Síndrome do Desconforto Respiratório do recém-nascido (SDRRN), anteriormente denominada Doença da Membrana Hialina (DMH). Esses primeiros estudos utilizaram a fosfatidilcolina sob a forma de aerossol e não demonstraram resultados benéficos na evolução destes pacientes. Após os resultados desta primeira experiência, os estudos avançaram para a compreensão da fisiologia do surfactante endógeno e do estabelecimento de modelos experimentais que apresentassem deficiência da substância tensoativa (GREGORY, 1997; HILGENDORF, 2008; ENGLE, 2008).

Fujiwara e colaboradores, em 1980, relataram o primeiro resultado positivo do uso terapêutico do surfactante exógeno em humanos. A partir deste ensaio, uma série de estudos não controlados, utilizando diversas metodologias, demonstraram uma aparente melhora na função pulmonar em neonatos com SDRRN. Estes

primeiros resultados associados aos resultados observados em modelos experimentais foram positivos, a ponto de convencer pesquisadores sobre os benefícios desta terapêutica em neonatos com SDRN (FUJIWARA, 1980).

Desde então, nos últimos dez anos, diversos estudos clínicos estudaram a eficácia do SP exógeno em pacientes com LPA/SDRA. Os principais resultados encontrados em estudos clínicos estão listados na tabela 4.

No que concerne o papel da terapia de reposição do SP, estudos têm mostrado evidências de que esta, quando realizada em pacientes com SDRA grave, pode resultar em melhora imediata da troca gasosa e das anormalidades radiográficas (SPRAGG, 2003, WARREN, 2006). Wiswell e colaboradores observaram melhora da função pulmonar, além da oxigenação, em 12 adultos com SDRA submetidos à lavagem lobar segmentar por broncoscopia para a preparação de um surfactante sintético com a presença de SP-B. Esta preparação é chamada de surfaxin ou surfactante KL-4 (WISWELL, 1999).

Estudos fases 2 e 3 relataram o impacto da terapia com SP exógeno na oxigenação e no padrão ventilatório de pacientes com LPA/SDRA e observaram melhora em poucas horas após a administração do surfactante. A melhora na oxigenação foi observada nos grupos tratados com SP quando comparados ao grupo controle, no entanto, não houve diferença significativa quanto à diminuição dos dias de ventilação mecânica nem quanto impacto na sobrevida dos pacientes (SPRAGG, 2003).

Em outro estudo realizado com 10 pacientes portadores de SDRA grave foi observado melhora imediata na oxigenação, sendo sustentada com uma dose repetida de surfactante 6 horas após a primeira administração (MILBERG, 1995).

Davidson e colaboradores publicaram uma meta-análise sobre estudos clínicos que utilizaram a terapêutica de reposição do SP em pacientes com SDRA e concluíram que a terapia possui um importante impacto sobre a oxigenação, porém sobre a mortalidade os resultados são ainda controversos. A falta de impacto sobre a mortalidade encontrada em alguns estudos pode ser atribuída ao fato dos pacientes com SDRA falecerem por SDMO. Outro fator pode ser atribuído por não haver um consenso sobre a terapêutica de reposição do surfactante, havendo diferenças entre os estudos analisados quanto à composição do surfactante utilizado, o momento da administração, a dose administrada, a forma de

administração, oxigenoterapia complementar e modo ventilatório utilizado nestes estudos (WARREN, 2006).

Apesar das controvérsias e das diferentes estratégias de tratamento, o SP exógeno tem sido apontado como uma estratégia terapêutica segura.

| AUTOR | PACIENTES | QUADRO CLÍNICO | RESULTADOS |
|--------------------|------------------|-----------------------------------|--|
| WILLSON, 2005. | Crianças | SDRA por insultos diversos | Melhora da oxigenação |
| GÜNTHER, 2002. | Adultos | SDRA | Melhora da atividade tensoativa |
| HERMON, 2002. | Crianças | SDRA / Pós operatório cardíaco | Melhora da oxigenação |
| HERTING, 2002. | Crianças | Pneumonia | Melhora da oxigenação |
| WISWELL, 1999. | Adultos | SDRA por insultos diversos | Melhora da oxigenação |
| LOPEZ-HERCE, 1999. | Crianças | SDRA / Pós operatório cardíaco | Melhora da oxigenação |
| LUCHETTI, 1998. | Neonatos | Bronquiolite viral | Melhora da oxigenação |
| WALMRATH, 1996. | Adultos | SDRA por sepse | Melhora da oxigenação |
| WILLSON, 1996. | Crianças | SDRA por insultos diversos | Aumento da sobrevida e melhora da oxigenação |
| FINDLAY, 1996. | Neonatos | Aspiração de Mecônio | Melhora da oxigenação e diminuição do tempo de ventilação mecânica |
| SPRAGG, 1994. | Adultos | SDRA por insultos diversos | Melhora da oxigenação e da função biofísica |
| LOTZE, 1993. | Neonatos | ECMO, múltiplas indicações | Melhora da oxigenação e Diminuição da ECMO |
| KHAMMASH, 1993. | Neonatos | Aspiração de Mecônio | Melhora da oxigenação em 75% dos pacientes |
| AUTEN, 1991. | Neonatos | Pneumonia ou Aspiração de Mecônio | Melhora da oxigenação |

Tabela 4 – Estudos clínicos (SILVA e cols., 2009).

1.5. LASSBio596

O LASSBio596, ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil] benzóico, é um híbrido da talidomida com o sildenafil, desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que exibe potencial efeito inibitório de TNF- α (ROCCO 2003). O LASSBio596 foi desenhado pela modificação molecular da talidomida visando a otimização das suas propriedades farmacoterapêuticas e a eliminação dos seus efeitos teratogênicos. Ademais, o LASSBio596 foi construído a partir da hibridação de protótipos originados da talidomida, fármaco modulador das ações do TNF- α , aril sulfonamida, e do sildenafil (LIMA, 2002).

Com base em dados acerca da relação entre estrutura química-atividade biológica de cada protótipo, foi realizado o processo de dissecção molecular, com mapeamento das unidades farmacofóricas e auxofóricas dos protótipos. Após a identificação, procedeu-se a etapa de combinação dos farmacóforos selecionados, empregando-se a estratégia de hibridação molecular (LIMA & LIMA, 2009). Do ponto de vista químico, o LASSBio596 constitui uma molécula aquiral, da classe dos ácidos carbamoilbenzóicos, obtida por síntese linear em 4 etapas (ROCCO, 2009) (Figura 4). O potencial terapêutico do LASSBio596 foi avaliado na LPA induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* resultando em melhora das alterações funcionais e histológicas pulmonares, redução da infiltração neutrofílica, do nível do TNF- α no fluido do lavado broncoalveolar e do conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar (ROCCO, 2003). Os efeitos LASSBio596 também foi avaliado em modelo de inflamação alérgica crônica evidenciando-se redução dos processos inflamatórios e fibrogênico resultando em melhora morfo-funcional pulmonar (CAMPOS, 2006).

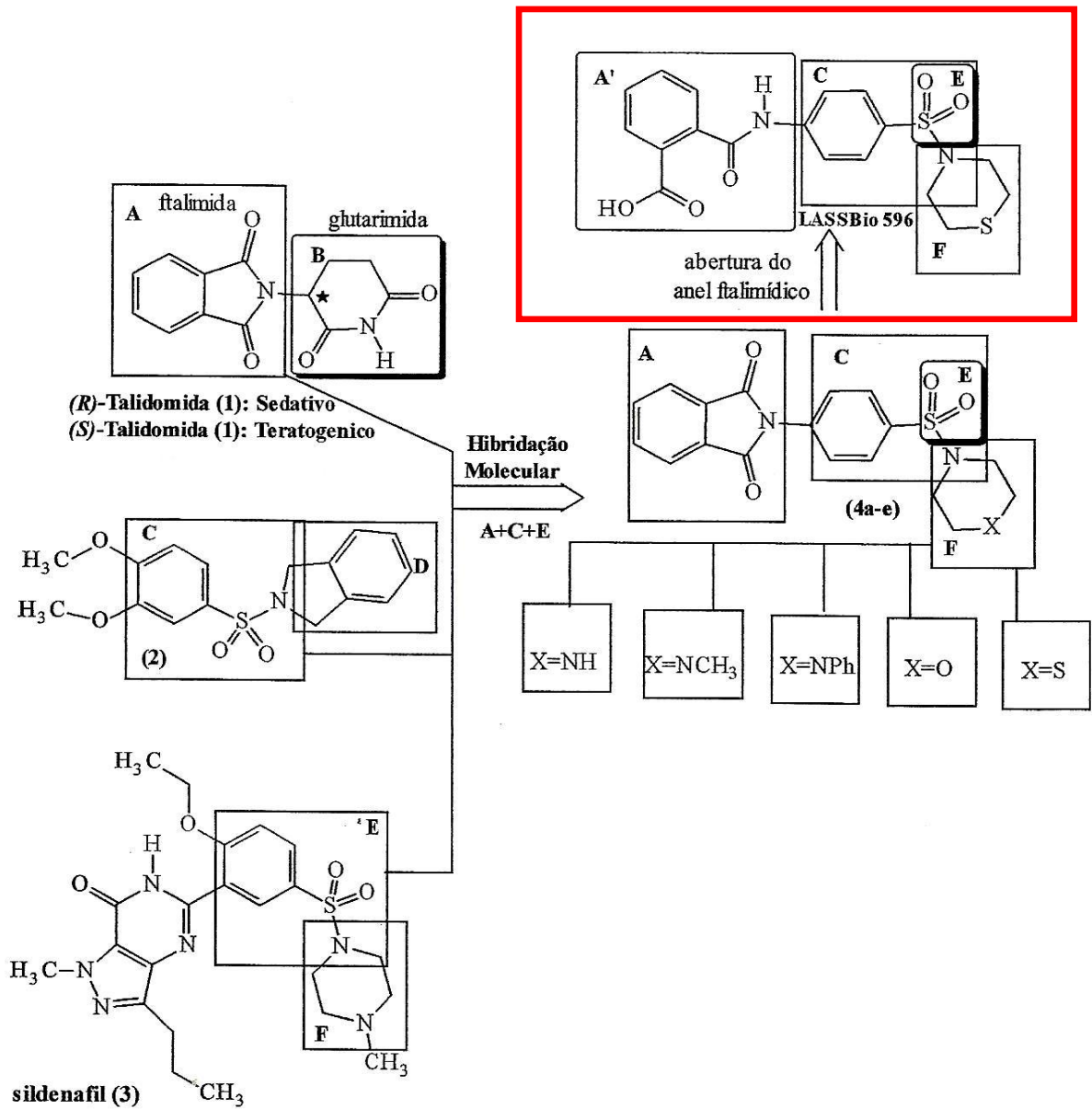


Figura 4 – Estrutura química do LASSBio596 desenhado pela hibridação molecular entre os protótipos talidomida, aril sulfonamida e sildenafil.

Essa dissertação constará de duas etapas, sendo que na primeira estabeleceremos a melhor dose a ser utilizada no modelo de LPA induzida por CLP tomando como base a taxa de sobrevivência e as alterações morfo-funcionais pulmonares. Uma vez determinada a melhor dose, avaliaremos se o LASSBio596 associado ou não ao surfactante é capaz de minimizar não só as alterações no pulmão, como também no fígado, rim e intestino.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O pulmão é o principal órgão afetado durante a SDMO pós-sepse, com o desenvolvimento da LPA/SDRA. Frente à alta taxa de mortalidade (30-40%) observada na LPA/SDRA induzida por sepse, diversas estratégias terapêuticas têm sido propostas, porém, com sucesso limitado (FRANK & THOMPSON, 2010).

O comprometimento pulmonar na sepse é associado à liberação de mediadores inflamatórios do foco extrapulmonar, levando a lesão do endotélio pulmonar, recrutamento de monócitos, leucócitos, neutrófilos, plaquetas e outras células e posterior lesão do epitélio alveolar (pneumócitos tipo I e II) (PELOSI, 2003; ROCCO & PELOSI, 2008). O dano ao PII resulta em alterações na síntese, secreção e reciclagem dos componentes do surfactante. O surfactante constitui um sistema imunoregulatório, modulando a proliferação celular e a liberação de mediadores inflamatórios (BALIBREA 2003). A instilação traqueal de surfactante bovino ou suíno tem sido proposta como terapêutica adjuvante por melhorar a troca gasosa, minimizando as repercussões da LPA/SDRA induzida por sepse (GÜNTHER, 2001). Entretanto, o surfactante exógeno é inativado por diferentes fatores presentes no espaço alveolar, tais como as proteases secretadas pelas células inflamatórias.

Rocco e colaboradores investigaram os efeitos terapêuticos do LASSBio596 em modelo de LPA induzida pela instilação intratraqueal de LPS de *E. coli* (ROCCO, 2003). Os resultados foram promissores no que concerne à melhora morfofuncional pulmonar. Entretanto, não se sabe se na LPA/SDRA induzida por sepse abdominal, o LASSBio596 reverteria as alterações respiratórias, já que se sabe que a fisiopatologia da LPA/SDRA varia em função da etiologia da lesão. Logo, o presente estudo visa a testar a hipótese que o LASSBio596 atuaria melhorando a sobrevida e a função pulmonar em modelo experimental de LPA induzida por CLP.

Logo, a associação de uma substância anti-inflamatória como o LASSBio596 poderia reduzir o processo inflamatório possibilitando que o efeito benéfico do surfactante exógenos perdure no espaço alveolar, facilitando a ventilação mecânica e melhorando a oxigenação.

A terapia eficaz para o tratamento da SDRA induzida pela sepse deve atuar não só no processo inflamatório como também de fibroelastogênese (LEITE-JUNIOR 2008), promovendo o adequado reparo da lesão pulmonar. Ademais, cumpre ressaltar que é fundamental que o tratamento também seja voltado a impedir a evolução para a SDMOS (SANDROCK & ALBERTSON 2010).

Esse trabalho testa a hipótese de que a associação do LASSBio596 com o surfactante exógeno poderia potencializar os efeitos terapêuticos benéficos na LPA induzida por CLP.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos da associação entre do surfactante exógeno com o LASSBio596 no pulmão e em órgãos periféricos em modelo de LPA induzida por CLP.

3.2. Objetivos Específicos

Analisar:

- ✓ Sobrevida dos animais, objetivando avaliar o impacto das terapias sobre a taxa de mortalidade;
- ✓ Mecânica respiratória através da elastância estática, a fim de avaliar os efeitos terapêuticos sobre a função pulmonar;
- ✓ Microscopia de luz e eletrônica do pulmão, objetivando dar suporte anatômico aos achados funcionais;
- ✓ O remodelamento do parênquima pulmonar através da quantificação fibras colágenas, com o objetivo de avaliar os efeitos das estratégias terapêuticas sobre a fibrogênese;
- ✓ A ação sobre o processo inflamatório pulmonar e sistêmico através da quantificação do número de células totais e diferenciais no pulmão no LBA, no fluido do lavado intraperitoneal e no sangue;
- ✓ A bioquímica plasmática, visando entender o comprometimento hepático e renal;
- ✓ Os efeitos na SDMO por meio da análise de apoptose celular em pulmão, fígado, rim e intestino.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais utilizados

Foram utilizados neste estudo camundongos BALB/c machos saudáveis, oriundos do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América (*U.S. Department of health and Human care Services*, 1985). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais Experimentais (CEUA-CCS-019) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, comissão interna que contempla experimentos pré-clínicos envolvendo animais de experimentação.

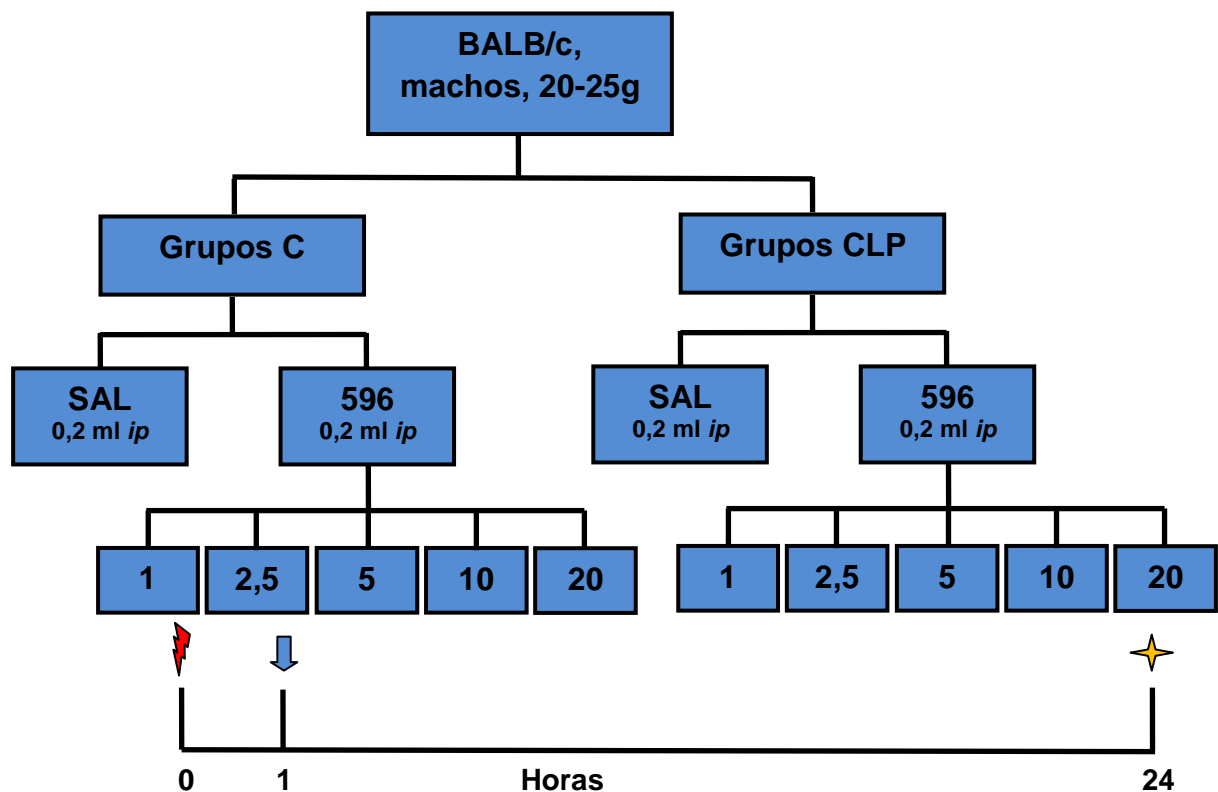
Todos os animais utilizados mantidos sob condições livres de infecções no biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar, do IBCCF, da UFRJ, alimentados com dieta padrão (ração para rato/camundongo Purina) e água *ad libitum*, com ciclo diário de 12 horas de exposição à luz, cinco dias antecedentes ao início dos experimentos para aclimatização em suas gaiolas.

As medidas da mecânica pulmonar, a análise da histologia pulmonar por microscopia de luz e análise do LBA, peritônio e sangue foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar. A análise da bioquímica plasmática foi realizada no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. A análise ultraestrutural do pulmão e a quantificação de apoptose celular em pulmão, fígado, rim e intestino foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2. Caracterização dos grupos experimentais

Camundongos BALB/c, pesando entre 20 e 25 gramas, foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **C-SAL** - Os animais foram submetidos à simulação da cirurgia de CLP (cirurgia *sham*) e, 1 hora após a cirurgia, receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,2 ml de solução salina estéril morna (37°C).
- **C-596** - Os animais foram submetidos à cirurgia *sham* e, 1 hora após a cirurgia, receberam uma única injeção i.p. de uma das diferentes doses de LASSBio596 (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg diluídos em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml).
- **CLP-SAL** - Os animais foram submetidos à cirurgia de CLP e, 1 hora após a cirurgia, receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,2 ml de solução salina estéril morna (37°C).
- **CLP-596** - Os animais foram submetidos à cirurgia de CLP e, 1 hora após a cirurgia, receberam uma única injeção i.p. de uma das diferentes doses de LASSBio596 (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg diluídos em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml).



- ⚡ Cirurgia *sham* (C) e cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)
- ⬇ Tratamento com salina (SAL, 0,2 ml, i.p.) ou diferentes doses de LASSBio 596 (596) (1, 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg em 0,2 ml de salina)
- ★ Coleta de dados e sacrifício dos animais

Figura 5 – Desenho experimental e representação esquemática temporal do protocolo experimental.

Após a determinação da melhor dose a ser utilizada do LASSBio596, um novo grupo de animais foi dividido aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **C-SAL** - camundongos submetidos à cirurgia *sham* e tratados com solução salina estéril morna (37°C) (0,2 ml i.p.) 1 hora após a cirurgia.
- **C-596** - camundongos submetidos à cirurgia *sham* e tratados com LASSBio596 (10 mg/kg diluído em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml i.p.) 1 hora após a cirurgia.
- **C-S** - camundongos submetidos à cirurgia *sham* e tratados com surfactante exógeno (0,1 ml/kg i.t.) 1 hora após a cirurgia.
- **C-596-S** - camundongos submetidos à cirurgia *sham* e tratados com LASSBio596 (10 mg/kg diluído em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml i.p.) e surfactante exógeno (0,1 ml/kg i.t.) 1 hora após a cirurgia.
- **CLP-SAL** - camundongos submetidos à cirurgia CLP e tratados com solução salina estéril morna (37°C) (0,2 ml i.p.) 1 hora após a cirurgia.
- **CLP-596** - camundongos submetidos à cirurgia CLP e tratados com LASSBio596 (10 mg/kg diluído em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml i.p.) 1 hora após a cirurgia.
- **CLP-S** - camundongos submetidos à cirurgia CLP e tratados com surfactante exógeno (0,1 ml/kg i.t.) 1h após a cirurgia.
- **CLP-596-S** - camundongos submetidos à cirurgia CLP e tratados com LASSBio596 (10mg/kg diluído em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml i.p.) e surfactante exógeno (0,1 ml/kg i.t.) 1 hora após a cirurgia.

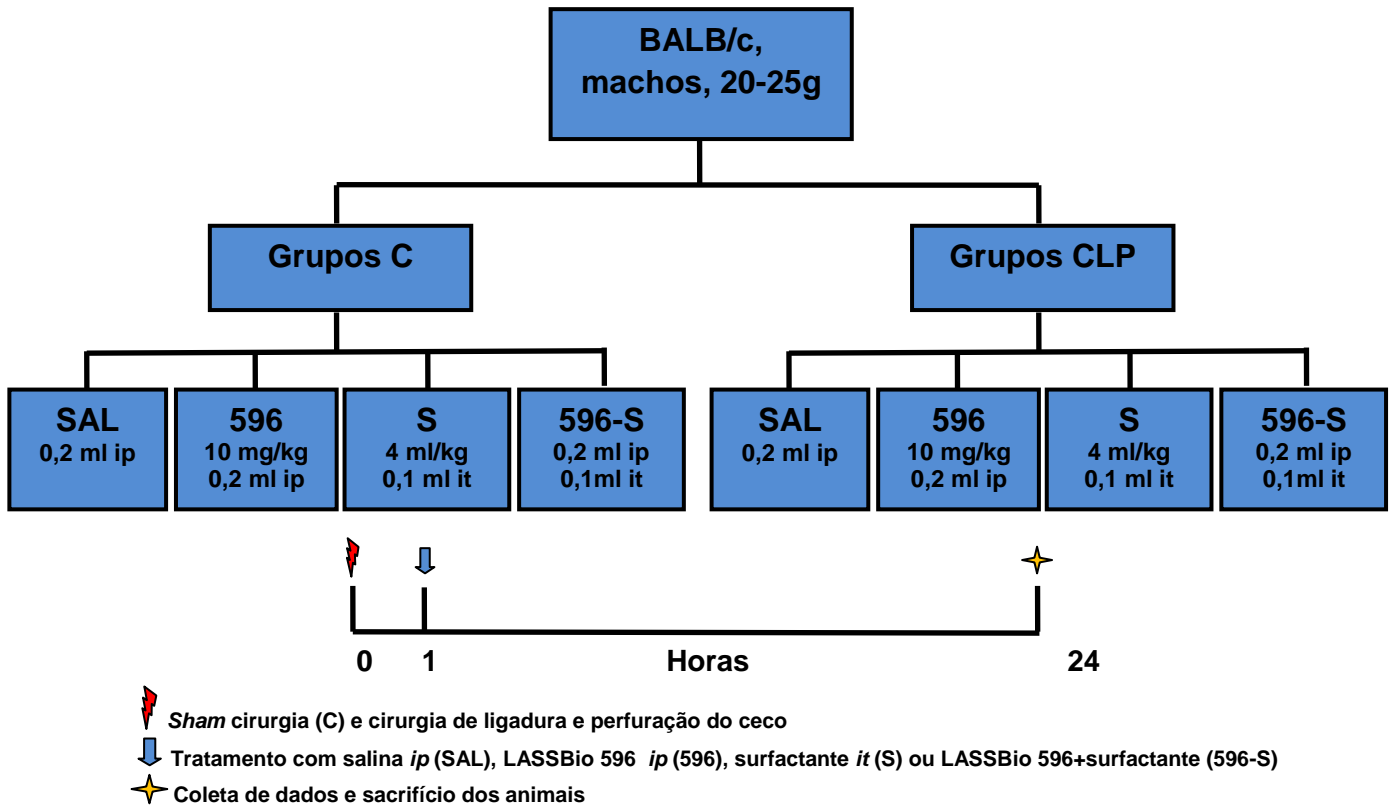


Figura 6 – Desenho experimental e representação esquemática temporal do protocolo experimental.

4.3. Modelo Experimental de Lesão Pulmonar Aguda Induzida por ligadura e perfuração de ceco

A LPA foi induzida por ligadura e perfuração de ceco (CLP) (WITCHTERMAN 1980). Os animais dos grupos CLP foram submetidos à cirurgia de CLP com o objetivo de provocar uma sepse polimicrobiana com repercussões pulmonares. Cabe enfatizar que o mesmo pesquisador realizou todos os procedimentos cirúrgicos a fim de padronizar o modelo evitando grandes diferenças na resposta inflamatória entre os animais. Todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilazina (0,25 e 0,025 mg/kg, respectivamente).

4.3.1. Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Após anestesia, foi realizada uma pequena incisão (de aproximadamente 2 cm) na porção inferior do abdômen, inicialmente cortando-se a camada da pele e, em seguida, a camada muscular. O ceco foi então exposto e, aproximadamente 25% da sua área foi ligada imediatamente abaixo da válvula ileocecal, sempre tomando

devida precaução para não promover obstrução intestinal. A área ligada do ceco foi então perfurada uma vez com uma agulha de 18G e, em seguida, espremida bidigitalmente para o extravasamento de fezes pelo orifício da punção para o interior da cavidade peritoneal, com o intuito de certificar se a perfuração foi eficaz. O segmento intestinal foi então recolocado no interior da cavidade abdominal, seguido por sutura com fio de Nylon 5.0 em dois tempos, isto é, primeiramente a camada muscular e, subsequentemente, a camada de pele. Todos os animais receberam 1 ml/kg de solução salina estéril morna (37°C) subcutânea após cirurgia para reposição volêmica bem como cloridrato de tramadol (20 µg/g peso corpóreo). Ao final do procedimento, os animais foram recolocados em suas gaiolas e receberam água e ração *ad libitum*. Nenhum antibiótico foi administrado.

4.3.2. Cirurgia *sham*

Após a anestesia, os animais dos grupos C foram submetidos à simulação da cirurgia de CLP, que consiste de uma pequena incisão de cerca de 2 cm na porção inferior do abdômen, inicialmente, cortando-se a camada da pele e, em seguida, a camada muscular. O ceco foi, então, exposto, porém não foi realizada a CLP. O ceco exposto foi reinserido na cavidade abdominal, que em seguida foi fechada com fio de sutura (Nylon 5-0, ETHICON®, Alemanha) e padrão de sutura contínuo em dois tempos, isto é, primeiramente a camada muscular e, posteriormente, a camada de pele. Todos os animais receberam 1 ml/kg de solução salina estéril morna (37°C) subcutânea após a cirurgia para reposição volêmica bem como cloridrato de tramadol (20 µg/g peso corpóreo). Ao final do procedimento, os animais foram recolocados em suas gaiolas e receberam água e ração *ad libitum*. Nenhum antibiótico foi administrado.

4.4. Tratamento dos Animais

Para determinação da dose a ser utilizada, uma hora após a cirurgia, os animais dos grupos C e CLP foram subdivididos, de forma aleatória, em dois grupos de tratamento: (1) com salina (C-SAL e CLP-SAL, respectivamente) ou (2) com LASSBio596 (C-596 e CLP-596, respectivamente). Os animais dos grupos 596 receberam, 1 hora após a cirurgia *sham* ou de CLP, uma única injeção i.p. de uma das diferentes doses de LASSBio596 (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg diluídos em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml). Por sua vez, os grupos C

receberam, 1 hora após a cirurgia *sham* ou de CLP, uma única injeção i.p. de 0,2 ml de solução salina estéril morna (37°C).

Após a determinação da dose do LASSBio596, outro grupo de animais submetidos ao mesmo protocolo experimental foi subdividido em grupos C e CLP, que receberem solução salina estéril morna (37°C) (C-SAL e CLP-SAL, respectivamente), LASSBio596 (C-596 e CLP-596, respectivamente), surfactante exógeno (C-SU e CLP-S, respectivamente) ou associação de LASSBio596 e surfactante exógeno (C-596-S e CLP-596-S, respectivamente).

O LASSBio596 foi administrado em dose única de 10 mg/kg diluído em solução salina estéril com volume final de solução de 0,2 ml, através de injeção intraperitoneal.

O surfactante exógeno (Survanta®) foi administrado seguindo as orientações do medicamento. Para administração do surfactante, o animal que estava sob efeito anestésico, foi submetido a uma traqueostomia para instilação de 0,1 ml/kg intratraqueal, que foi fechada com fio de sutura (Nylon 5-0, ETHICON®, Alemanha). Realizou-se concomitante oferta intranasal de oxigênio 3 l/min até normalização da frequência respiratória.

4.5. Mecânica pulmonar

Vinte e quatro horas após a cirurgia *sham* ou de CLP, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), em seguida pesados (balança *Filizola*, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com Tiopental Sódico [*Sodium Pentothal*®, *Abbott Laboratories*, Chicago, Illinois, EUA (20 mg/kg i.p.)].

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, uma pequena incisão longitudinal medial de aproximadamente 1 cm de extensão foi realizada na face ventral do pescoço dos animais seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço proximal da traquéia. A seguir, pela traqueotomia, um Jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno foi introduzido na traquéia, sendo fixado a esta por meio de fios de algodão.

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais (MORTOLA, 1983) para medida de fluxo aéreo (V'). O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm.

A diferença de pressão (ΔP) através do pneumotacógrafo foi determinada utilizando-se um transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-02, SIREQ, Montreal, QC, Canadá). Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de *Poiseuille*, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG, 1981). O volume (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-300, SCIREQ, Montreal, Canadá) para medida da pressão traqueal (P_{tr}).

A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em "U", contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

O espaço morto da montagem foi de 0,1 ml. Para computá-lo, pesou-se o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em "T", pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permitiu saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enchê-lo de água foi usada massa de modelar, que foi também pesada, junto com os demais equipamentos.

Os animais tiveram a sua musculatura paralisada após a administração de brometo de vecurônio [0,005 mg/kg intravenosamente (i.v.)] e a ventilação artificial foi instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (*Samay VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai*) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O modo ventilatório instituído foi uma ventilação controlada a volume com volume corrente (V_T) de 0,2 ml e frequência respiratória de 100

incursões respiratórias por minuto (irpm), relação I:E de 1:2 e fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 0,21.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen 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 secionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH_2O . A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, 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, 1988a e 1988b).

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

Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através do método da oclusão ao final da inspiração.

4.5.1. Método de oclusão ao final da inspiração

Pelo método de oclusão ao final da inspiração, foram registrados 10-15 ciclos/animal para análise da mecânica pulmonar. O método de oclusão ao final da inspiração permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (BATES, 1985a, 1985b, 1988a, 1988b e 1989; KOCHI 1988^a e 1988b).

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal (P_{tr}) é, na realidade, a pressão transpulmonar (P_L). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da P_L até um ponto de inflexão ($P_{i,L}$), 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 ($P_{el,L}$). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$), que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao componente viscoso pulmonar, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistência do pulmão (BATES, 1988 e 1989; KOCHI, 1988^a e 1988^b). A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do $P_{i,L}$ ao platô ($P_{el,L}$), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (*stress relaxation*) e/ou inhomogêneo (*pendelluft*) do pulmonar (Figura 7). O valor da elastância estática do pulmão (Est,L) foi calculado dividindo-se $P_{el,L}$ pelo V_T . As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$(1) \Delta P_1 = P_{max} - P_i$$

$$(2) \Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$(3) Est = P_{el} / V_T$$

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 fluxo nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno volume. Esse fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da $P_{i,L}$ e da $P_{el,L}$ (Figura 7).

A resistência total do equipamento (Req), incluindo a cânula traqueal, foi aferida previamente através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 ml/s, bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $Req = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva ΔP x V' . A pressão resistiva do equipamento ($=Req.V'$) será subtraída da pressão resistiva dos pulmões de tal forma que os resultados representem as propriedades mecânicas intrínsecas.

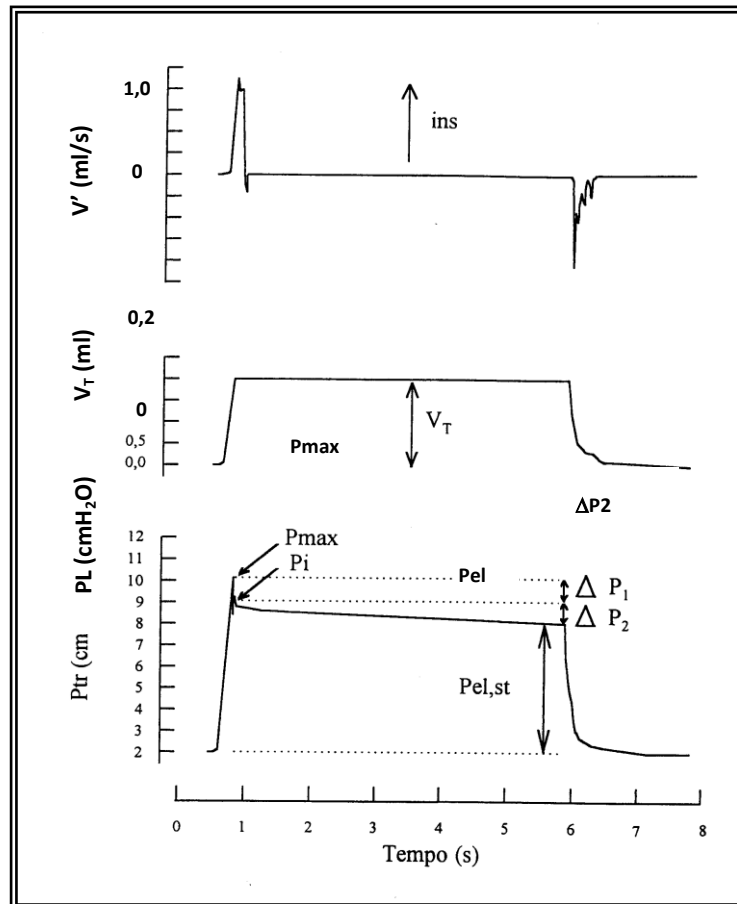


Figura 7 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo (V'), volume (V_T) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 ml e fluxo aéreo de 1 ml/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P_{1,L}$) que corresponde a $P_{max,L} - P_{i,L}$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P_{2,L}$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ($P_{el,L}$). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de V' e PL, respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da PL foram estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados [Scireq, Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá], filtrados, convertidos a sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, EUA) e amostrados a uma freqüência de 200 Hz. Os sinais foram coletados por meio do programa LABDAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) e armazenados em microcomputador para posterior análise, através do programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá).

A montagem experimental está demonstrada esquematicamente na figura 8.

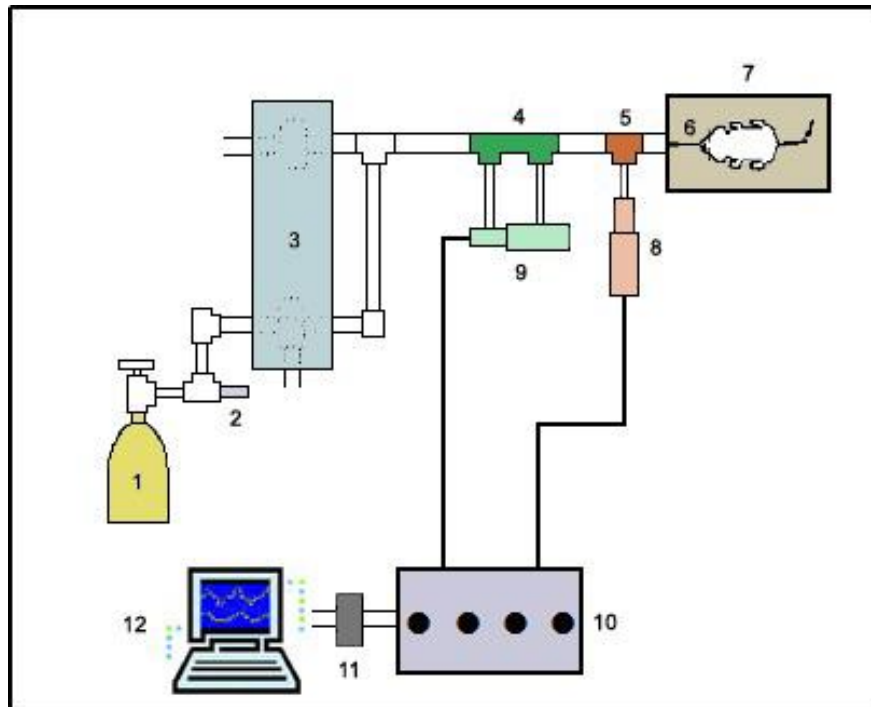


Figura 8 - Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar. 1- Cilindro de ar comprimido. 2- Rotâmetro de agulha. 3- Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides. 4- Pneumotacógrafo. 5- Peça T para medida de pressão nas vias aéreas. 6- Cânula traqueal. 7- Mesa cirúrgica. 8- Transdutor de pressão traqueal. 9- Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo. 10- Scireq-24. 11- Conversor analógico-digital de 12 bits. 12 - Microcomputador.

4.6. Microscopia de Luz

4.6.1. Remoção dos pulmões

Após a medida da mecânica respiratória, o abdômen foi aberto e 0,1 ml de heparina (1000 UI) diluído em solução salina com um volume total equivalente a 1 ml/camundongo) foi injetado na veia cava inferior. Após 1 minuto, a traquéia foi ocluída ao final da expiração (PEEP = 2 cmH₂O) com fio de algodão e a veia cava inferior e a porção abdominal da artéria aorta foram seccionadas, acarretando uma hemorragia maciça que levou rapidamente os animais ao óbito. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com a liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago foi 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 e o coração foram separados do conjunto por leve tração, restando apenas pulmões e vias aéreas.

4.6.2. Microscopia de luz - Fixação e preparo das lâminas

O brônquio fonte esquerdo foi ocluído utilizando-se fio de algodão. A seguir, o pulmão direito foi congelado através de imersão em nitrogênio líquido, por aproximadamente três minutos, retirados e mantidos em solução Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a - 70° C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol: (1) MC-1 = etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20° C durante 1h; (2) MC-2 = etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20° C durante 1h; (3) MC-3 = etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20° C durante 1h; e (4) etanol a 100%, a -20° C durante 1h e, em seguida, a -4° C durante 24h.

Após desidratado, o pulmão esquerdo foi embebido em parafina e cortes de parênquima pulmonar (4 µm de espessura) foram realizados, fixados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina para análise morfométrica.

4.6.3. Microscopia de Luz - Análise Histológica e Morfométrica

A análise morfométrica dos pulmões foi realizada usando-se uma ocular acoplada a um microscópio de luz convencional (Olympus BX51, *Olympus Latin America-Inc*, Brasil) contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas (de comprimento conhecido) dispostas em paralelo (Figura 9). As frações de área do pulmão ocupadas por alvéolos colapsados ou normais ou estruturas hiperinsuladas (ductos alveolares, sacos alveolares ou alvéolos, todos maiores do que 120 µm) foram determinadas pela técnica de contagem de pontos (WEIBEL, 1990) em um aumento de X200. Foram analisados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina (LEITE-JUNIOR, 2008).

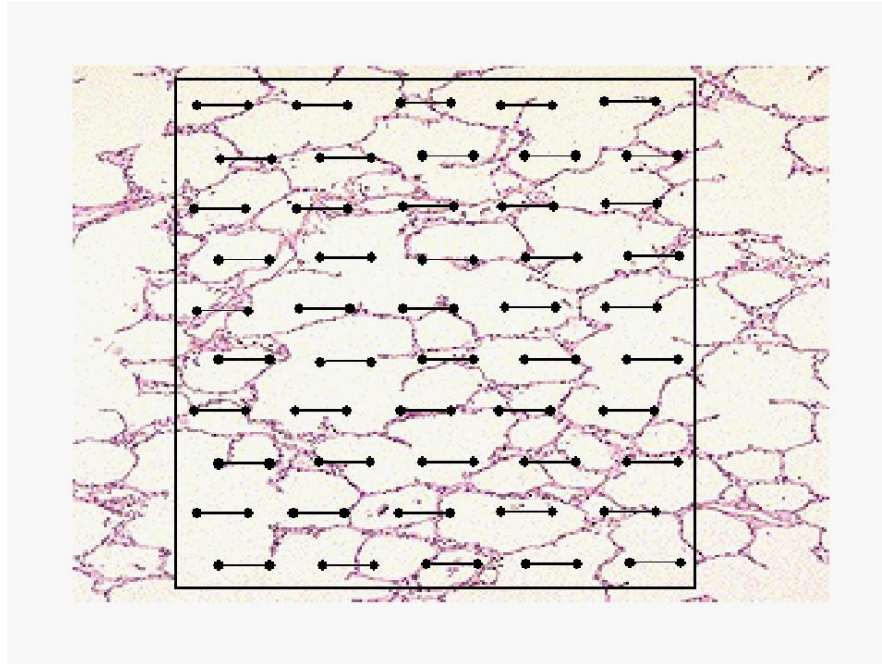


Figura 9 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Já no aumento de X1000, foram avaliados 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina para quantificação da celularidade tecidual total e diferencial. Computou-se o número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido, células mononucleares e polimorfonucleares, obtendo-se o número de células por área de tecido.

4.6.4. Microscopia de Luz - Quantificação de fibras colágenas

Após remoção, fixação e preparo das lâminas, realizou-se coloração de Sirius Red dissolvida em solução saturada de ácido pícrico para quantificação de fibras colágenas. Sob luz polarizada, observa-se acentuada birrefringência que é específica para estruturas colágenas (MONTES, 1996). Quantificou-se a fração de área de fibras colágenas em cada campo (10 campos/animal), utilizando-se um software Image-Pro Plus 6.3 para Windows (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, EUA). Para tal, todos os campos são fotografados em um computador conectado a uma câmera digital (Sony Trinitron CCD, Sony, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados três fragmentos do pulmão esquerdo (0,2x0,2x0,2cm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, por 2 h, sendo posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por mL) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada, as preparações foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo que variável de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo, então, o tecido passado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina (araldite). Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzildimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftalato). Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias. Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrotomo Porter Blum MT2 (Reichert ultracult S). Tais cortes, com 0,5 µm de espessura, foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, selecionaram-se áreas representativas das lesões. De cada espécime, dois blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foi submetido à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, os cortes ultrafinos com espessura em torno de 90 nanômetros foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, por citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL, JSM-6100F, Tóquio, Japão). Para cada imagem (15/animal) as seguintes estruturas foram analisadas: a) membrana alvéolo-capilar, b) células epiteliais tipo II, e c) células

endoteliais. Os achados histológicos foram graduados com base em um escore semiquantitativo de gravidade: 0 = parênquima pulmonar normal, 1 = alterações de 1-25%, 2 = alterações de 26-50%, 3 = alterações de 51-75%, e 4 = alterações de 76-100% do tecido examinado (RIVA, 2008; PÁSSARO, 2009).

4.8. Análise do fluido do lavado broncoalveolar (LBA), lavado peritonial (LP) e sangue

Para coleta do fluido do lavado broncoalveolar, os camundongos foram sacrificados e exsanguinados e o lavado broncoalveolar foi realizado utilizando-se uma cânula de polietileno inserida na traquéia e um volume total de 1,0 ml de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA 10mM que foi instilado e aspirado em 1 lavagem através da cânula traqueal. A cavidade peritonial foi lavada com 3 ml da mesma solução, de onde foram obtidas alíquotas de 1ml do lavado. O sangue foi retirado da cauda do animal após serem anestesiados e foram realizados os esfregaços nas lâminas. A contagem total de leucócitos do sangue periférico, no fluido do lavado broncoalveolar e do lavado peritonial foi realizada mediante diluição das amostras em líquido de Türk (1:10) e a contagem feita em câmara de Neubauer em microscópio de luz (BX51, Olympus).

4.9. Bioquímica Plasmática

Para análise da bioquímica plasmática, os camundongos foram sedados e anestesiados e o sangue foi retirado da veia cava inferior seguindo as instruções do kit a ser utilizado. Após a retirada do sangue, as amostradas foram centrifugadas em centrífuga por 5' a 5000 g. Após centrifugação, o sobrenadante contendo as amostras de plasma sanguíneo, foram separadas e armazenadas para posterior análise.

Para análise do conteúdo de Uréia e Creatinina, utilizou-se o método cinético-colorimétrico. Para análise da AST e ALT, utilizou-se o método cinético UV.

4.10. Estudo da apoptose

4.10.1. Remoção e Preparo dos Órgãos

Após a separação do coração e dos pulmões, foram retirados: rim direito e parte do lobo direito do fígado. Um pedaço da região intestinal mais próxima ao

estômago também foi removida e com o auxílio de uma seringa estéril de 1,0 ml, o fragmento do intestino foi lavado com salina fosfato tamponada (PBS) estéril, a fim de eliminar resíduos.

Três pedaços de aproximadamente 2x2x2 mm de cada órgão, foram cortados e armazenados em “ependorfs” individuais com solução de 90 ml de álcool a 80% + 5 ml de ácido acético + 5 ml de formol tamponado a 10%. O material ficou nessa solução durante 4 horas e foi transferido para álcool a 70%.

4.10.2. Detecção in situ de células apoptóticas

Para detecção de células apoptóticas foi usado o método TUNEL (terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end-labeling method) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). Este método envolve a adição de trifosfato de deoxiuridina (dUTP) marcado com fluorescência nos fragmentos terminais do DNA por ação catalítica do TdT (GAVRIELI, 1992; WIJSMAN, 1993). Todos os experimentos foram realizados em três amostras de cada tecido pudessem ser padronizados. Cortes histológicos feitos a partir de blocos de parafina (4 a 6 μ m) foram depositados em lâminas. A seguir, os cortes foram desparafinados em solução xilol e rehidratados com diluições decrescentes de etanol em água. Os cortes foram lavados quatro vezes com água destilada por 2 minutos e imersos em tampão TdT (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). A seguir, TdT (0,3 U por microlitro) e marcação fluorescente dUTP em tampão TdT foram adicionados aos cortes e as amostras foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C durante 60 minutos. Para controles negativos, TdT foi eliminado da mistura reativa. Os cortes foram, então, incubados com anticorpo específico conjugado a peroxidase. Os corantes foram visualizados com um substrato no qual núcleos com fragmentação do DNA se coram de marrom. A reação foi determinada pela lavagem dos cortes em tampão salina fosfato. Os núcleos sem fragmentação do DNA foram corados de azul como resultado da contra-coloração com hematoxilina. A microscopia de luz foi usada para quantificar apoptose de células no pulmão, rim, fígado e intestino. Um escore semi-quantitativo de 5 pontos, baseado na gravidade, foi usado e graduado como negativo = 0 (estrutura normal), 1=1-25%, 2=26-50%, 3=(51-75% e 4=76-100% de células apoptóticas por campo analisado, sendo quantificado 10 campos microscópicos não-coincidentes, para cada animal, num total de 6 animais por grupo (aumento 400X).

4.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico Sigma Stat® para Windows® versão 3.1 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, EUA). Para análise da sobrevida em 24 horas, foi realizado o teste qui-quadrado e construída a curva de Kaplan-Meier. A normalidade dos dados (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors) e a igualdade de variância (teste de mediana de Levene) foram testadas. Quando os dados passaram nos testes acima, usou-se a análise de variância de dupla entrada, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, caso contrário, utilizou-se análise de variância de dupla entrada on ranks, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância (ZAR, 1996). O grau de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da dose do LASSBio596

Uma única injeção intraperitoneal de LASSBio596 nas doses de 5 e 10 mg/kg, realizada 1 hora após a indução da LPA, aumentou a sobrevivência dos animais e minimizou as alterações morfofuncionais e inflamatórias pulmonares induzidas pela CLP, sendo que a dose de 10 mg/kg resultou em maior atividade anti-inflamatória.

5.1.1. Sobrevida

A sobrevivência dos animais foi avaliada em 24 horas após a cirurgia de CLP ou *sham*. Não ocorreram mortes nos grupos C, que estão apresentados como controle único. O grupo CLP-SAL apresentou uma taxa de sobrevivência de 60%, quando comparado com o grupo controle. O tratamento com LASSBio596 aumentou a sobrevivência dos animais com LPA induzida por CLP, com diferença estatisticamente significativa nas doses de 5 mg/kg (75%) e 10 mg/kg (77%), quando comparado com o grupo CLP-SAL (60%) (Figura 10).

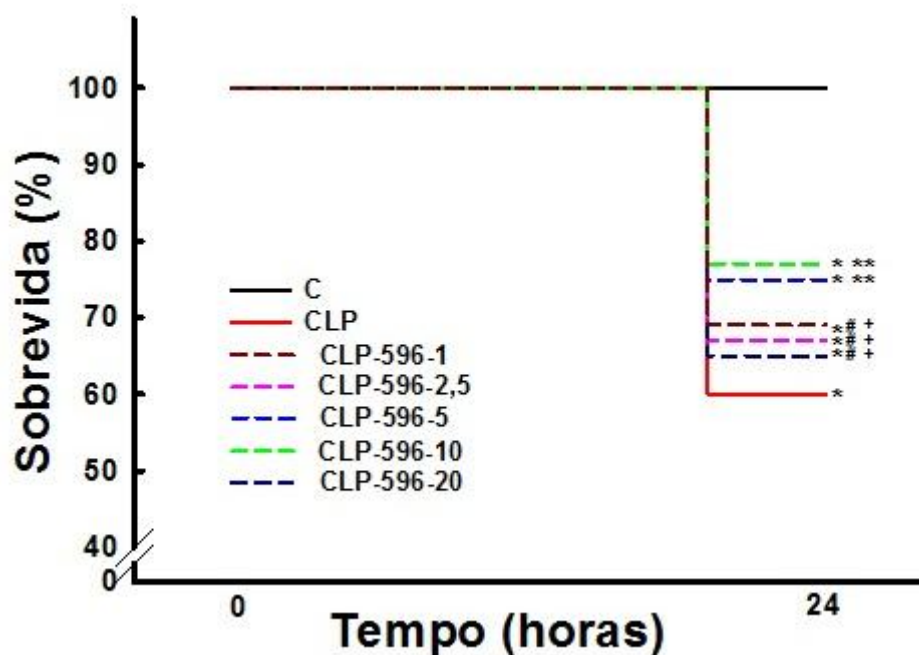


Figura 10 - Sobrevida dos animais em 24 horas após a cirurgia *sham* ou de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com uma única injeção i.p. de solução salina

estéril (SAL) ou uma das diferentes doses de LASSBio 596 (596) (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg). * Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-596 5 ($p < 0,05$). + Significativamente diferente do grupo CLP-596 10 ($p < 0,05$).

5.1.2. Mecânica pulmonar

Não houve diferença entre os grupos C, que estão representados como controle único. Est,L (65%), $\Delta P1,L$ (20%), $\Delta P2,L$ (55%) e $\Delta Ptot,L$ (30%) foram maiores no grupo CLP-SAL, quando comparado com o grupo C. O tratamento com LASSBio596 nas doses de 5 e 10 mg/kg, 1 hora após a cirurgia de CLP, preveniu as alterações na mecânica pulmonar. Não houve diferenças significativas com as outras doses de LASSBio 596, em relação ao grupo CLP-SAL (Figura 11).

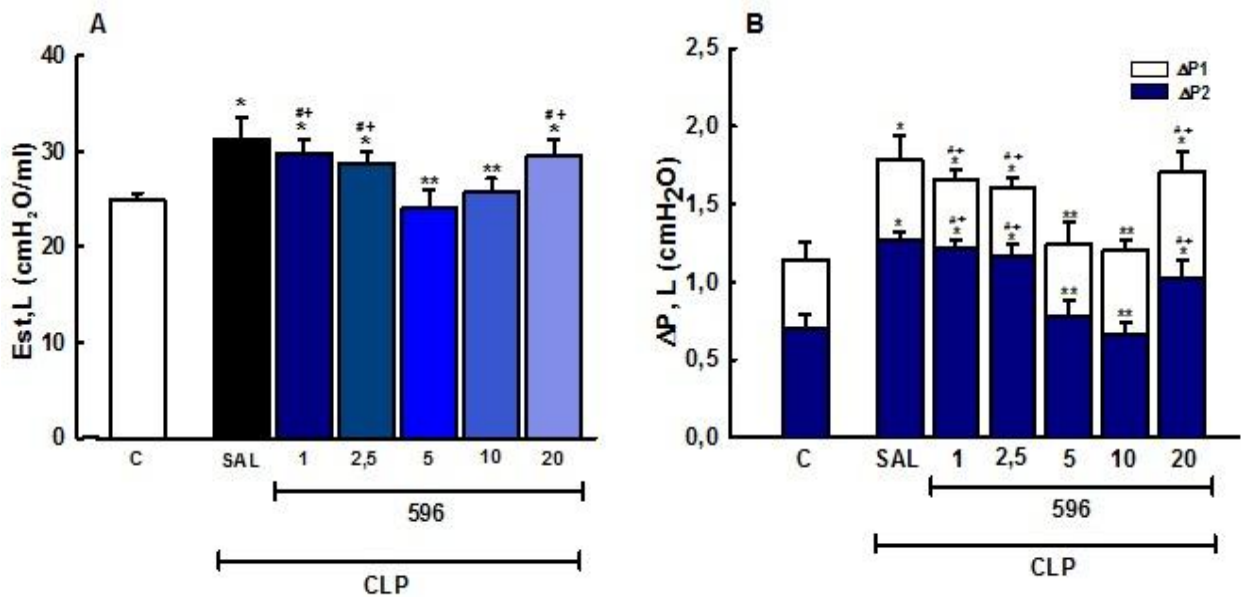


Figura 11 – Elastância estática pulmonar (Est,L, painel A) e variações de pressões para vencer os componentes resistivo ($\Delta P1$) e viscoelástico e/ou inhomogêneo ($\Delta P2$) do pulmão (painel B). Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com uma única injeção i.p. de solução salina estéril (SAL) ou LASSBio 596 (596) nas diferentes doses (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg). Barras representam média \pm SEM de 6 animais em cada grupo. * Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-596 5 ($p < 0,05$). + Significativamente diferente do grupo CLP-596 10 ($p < 0,05$).

5.1.3. Análise Qualitativa e Quantitativa do Parênquima Pulmonar

O grupo CLP-SAL apresentou maior fração de área de colapso alveolar (60%) e menor fração de área de alvéolos normais (50%), assim como aumento do percentual de células polimorfonucleares (25%) por área de tecido pulmonar quando comparado com o grupo C. O tratamento com LASSBio596 minimizou tais alterações quando os animais de LPA induzida por CLP foram tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg. Não houve diferenças significativas com as outras doses de LASSBio596 em relação ao grupo CLP-SAL (tabela 5).

| | C | CLP | | | | | |
|-----------------------------|------------|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | SAL | 596-1 | 596-2,5 | 596-5 | 596-10 | 596-20 |
| Normal (%) | 96,2 ± 0,4 | 61,0 ± 1,7* | 62,5 ± 1,9* ^{#,+} | 63,1 ± 0,8* ^{#,+} | 89,3 ± 0,8* ^{***} | 92,3 ± 1,2** | 65,0 ± 1,6* ^{#,+} |
| Colapso Alveolar (%) | 3,8 ± 0,5 | 39,0 ± 1,8* | 37,5 ± 1,9* ^{#,+} | 36,9 ± 1,2* ^{#,+} | 10,7 ± 0,3* ^{***} | 7,7 ± 1,3* ^{***} | 35,0 ± 0,4* ^{#,+} |
| MN (%) | 25,5 ± 0,6 | 33,3 ± 1,8* | 34,3 ± 0,7* ^{#,+} | 32,1 ± 0,4* ^{#,+} | 24,2 ± 0,8** | 22,3 ± 0,5** | 36,3 ± 1,3* ^{#,+} |
| PMN (%) | 0,4 ± 0,2 | 8,9 ± 1,0* | 6,2 ± 0,4* ^{#,+} | 5,7 ± 0,8* ^{#,+} | 3,3 ± 0,7* ^{***} | 1,7 ± 0,5** | 5,4 ± 0,7* ^{#,+} |

Tabela 5. Fração de área de alvéolos normais e colapso alveolar e percentual de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) por área de tecido pulmonar. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com uma única injeção i.p. de solução salina estéril (SAL) ou uma das doses de LASSBio596 (596) (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg). Dados foram obtidos de dez campos randômicos e não-coincidentes/animal. Valores representam média ± SEM de 5 animais/grupo. * Significativamente diferente do grupo C (p < 0,05). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL (p < 0,05). # Significativamente diferente do grupo CLP-596 5 (p < 0,05). + Significativamente diferente do grupo CLP-596 10 (p < 0,05).

Estes resultados podem ser melhores visualizados nas fotomicrografias do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina (Figura 12). No grupo CLP-SAL pode-se observar maior fração de área de colapso alveolar, espessamento do septo alveolar e infiltrado de células inflamatórias quando comparado com o grupo C. O tratamento com LASSBio596 minimizou tais alterações quando os animais de LPA induzida por CLP foram tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg. Nota-se que na dose de 10 mg/kg a resposta anti-inflamatória do LASSBio596 foi mais intensa em comparação a dose de 5 mg/kg. Não houve diferenças significativas com as outras doses de LASSBio596 em relação ao grupo CLP-SAL (Figura 12).

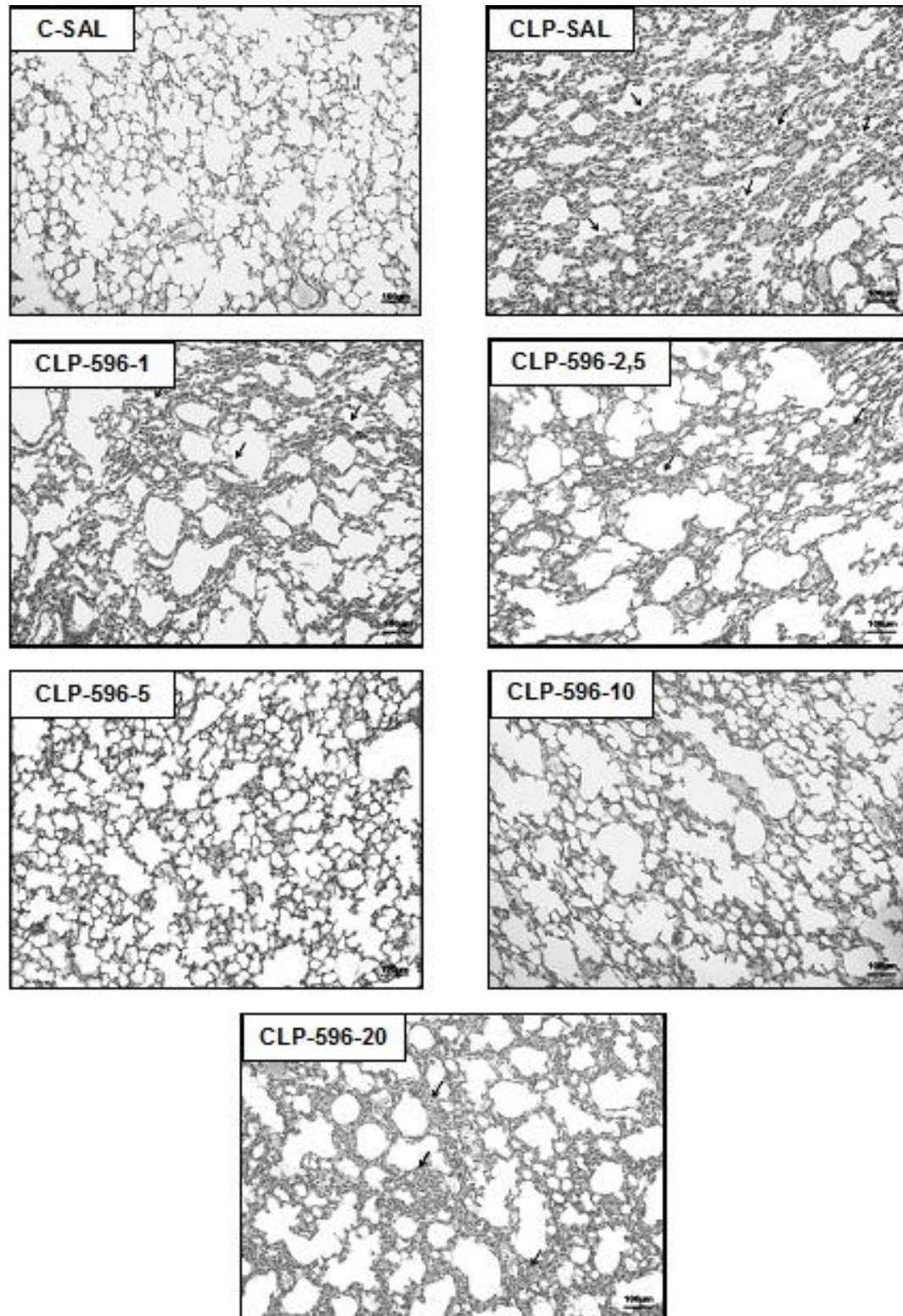


Figura 12 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina. Nos grupos controles (C), os animais foram submetidos à cirurgia *sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com uma única injeção i.p. de solução salina estéril (SAL) ou uma das diferentes doses de LASSBio 596 (596) (1; 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg). Note as áreas de colapso alveolar (setas). Ampliação original 200x. Barras = 100 µm.

5.2. Associação entre surfactante exógeno com o LASSBio596

5.2.1. Sobrevida

Não ocorreram mortes no grupo controle em 4 dias. O grupo CLP-SAL apresentou uma taxa de sobrevida (50%) menor do que a dos grupos tratados com LASSBio596 (70%) ou com a associação entre LASSBio596 e surfactante (66%), porém não houve aumento da sobrevida nos animais tratados apenas com surfactante (50%) (Figura 13).

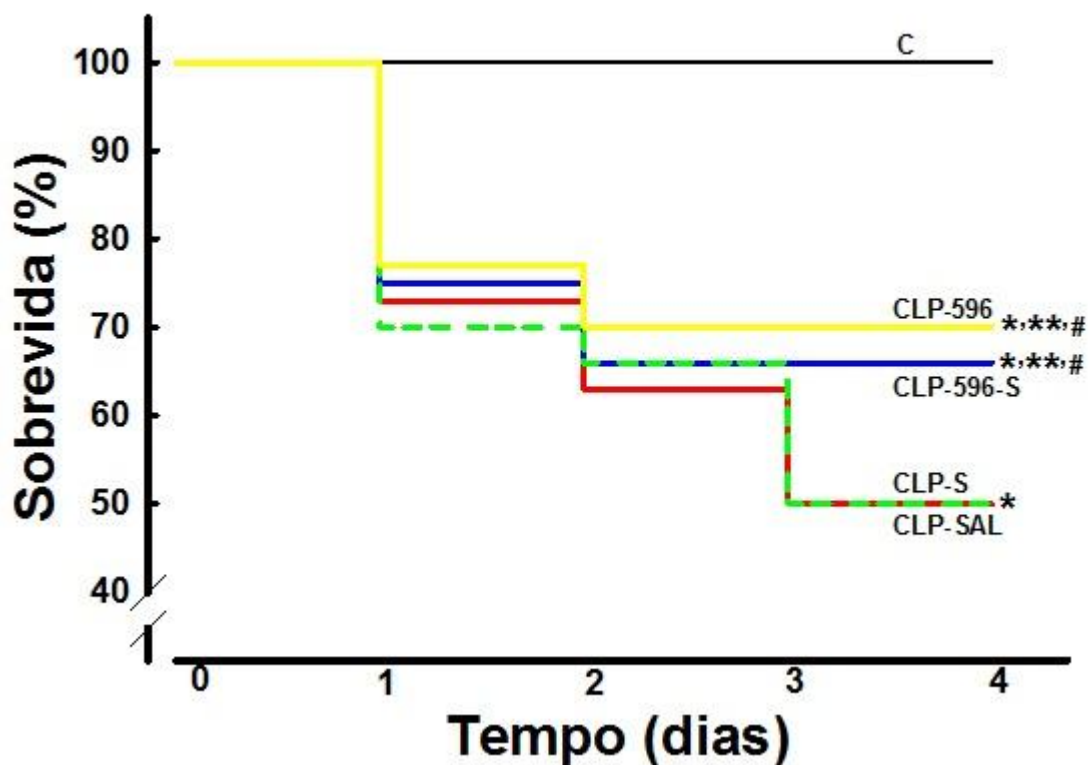


Figura 13 - Percentagem de sobrevida dos animais dos grupos controle (C) (cirurgia *Sham*) e CLP (ligadura e perfuração do ceco). Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com uma única injeção i.p. de solução salina estéril (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio596 associado com surfactante (596-S). Uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos controle optamos em utilizar somente um grupo C. * Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$).

5.2.2. Mecânica Respiratória

Houve aumento significativo da elastância estática (56%), $\Delta P1$ (36%), $\Delta P2$ (67%) e ΔP_{tot} (47%) no grupo CLP-SAL em relação ao grupo C-SAL. O tratamento com LASSBio596, surfactante e a associação entre LASSBio596 e surfactante preveniu as alterações funcionais induzidas pela CLP, sem diferença estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figura 14).

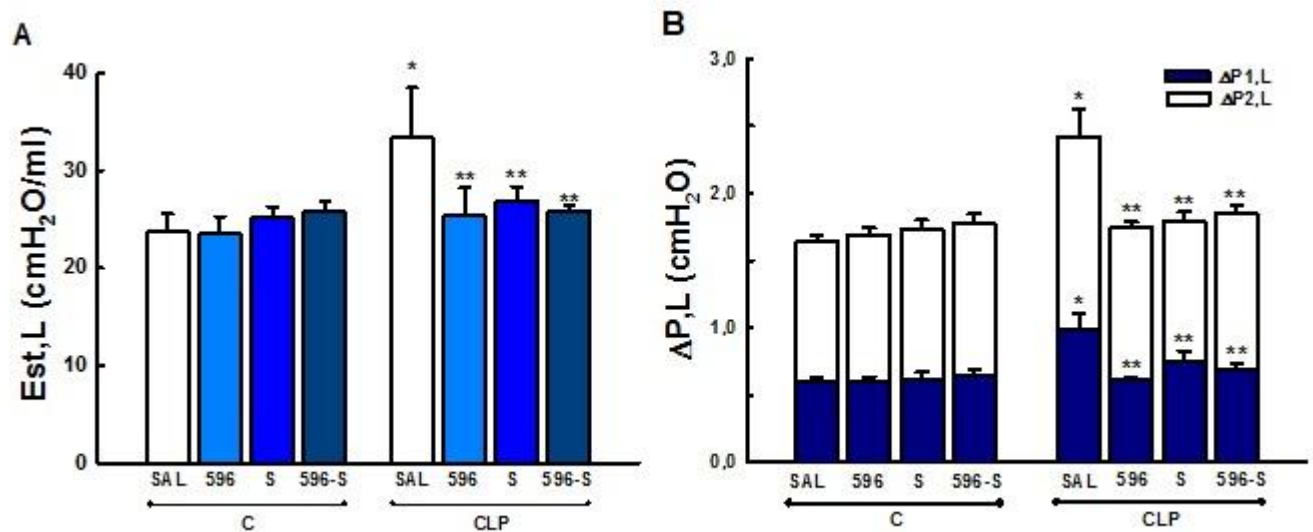
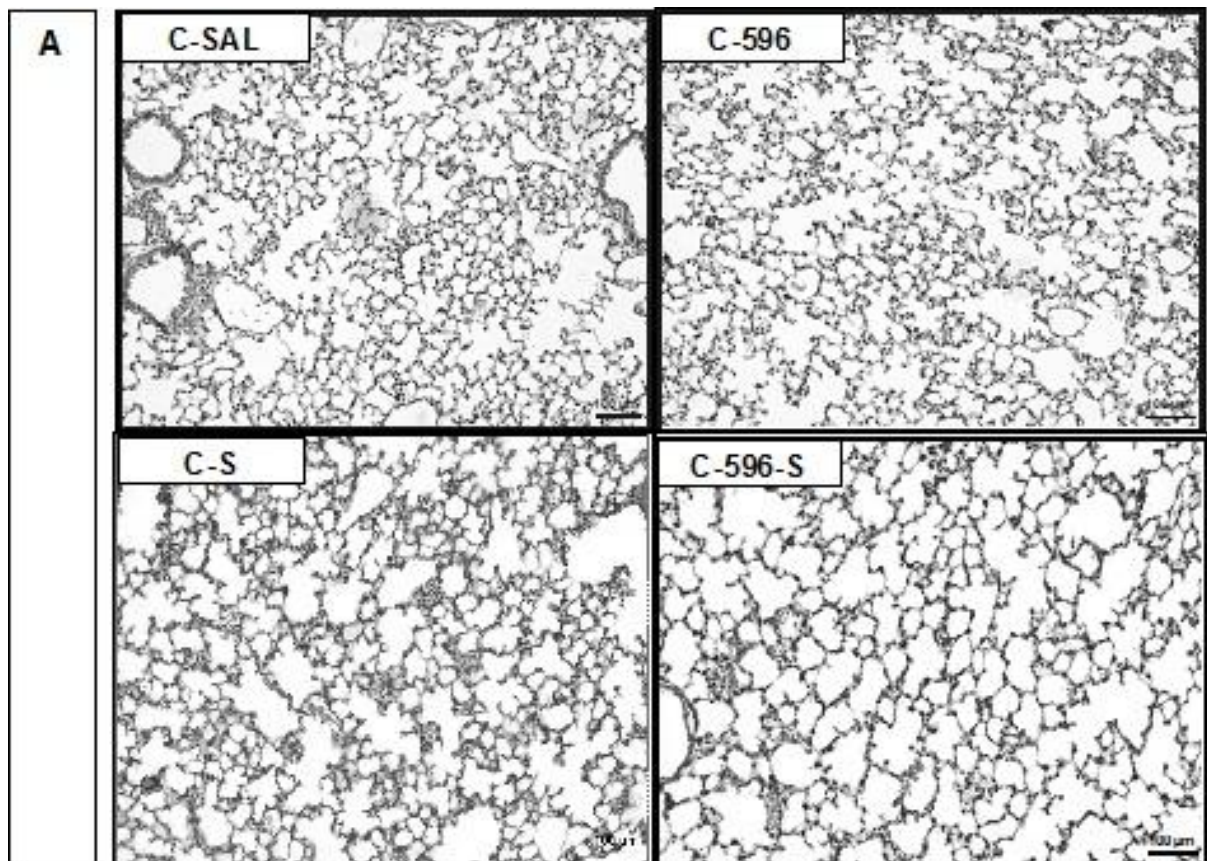


Figura 14 - Est,L (elastância estática do pulmão, painel A); $\Delta P1,L$ e $\Delta P2,L$ (pressões resistiva e viscoelástica/inomogênea do pulmão, painel B). Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 6 animais/grupo. * Significativamente diferente do grupo C-SAL ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$).

5.2.3. Microscopia de Luz

5.2.3.1. Análise Qualitativa do Parênquima Pulmonar

A cirurgia de CLP acarretou modificações no parênquima pulmonar, tais como infiltração de células inflamatórias, espessamento do septo alveolar e colapso alveolar. O tratamento nos animais submetidos à CLP com LASSBio596, surfactante e associação entre LASSBio596 e surfactante atenuou tais modificações, sem diferença entre os tratamentos (Painéis B). Não foram observadas alterações patológicas nos grupos controle (Painéis A) (Figura 15).



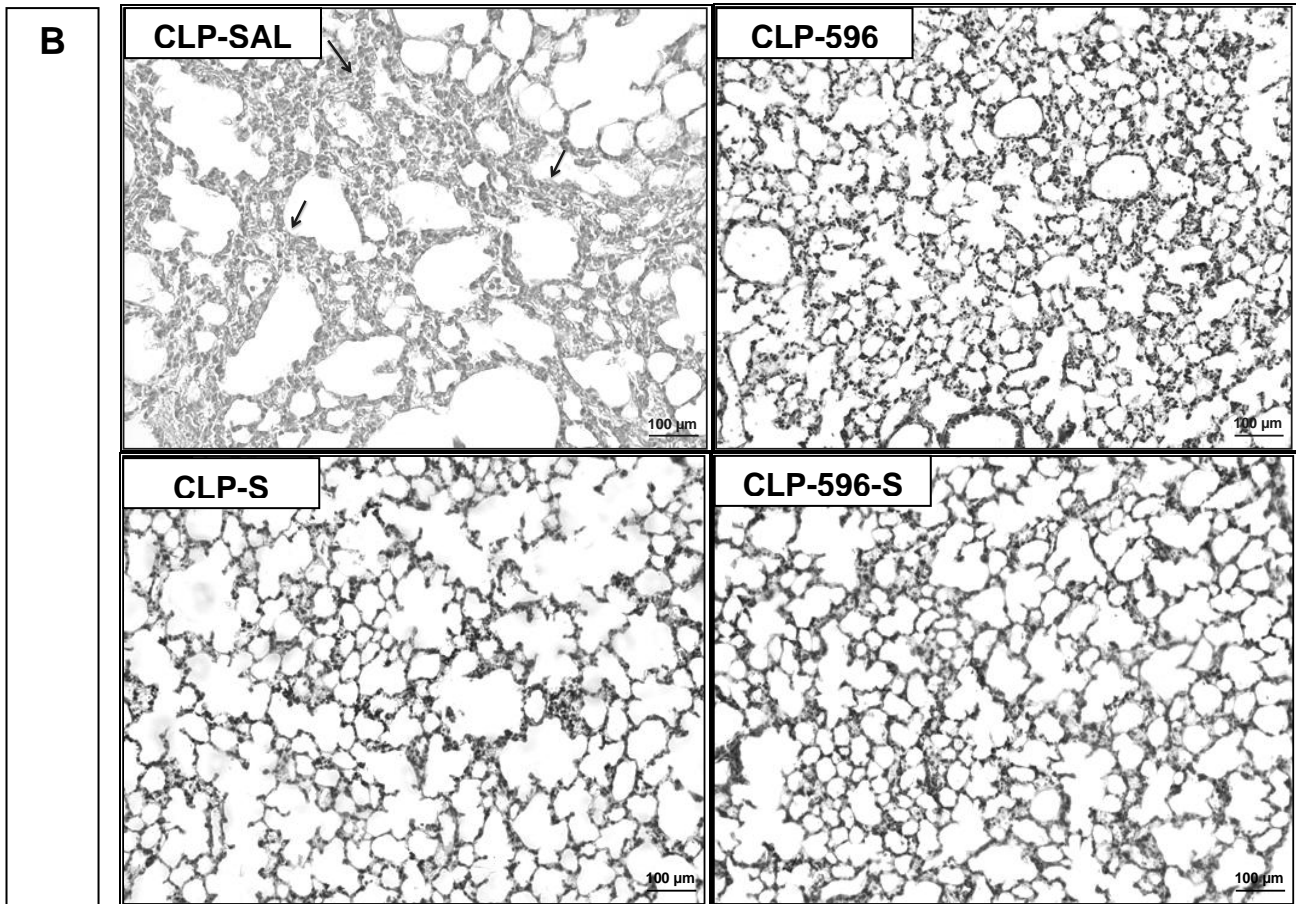


Figura 15 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Note as áreas de colapso alveolar (setas). Ampliação original 200x. Barras = 100 µm.

5.2.3.2. Análise Morfométrica do Parênquima Pulmonar

Os animais do grupo CLP-SAL apresentaram maior fração de áreas de colapso alveolar, menor fração de alvéolos normais, além de maior conteúdo de células polimorfonucleares (PMN) do que os animais do grupo controle. O tratamento com LASSBio596, surfactante e associação entre LASSBio596 e surfactante minimizou tais alterações morfométricas, sem diferença significativa entre os tratamentos.

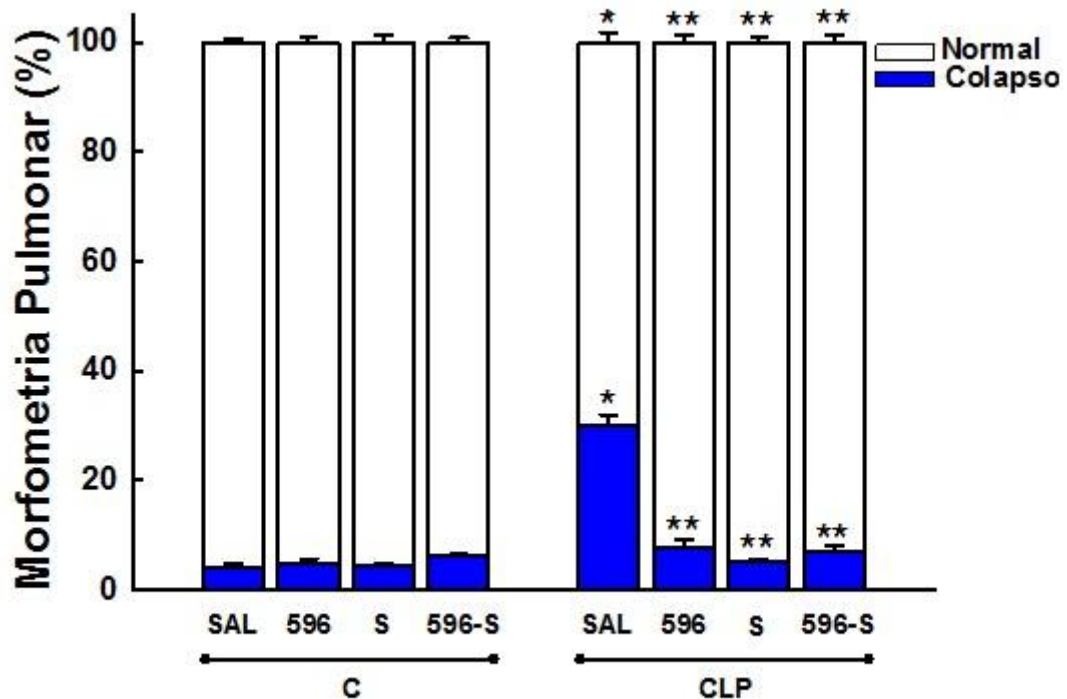


Figura 16 – Fração de área de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 6 animais em cada grupo. Dados foram obtidos de dez campos randômicos e não-coincidentes. * Significativamente diferente do grupo C-SAL ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$).

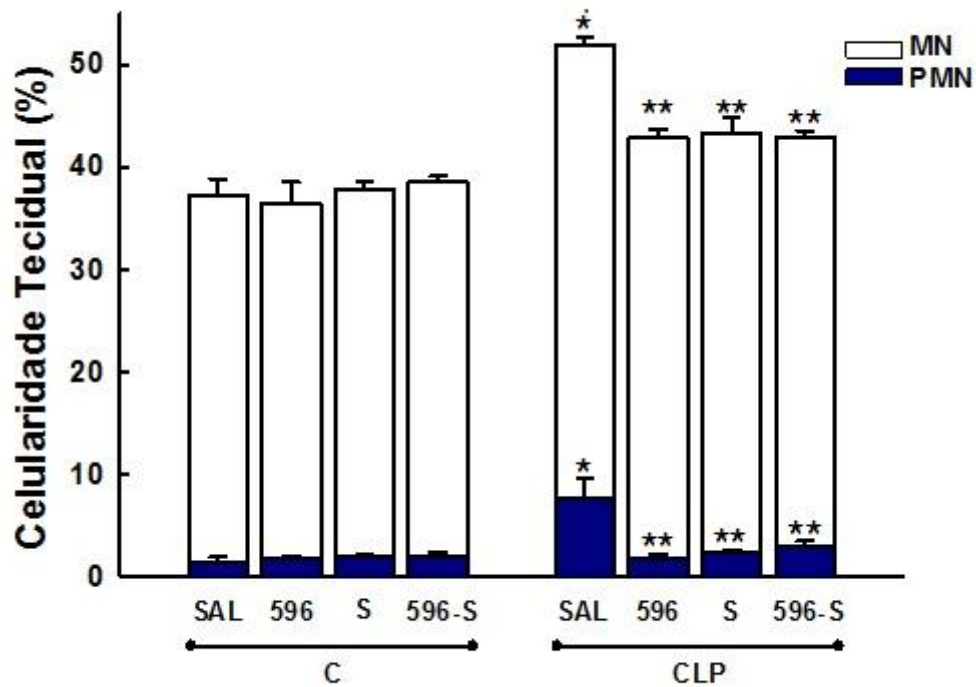


Figura 17 – Fração de área de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e totais (TOT) por área de tecido no parênquima pulmonar. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 6 animais em cada grupo. Dados foram obtidos de dez campos randômicos e não-coincidentes. * Significativamente diferente do grupo C-SAL ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$).

5.2.3.3. Análise quantitativa de fibras colágenas no parênquima pulmonar

Foi observado um aumento significativo do conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar dos animais do grupo CLP-SAL. O tratamento com LASSBio596 e associação entre LASSBio596 e surfactante preveniu o aumento do conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar, entretanto, o tratamento com surfactante não foi capaz de evitar tais alterações (Tabela 6).

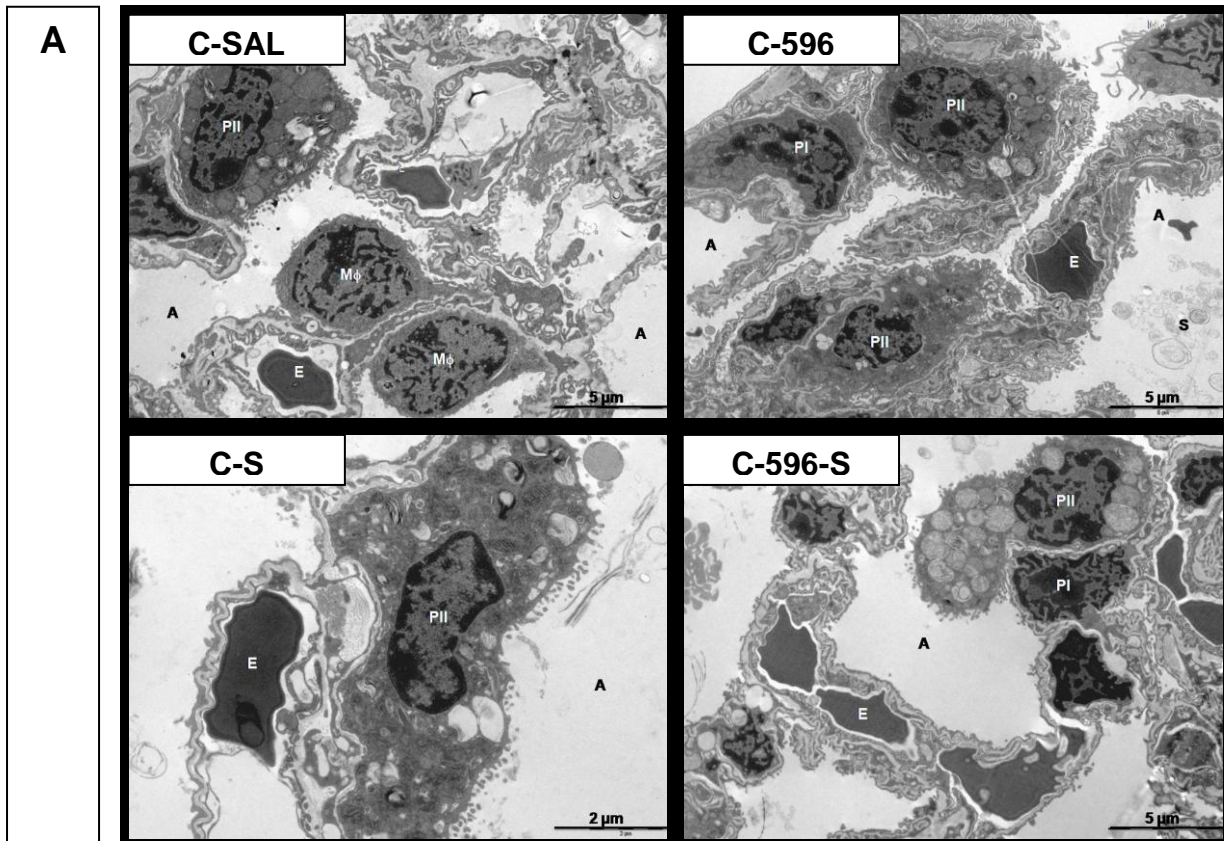
| GRUPOS | FIBRAS COLÁGENAS (%) |
|-----------|-----------------------------|
| C-SAL | 3,9 ± 0,7 |
| C-596 | 3,7 ± 0,9 |
| C-S | 4,2 ± 0,9 |
| C-596-S | 3,9 ± 1,1 |
| CLP-SAL | 7,4 ± 1,2* |
| CLP-596 | 4,7 ± 0,4 ^{*,**,#} |
| CLP-S | 7,2 ± 0,6* |
| CLP-596-S | 4,9 ± 0,4 ^{*,**,#} |

Tabela 6 – Fração de área de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio596 associado com surfactante (596-S). Dados foram obtidos de dez campos randômicos e não-coincidentes. Valores representam media ± SEM de 5 animais. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$).

5.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

5.2.4.1. Análise Qualitativa do Parênquima Pulmonar

Não se observaram alterações ultraestruturais no parênquima pulmonar dos grupos controles em presença das diferentes terapias (Painéis A). A análise do parênquima pulmonar por microscopia eletrônica no grupo CLP-SAL evidenciou necrose, apoptose e destruição das microvilosidades dos pneumócitos do tipo II, desorganização do parênquima pulmonar e presença de edema e colapso alveolar. O tratamento dos animais CLP com LASSBio 596 (CLP-596), surfactante (CLP-S) e associação entre LASSBio596 e surfactante (CLP-596-S) atenuou tais modificações no parênquima pulmonar (Painéis B) (Figura 18).



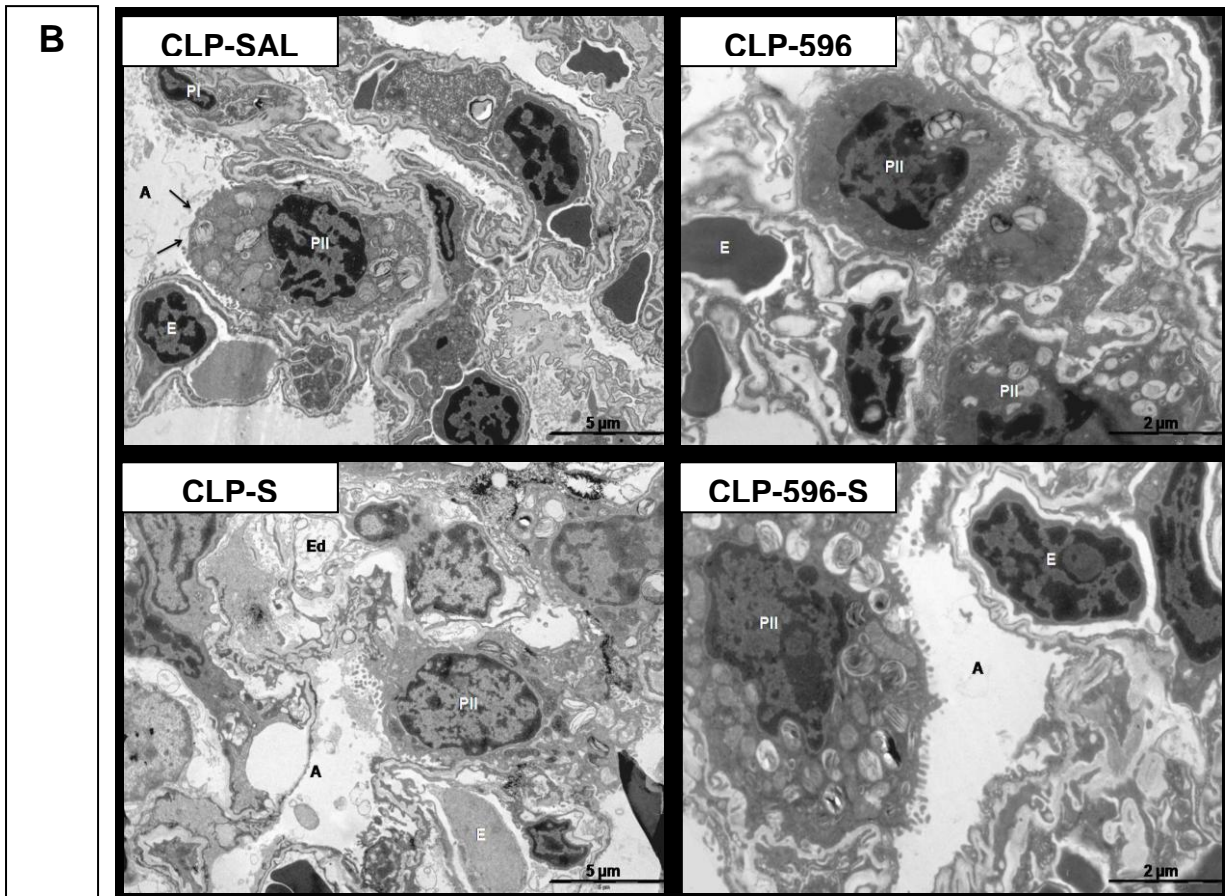


Figura 18 – Fotomicrografia eletrônica do parênquima pulmonar. Nos grupos controle (C) (Painéis A), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP (Painéis B), foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mk/kg de LASSBio596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio596 associado com surfactante (596-S). Espaço alveolar (A), Endotélio (E), Pneumócito do tipo I (PI), Pneumócito do tipo II (PII), Macrófago (M ϕ), surfactante Pulmonar (S), Edema (Ed). Destrução das microvilosidades dos pneumócitos do tipo II (setas).

5.2.4.2. Análise Semiquantitativa do Parênquima Pulmonar

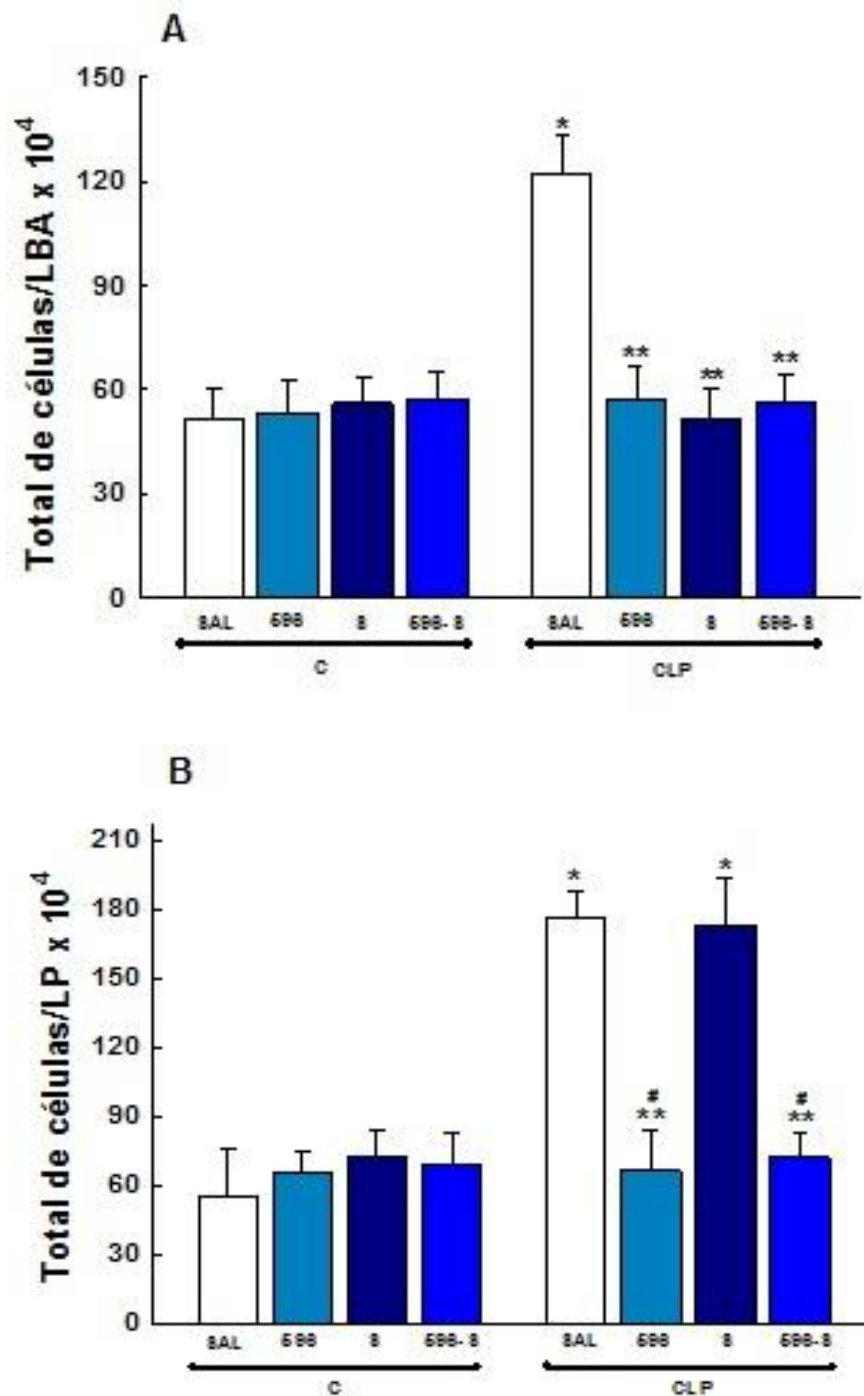
Não foram observadas alterações patológicas nos grupos controle em presença das diferentes terapias. Os animais doentes tratados com salina (CLP-SAL) apresentaram maior lesão de pneumócitos tipos 1 e 2, desnudamento da membrana, colapso alveolar, formação de membrana hialina e intenso dano endotelial. Os tratamentos com LASSBio596 e com a associação do LASSBio596 com SP exógeno preveniram tais alterações patológicas. O tratamento somente com SP exógeno preveniu o desnudamento da membrana, o colapso alveolar e a formação de membrana hialina; atenuou a lesão de pneumócitos do tipo I e II, porém os animais ainda apresentaram intenso dano endotelial (Tabela 7).

| GRUPOS | Lesão de pneumócitos tipo I | Lesão de pneumócitos tipo II | Desnudamento da membrana | Colapso Alveolar | Dano endotelial | Membrana Hialina |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| C-SAL | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| C-596 | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| C-S | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| C-596-S | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| CLP-SAL | 2 (2-3)* | 3 (2-4)* | 2 (1-3)* | 3 (2-4)* | 4 (3-4)* | 2 (1-3)* |
| CLP-596 | 1 (0-2)** | 1 (0-2)** | 1 (0-2)** | 1 (1-2)** | 1 (1-2)**,# | 1 (0-1)** |
| CLP-S | 2 (1-3)** | 2 (1-2)* | 1 (1-2)* | 1 (0-2)** | 3 (2-4)* | 1 (0-1)** |
| CLP-596-S | 1 (0-1)**,# | 1 (0-1)** | 1 (0-1)** | 1 (0-1)** | 1 (0-2)**,# | 1 (0-1)** |

Tabela 7 – Análise semiquantitativa do parênquima pulmonar. Os achados patológicos foram graduados de acordo com um sistema de escore de gravidade semi-quantitativo de 5-pontos, onde: 0 = parênquima pulmonar normal; 2 = alterações de 1 a 25%; 2 = 26 a 50%, 3 = 51 a 75%; e 4 = 76 a 100% do tecido examinado. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Os valores são a mediana (percentil 25 – percentil 75) de 4-5 animais por grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$).

5.2.5. Celularidade no fluido do lavado broncoalveolar, lavado peritoneal e sangue

Os animais do grupo CLP-SAL apresentaram um aumento significativo da celularidade total quando comparado com o controle. O tratamento com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 e surfactante preveniu o aumento da celularidade no lavado broncoalveolar, intraperitoneal e sangue, entretanto, o tratamento com surfactante preveniu apenas o aumento da celularidade no fluido do lavado broncoalveolar, sem impacto no lavado peritoneal e no sangue (Figura 19).



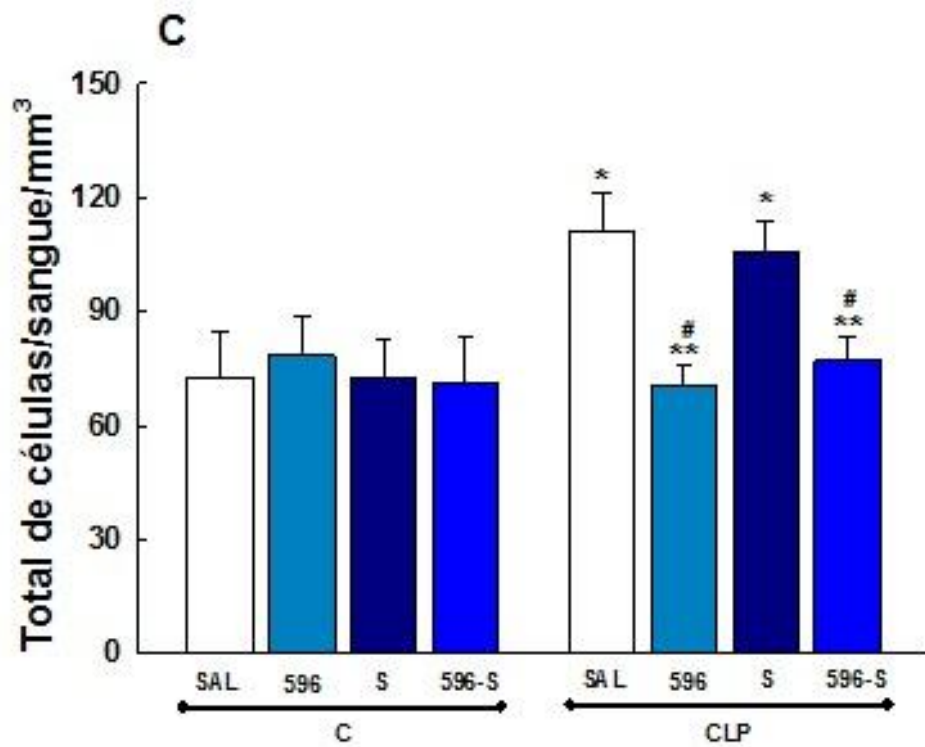


Figura 19 – Número total de células no fluido do lavado broncoalveolar (painel A), lavado intraperitoneal (painel B) e sangue (painel C). Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 4 animais em cada grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$).

5.2.6. Bioquímica Plasmática

5.2.6.1. Função Renal

Constatou-se aumento da uréia e creatinina no grupo CLP-SAL quando comparado com o controle. O tratamento com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 e surfactante preveniu tais alterações, entretanto, o tratamento com surfactante atenuou as modificações dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina (Figura 20).

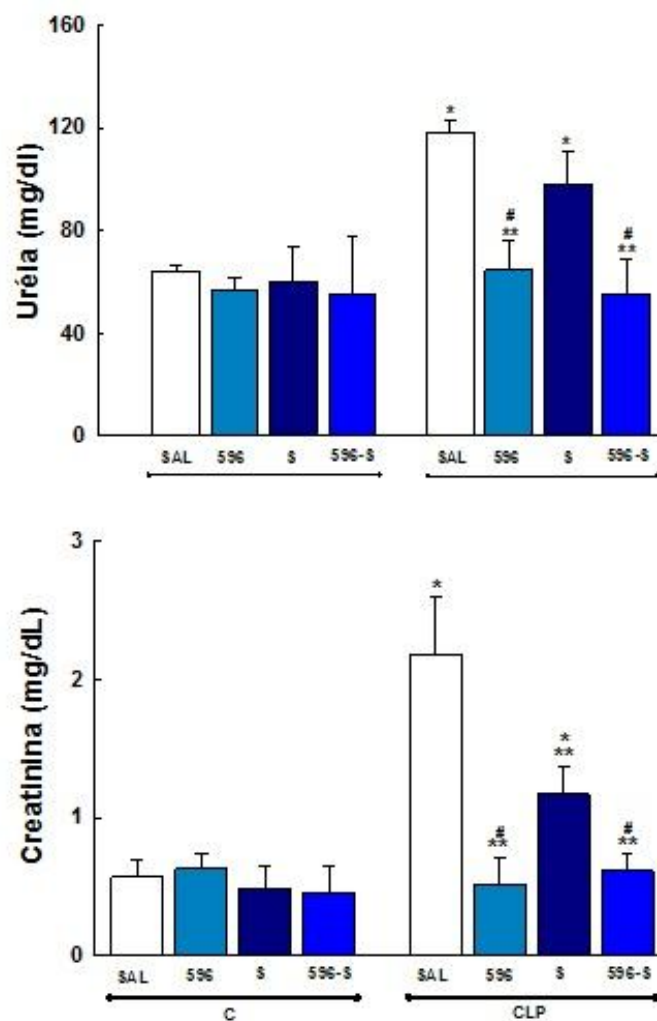


Figura 19 – Níveis séricos de uréia e creatinina no plasma. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 5 animais em cada grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$).

5.2.6.2. Função Hepática

Constatou-se aumento dos níveis séricos de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) no grupo CLP-SAL quando comparado ao controle. O tratamento com LASSBio596, surfactante e a associação entre LASSBio 596 e surfactante preveniu tais modificações dos níveis séricos de ALT e AST (Figura 21).

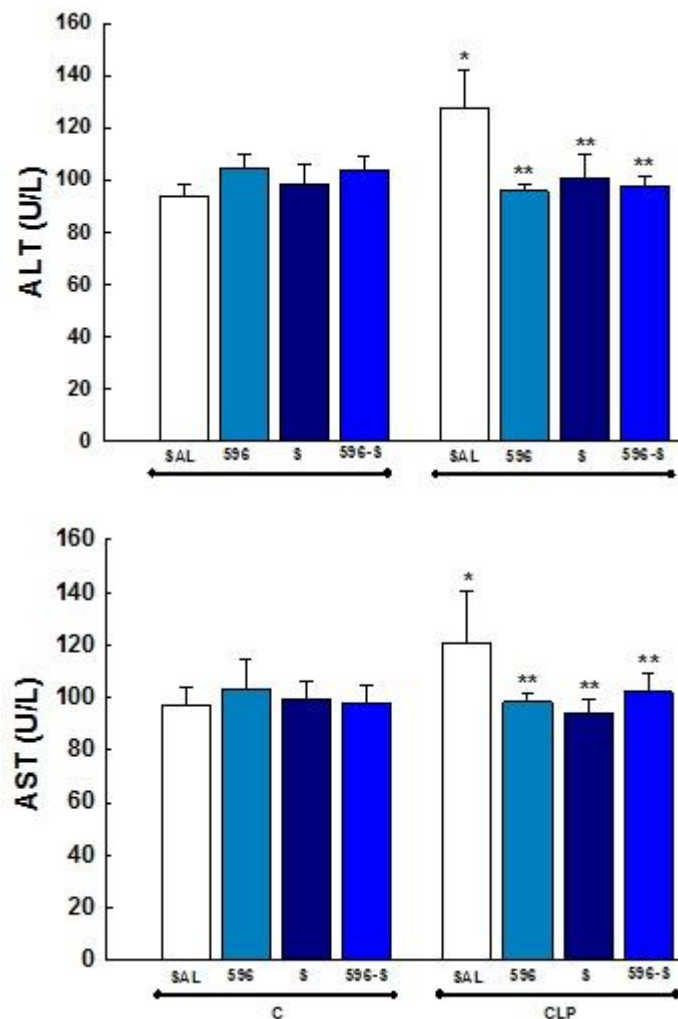


Figura 21 – Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). Barras representam média \pm SEM de 5 animais em cada grupo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). **Significativamente diferente do grupo CLP-Sal ($p < 0,05$).

5.2.7. Apoptose de Pulmão, Fígado, Rim e Intestino

5.2.7.1. Análise quantitativa e qualitativa

O número de células apoptóticas no pulmão, fígado, rim e vilos entéricos foi maior no grupo CLP-SAL, reduzindo quando os animais CLP foram tratados com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 e surfactante, entretanto sem impacto nos animais CLP tratados com surfactante (Figuras 22-25).

No que tange os efeitos do CLP sobre o grau de apoptose celular no pulmão, fígado, rim e intestino, houve maior apoptose celular nos animais tratados com salina (CLP-SAL). O tratamento com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 com surfactante exógeno preveniu a apoptose celular em pulmão, fígado, rim e intestino. O tratamento com surfactante exógeno atenuou a apoptose celular. Não foram observadas alterações significativas no grupo controle.

| GRUPOS | Pulmão | Fígado | Rim | Intestino |
|------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| C | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 (0-1) |
| CLP-SAL | 3 (2-3)* | 3 (2-3)* | 3 (2-4)* | 3 (2-4)* |
| CLP-596 | 1 (0-2)** | 1 (1-2)** | 1 (1-2)** | 1 (0-2)**,# |
| CLP-S | 2 (1-2)* | 2 (1-3)* | 2 (1-3) | 2 (2-3)* |
| CLP-596-S | 0 (0-1)**,# | 1 (0-2)** | 1 (0-1)** | 1 (0-1)**,# |

Tabela 8 – Análise semi-quantitativa de células apoptóticas. Um sistema de escore de gravidade semi-quantitativo de 5-pontos, onde: 0 = parênquima normal; 2 = alterações de 1 a 25%; 2 = 26 a 50%, 3 = 51 a 75%; e 4 = 76 a 100% do tecido examinado. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio596 associado com surfactante (596-S). Os valores são a mediana (percentil 25 – percentil 75) de 5 animais por grupo. Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente do grupo CLP-SAL ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo CLP-S ($p < 0,05$)

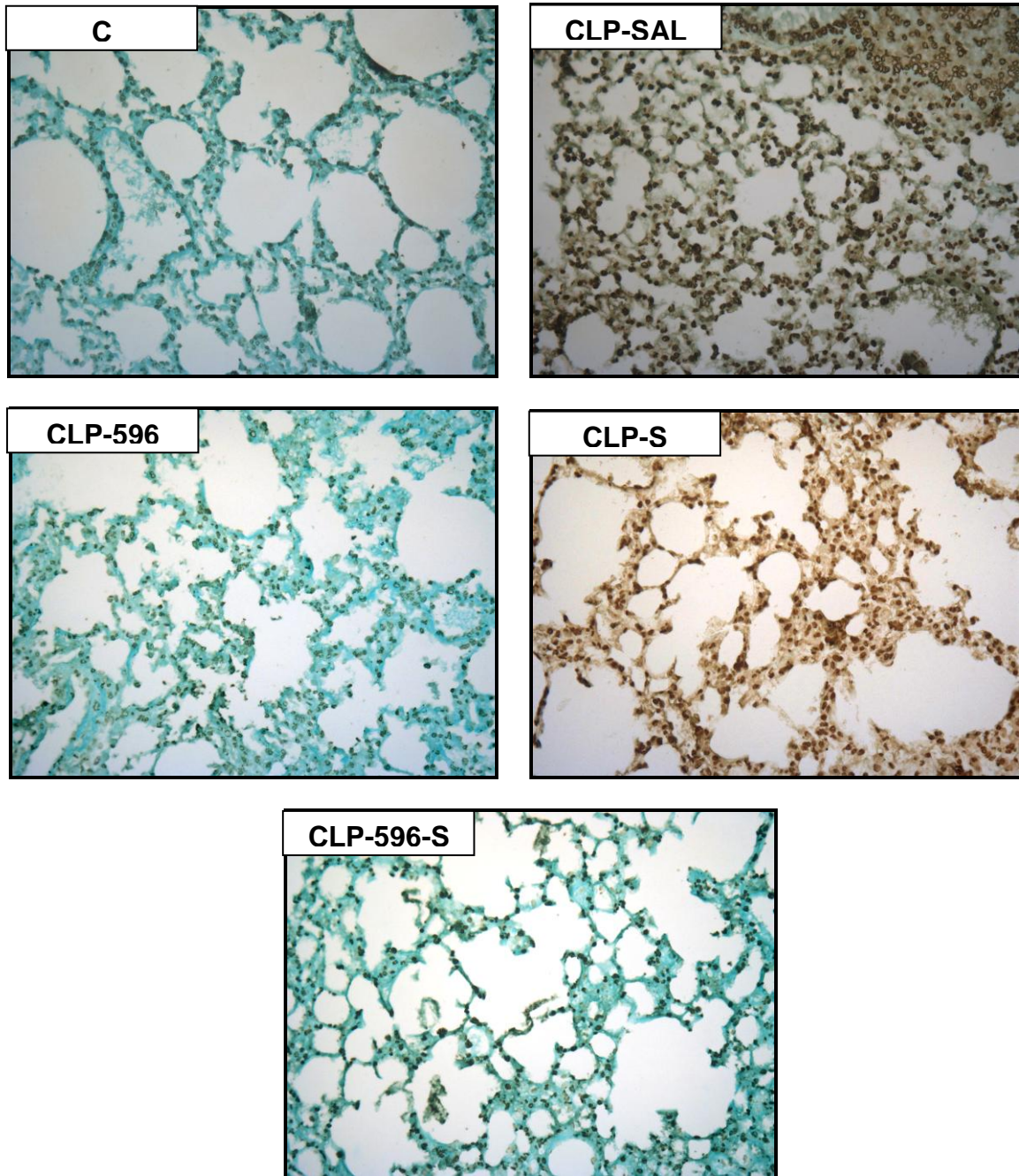


Figura 21 – Fotomicrografias representativas dos pulmões. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). As lâminas foram coradas utilizando o método TUNEL. A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom e o contraste em verde. Note a regeneração e redução da apoptose das células epiteliais após o tratamento com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 e surfactante. Aumento original 400x.

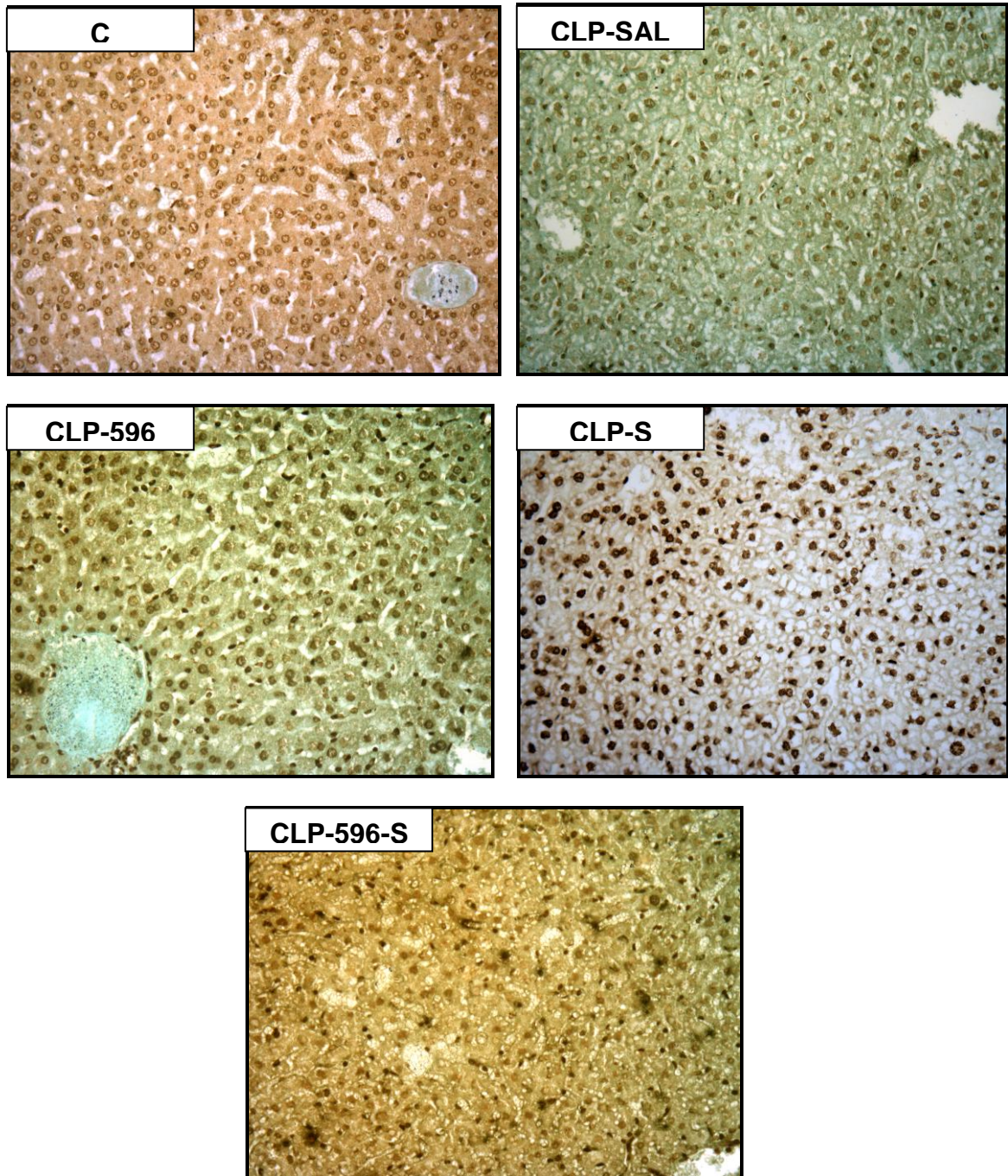


Figura 23 – Fotomicrografias representativas do fígado. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). As lâminas foram coradas utilizando o método TUNEL. A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom e o contraste em verde. Note a regeneração e redução da apoptose das células epiteliais após o tratamento com LASSBio596 e a associação entre LASSBio596 e surfactante. Aumento original 400x.

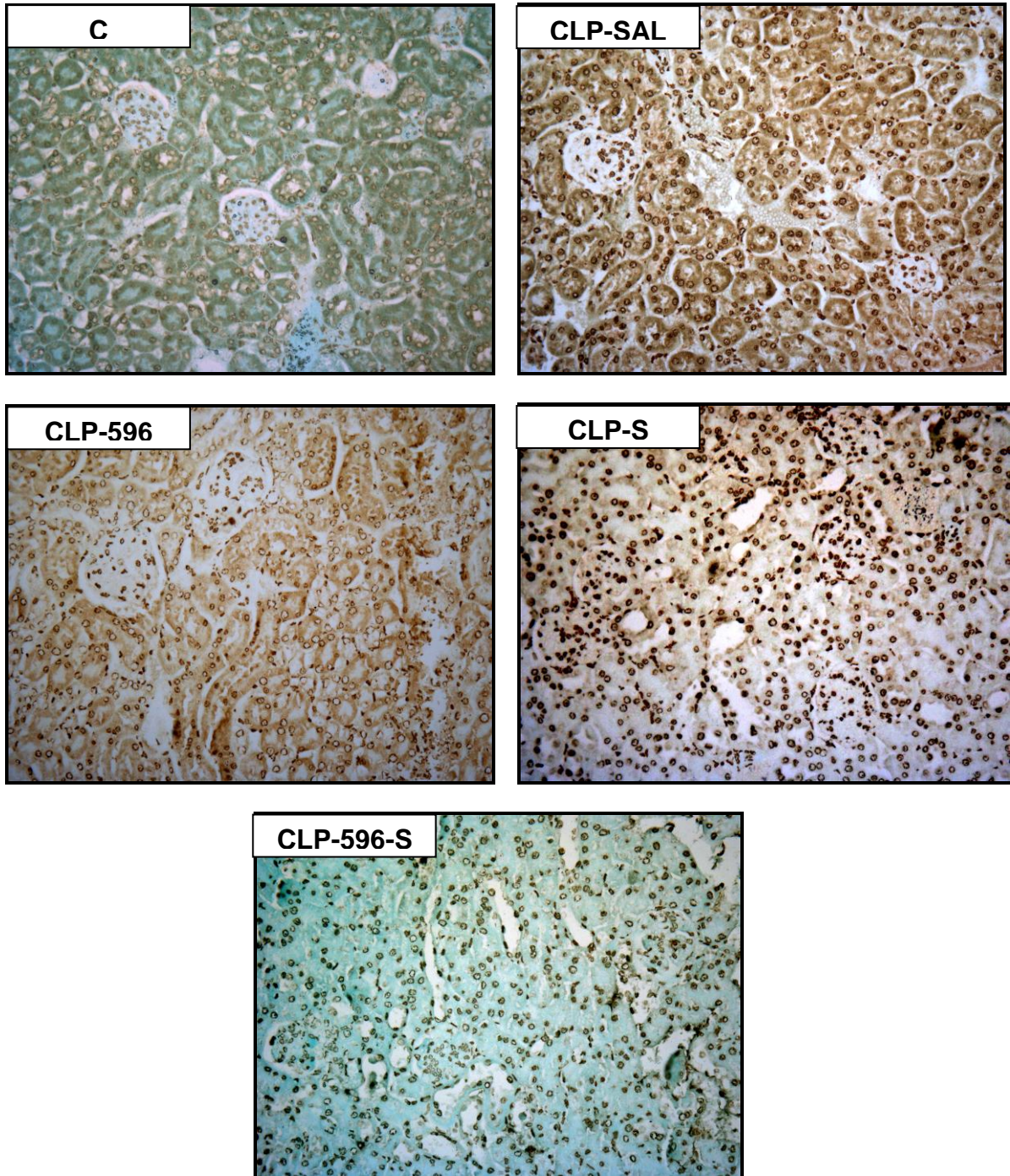


Figura 24 – Fotomicrografias representativas dos rins. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). As lâminas foram coradas utilizando o método TUNEL. A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom e o contraste em verde. Note a regeneração e redução da apoptose das células epiteliais após o tratamento com LASSBio 596 e a associação entre LASSBio 596 e surfactante. Aumento original 400x.

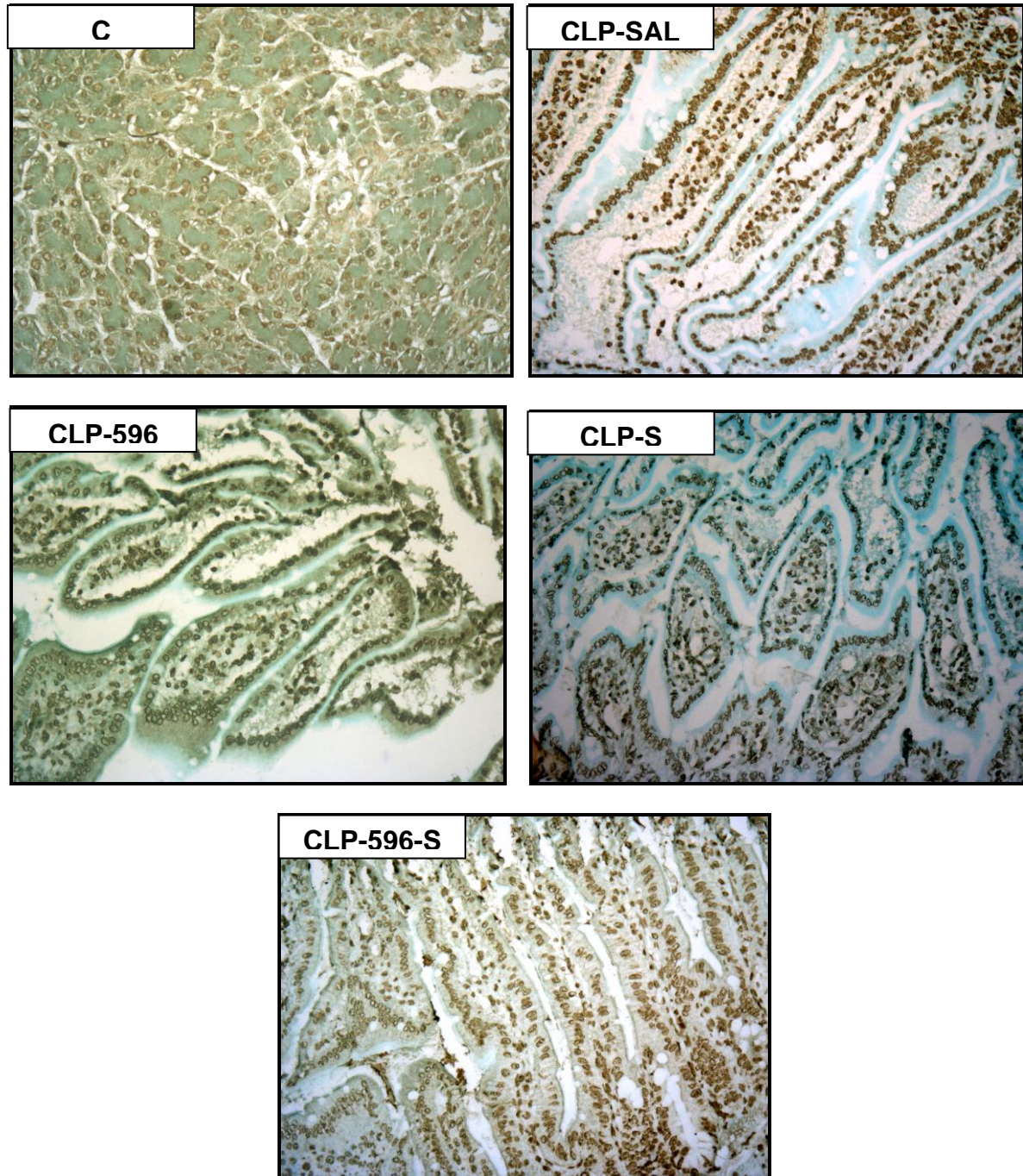


Figura 25 – Fotomicrografias representativas dos microvilos entéricos. Nos grupos controle (C), os animais foram submetidos à cirurgia *Sham*. No grupo CLP, foi realizada laparotomia seguida de ligadura e perfuração do ceco. Uma hora após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos C e CLP foram tratados com salina (SAL), 10 mg/kg de LASSBio 596 (596), 4 ml/kg de surfactante (S) ou LASSBio 596 associado com surfactante (596-S). As lâminas foram coradas utilizando o método TUNEL. A coloração positiva para apoptose é representada pela coloração marrom e o contraste em verde. Note a regeneração e redução da apoptose das células epiteliais após o tratamento com LASSBio 596 e a associação entre LASSBio 596 e surfactante. Aumento original 400x.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A LPA/SDRA induzida por CLP aumentou a mortalidade, promoveu deterioração da função pulmonar, modificações histológicas no parênquima pulmonar com colapso alveolar, espessamento da barreira alvéolo-capilar, infiltração de células polimorfonucleares, dano ao epitélio, formação de membrana hialina, deterioração das funções renal e hepática, além de elevar o número de células apoptóticas no pulmão, intestino, fígado e rim. A administração do LASSBio596 e a sua associação com SP exógeno foi capaz de prevenir as alterações funcionais e aumentar a sobrevivência dos animais, porém, o tratamento com surfactante exógeno apenas reverteu as alterações funcionais pulmonares, sem impacto sobre a mortalidade. Ademais, a terapia com surfactante não previniu completamente as alterações funcionais no pulmão, fígado e rim.

O uso de modelos animais possibilita o entendimento da patogênese da LPA/SDRA de etiologias distintas, bem como importantes avanços no desenvolvimento e aprimoramento de abordagens terapêuticas (MENEZES, 2005; LEITE-JUNIOR, 2008). A escolha da espécie a ser utilizada em estudos experimentais também é fundamental para uma boa interpretação dos resultados. A utilização de pequenos animais justifica-se pela possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas auxiliando assim a compreensão dos fenômenos naturais e possibilitando o estudo de estruturas e órgãos de difícil acesso em humanos. No presente estudo, a LPA/SDRA foi induzida por CLP, que ocasiona lesão de órgãos comparável à observada na sepse cirúrgica humana (REMICK, 2000; RITTIRSCCH, 2009). A técnica de CLP foi realizada de acordo com trabalho prévio realizado no nosso laboratório descrevendo a análise temporal das alterações da mecânica e histologia pulmonares em modelo de LPA/SDRA induzida por CLP (CHAO, 2010). Optamos em realizar nossa análise 24 horas após a indução da lesão, uma vez que neste momento constatou-se taxa de sobrevivência, padrão histológico e alterações funcionais características do desenvolvimento da LPA/SDRA de origem extrapulmonar (BERNARD, 1994). Embora todo o avanço técnico científico a taxa de mortalidade da LPA/SDRA ainda permanece alta (PHUA, 2009) variando entre nos estudos entre 30-50%. O presente modelo resultou em mortalidade de 50% no grupo CLP-SAL nas primeiras 24 horas.

O presente estudo foi o primeiro a analisar os efeitos de diferentes doses do LASSBio596 sobre a mortalidade, mecânica e histologia pulmonares em modelo

experimental de LPA induzida por CLP. O LASSBio596 é uma molécula desenvolvida pela hibridização molecular entre agentes farmacológicos conhecidos, talidomida, sildenafil e arilsulfonamida. Os efeitos do LASSBio596 na LPA foram previamente estudados por Rocco e colaboradores (2003) que demonstraram em modelo experimental de LPA induzida por LPS de *E. coli* que o LASSBio596 protegeu os camundongos, mantendo os valores de mecânica pulmonar semelhantes aos dos animais controle, reduzindo a fração de área de colapso alveolar e a infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares. Outro estudo do nosso grupo, avaliou os efeitos profiláticos do LASSBio596 em modelo experimental de inflamação alérgica crônica, e demonstrou que este agente farmacológico foi capaz de inibir as alterações de mecânica e histologia pulmonares, o índice de broncoconstrição de vias aéreas e a fibroproliferação (CAMPOS, 2006). Morard e colaboradores, em 2006, demonstraram melhora nos parâmetros histológicos e de mecânica pulmonar ao avaliarem os efeitos do LASSBio596 em modelo de lesão pulmonar por isquemia e reperfusão (MORARD, 2006).

O efeitos benéficos do LASSBio596 no estudo de Rocco e colaboradores (2003), no modelo de LPA supracitado, também foram constatados utilizando-se administração intraperitoneal de uma única dose de 10 mg/kg. Os autores administraram o fármaco 1 hora antes ou 6 horas depois da indução da lesão pulmonar, mostrando os benefícios do fármaco independente do momento da sua administração. No presente estudo, em função da gravidade do quadro, optou-se em realizar uma curva dose-resposta já que a dose de LASSBio596 poderia ser maior do que aquela realizada no modelo de LPA induzido pela instilação intratraqueal de endotoxina. Nesse contexto, estudos clínicos indicam que a mortalidade da LPA de origem extrapulmonar, tendo como causa principal a sepse, é mais elevada (aproximadamente 66%), quando comparada com a de pacientes com LPA de etiologia pulmonar (42%), que tem como principais causas a pneumonia e a aspiração de conteúdo gástrico (SEVRANSKY, 2008; SEVRANSKY, 2009; SHEU, 2010). No presente modelo, a taxa de sobrevivência da LPA induzida por CLP foi de 60%, valores similares ao observado nos estudos clínicos. Quando os animais foram tratados com LASSBio 596, houve aumento da sobrevivência, que foi maior com as doses de 5 mg/kg (75%) e 10 mg/kg (77%).

A função pulmonar também foi avaliada usando-se o método de oclusão ao final da inspiração. Dentre as diversas técnicas desenvolvidas para análise da

mecânica respiratória, o método de oclusão ao final da inspiração apresenta vantagem de individualizar os componentes elásticos, viscosos e viscoelásticos pulmonares (BATES, 1985 e 1989). Utilizando-se o método de oclusão ao final da inspiração, considerando-se o volume corrente e o fluxo aéreo constantes, alterações observadas em $\Delta P_{tot,L}$ refletem as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inhomogêneos pulmonares. $\Delta P_{1,L}$ reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais (SIMILOWSKI, 1989). $\Delta P_{2,L}$ reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (stress relaxation) do tecido pulmonar, juntamente com pequena contribuição do *pendelluft* (BATES, 1989; SALDIVA, 1992). Visto que as coletas dos dados de mecânica foram realizadas após a retirada da parede torácica ântero-lateral, a pressão medida na abertura das vias aéreas representa a pressão transpulmonar. A análise da pressão transpulmonar é mais adequada para avaliar os efeitos benéficos do agente farmacológico estudado no pulmão. Para evitar o colapso de vias aéreas, ductos e alvéolos com a retirada da parede torácica, uma PEEP equivalente a 2 cmH₂O (SALDIVA, 1992).

A elastância estática e das pressões resistiva e viscoelástica do pulmão foram significativamente maiores no grupo CLP-SAL em relação ao controle. Estas alterações na mecânica pulmonar corroboram os achados de estudos clínicos (GREGORY, 1991; INGENITO, 1994) e experimentais (MENEZES, 2005; LEITE-JÚNIOR, 2008; CHAO, 2010) de LPA/SDRA. O aumento da elastância estática do pulmão evidenciado neste estudo pode ser atribuído aos seguintes achados anatomopatológicos: colapso alveolar, espessamento do septo alveolar, e inflamação tecidual com infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares no parênquima pulmonar. O aumento da pressão resistiva pode estar relacionado ao intenso colapso alveolar acarretando redução do diâmetro interno da via aérea, associada à presença de processo inflamatório e hiperreatividade das vias aéreas, decorrentes da inflamação. O aumento da pressão viscoelástica/inhomogênea pode ser atribuído à inhomogeneidade alveolar determinada por áreas de colapso alveolar e áreas de alvéolos normais, bem como ao componente viscoelástico do parênquima pulmonar exacerbado pelas alterações do sistema de fibras colágenas, pela fibrogênese, característica deste modelo (CHAO, 2010), porém não estudada no presente trabalho. O tratamento com LASSBio596 nas doses de 5 e 10 mg/kg preveniu tais modificações na mecânica e histologia pulmonares, sendo a atividade

anti-inflamatória mais evidente com a dose de 10 mg/kg. Conforme supracitado, esses benefícios morfofuncionais da administração intraperitoneal do LASSBio596 em modelo murino de LPA induzida por CLP corroboram os achados previamente vistos em diferentes modelos de inflamação pulmonar, tais como: LPA induzida por LPS de *E. coli* (ROCCO, 2003) e por isquemia e reperfusão (MORARD, 2006). Em todos estes estudos, uma dose única dose de LASSBio 596 de 10 mg/kg na fase precoce da lesão foi capaz de prevenir alterações na mecânica e histologia pulmonares. Esses estudos deixam evidentes o perfil anti-inflamatório LASSBio596 (LIMA, 2002; ROCCO, 2009).

O mecanismo pelo qual o LASSBio596 atua no pulmão ainda é desconhecido, porém acredita-se que os benefícios apresentados na LPA sejam atribuídos ao seu perfil anti-inflamatório com redução dos níveis de TNF- α . Os benefícios apresentados pela administração de uma dose única do LASSBio596 (nas doses de 5 e 10 mg/kg) sugerem que este fármaco possa se tornar uma importante ferramenta do arsenal terapêutico da LPA/SDRA.

Desde as primeiras tentativas de reposição de surfactante, em 1960, por Avery e Mead, até o primeiro relato da utilização positiva de surfactante exógeno no tratamento da SDRRN por Fujiwara, em 1980, a utilização de SP exógeno vêm sendo discutida em uma série de estudos que demonstraram melhora na oxigenação, função pulmonar e nos dias livres da ventilação mecânica, em neonatos com SDRRN que receberam reposição da substância tensoativa (AVERY & MEAD, 1959; FUJIWARA, 1980). Esses resultados, juntamente com a experiência em modelos animais, foram suficientemente positivos, a ponto de convencer pesquisadores da lógica e da eficácia do uso do surfactante exógeno em recém-nascidos com SDRRN. Os benefícios observados em recém-nascidos com SDRRN levaram a pesquisadores utilizarem a terapêutica de reposição com surfactante exógeno em adultos com LPA/SDRA.

A hipótese de que a administração de surfactante exógeno pode ser um tratamento eficaz para pacientes com LPA/SDRA é apoiada pelas seguintes observações: anormalidades da composição do SP e função em pacientes com LPA/SDRA; os benefícios do surfactante exógeno no pulmão experimental; nos benefícios do tratamento com surfactante em recém-nascidos com SDRRN estabelecida em ensaios clínicos. Entretanto, os resultados dos estudos controlados e randomizados com a reposição do surfactante exógeno na SDRA são controversos

e estão restritos a pacientes adultos. É possível que a discrepância observada nos estudos seja decorrente do tipo de surfactante utilizado, da técnica de instilação da droga, da dose utilizada e tempo de administração (DAVIDSON, 2006; FRANK & THOMPSON, 2010).

Diversos surfactantes têm sido utilizados nos ensaios experimentais e clínicos podendo ser divididos em dois grandes grupos: os produtos contendo componentes do surfactante endógeno de pulmão animal e os preparados sintéticos. Dentre estes podemos destacar: (i) os surfactantes extraídos por solvente orgânico de lavado broncoalveolar (Alveofact, bLES, Infasurf); (ii) surfactante extraídos por solvente orgânico de macerado de pulmão animal (Curosurf); (iii) surfactantes extraídos por solvente orgânico de macerado de pulmão animal suplementado com fosfolípidos ou apoproteínas recombinantes (Surfacten, Survanta, rSP-C+); (iv) sintéticos sem apoproteínas (ALEC, Exosurf); (v) surfactante com peptídeo sintético (KL4); e (vi) surfactante com apoproteínas recombinantes (rSP-C) (RAGHAVENDRAN 2008). No nosso estudo optamos em utilizar o Survanta® (Abbott Laboratório) que é comercializado no mercado brasileiro. O Survanta® é um surfactante natural extraído de macerado de pulmão bovino e suplementado com dipalmitoilfosfatidilcolina, ácido palmítico e tripalmitina que são adicionados para padronizar a composição e mimetizar as propriedades tensoativas do surfactante endógeno. O produto final, em suspensão aquosa na concentração de 25 mg de fosfolípidos/ml, contém 88 a 90% de fosfolípidos, dos quais 50% na forma dissaturada e menos de 1% de apoproteínas SP-B e SP-C.

Ensaios clínicos controlados têm sido realizados utilizando a terapêutica de reposição de surfactante em pacientes com LPA/SDRA (DAVIDSON, 2006; FRANK & THOMPSON, 2010). O maior destes estudos, estudo fase III, 725 pacientes com LPA/SDRA induzida por sepse receberam surfactante artificial/sintético (Exosurf) ou solução salina por aerolização por até 5 dias. Os resultados deste estudo demonstraram não houve diferença significativa na sobrevivência em 30 dias, nos dias de internação nas UTI's ou da duração da ventilação mecânica. Os resultados negativos observados neste estudo envolvem a pobre função *in vitro* do Exosurf observada e o momento da sua administração. Pacientes com LPA/SDRA apresentam extravasamento de proteínas da circulação para o espaço alveolar que podem levar a inativação do surfactante administrado. A deterioração do SP pode ser preservada se administrada precocemente em pacientes com LPA/SDRA

precoce ou em grupos de risco para o desenvolvimento da LPA/SDRA. Outro fator que pode ser atribuído aos efeitos observados neste estudo com o Exosurf, pode ser devido à ausência de apoproteína do surfactante, que é importante na resistência da inibição do surfactante por proteínas (ANZUETO, 1996; GILLIARD, 1994). Os benefícios do Survanta® foram demonstrados em um estudo fase II, onde a administração em bolus resultou em melhora na oxigenação, sobrevida e dias livres da ventilação mecânica, sugerindo que o Survanta®, que contém apoproteínas, pode ser benéfico no tratamento de pacientes com LPA/SDRA (GREGORY, 1997).

No presente estudo, as medidas da função pulmonar foram utilizadas como instrumento para analisar os efeitos das diferentes terapias (LASSBio596, surfactante e associação entre LASSBio596 e surfactante) e o método de oclusão ao final da inspiração se mostra eficaz para tal avaliação por individualizar variações de pressões do sistema respiratório, pulmão e parede em seus componentes elásticos, viscosos e viscoelásticos (BATES, 1985 e 1989; CORRÊA, 2001; ROCCO, 2004; FARIAS, 2005; XISTO, 2005; GARCIA, 2008).

A LPA/SDRA induzida por CLP resultou em aumento dos parâmetros funcionais pulmonares tais como Est,L (56%), $\Delta P_{1,L}$ (36%), $\Delta P_{2,L}$ (67%) e $\Delta P_{tot,L}$ (47%) no grupo CLP-SAL. Tais alterações nos componentes elásticos e viscoelásticos podem ser explicadas pelas distorções ocasionadas pelo processo inflamatório no parênquima pulmonar, com aumento das áreas de colapso alveolar, diminuição das áreas normais, aumento do infiltrado de células inflamatórias (PMN) no parênquima pulmonar (MENEZES, 2005; SANTOS, 2006; CHAO, 2010). Por outro lado, as modificações do componente resistivo estão relacionadas à presença de edema peribrônquico reduzindo a luz da via aérea (MENEZES, 2005).

O tratamento com LASSBio596 e sua associação com surfactante exógeno resultou em aumento da sobrevida dos animais observadas em 4 dias, entretanto, o grupo tratado com surfactante exógeno não apresentou aumento na sobrevida dos animais. Quanto aos parâmetros funcionais pulmonares, todos os tratamentos (LASSBio596, surfactante exógeno e associação entre LASSBio596 e surfactante) preveniu as alterações funcionais e histológicas do parênquima pulmonar. Davidson e colaboradores. (2006) publicaram uma metanálise da sobre a utilização da terapêutica de reposição de surfactante na LPA/SDRA e concluíram que o surfactante exógeno foi capaz de melhorar a oxigenação e a mecânica pulmonar, entretanto não possui impacto sobre a mortalidade. Os benefícios da terapêutica de

reposição de surfactante parecem ser dependentes do tipo da lesão pulmonar (direta ou indireta). Uma possível explicação seria que usualmente os pacientes com LPA/SDRA evoluem para SDMO devido a uma resposta inflamatória sistêmica, como a observada na sepse. Embora a terapêutica de reposição de surfactante melhorar e pode até reverter as alterações pulmonares, esta não possui efeitos sobre as manifestações sistêmicas, limitando assim a sua utilização na prática clínica. Logo, sugere-se a associação da terapêutica de reposição de surfactante com outras terapêuticas (GATTINONI, 2001; CORDINGLEY, 2002; DERDAK, 2002). No nosso estudo, foi possível observar um aumento da taxa de sobrevivência dos animais tratados com tratados com a associação do LASSBio596 e surfactante (CLP-S) sugerindo que o LASSBio596 atuou juntamente com o surfactante não só no pulmão mas nos outros órgãos.

No estudo ultraestrutural do parênquima pulmonar, o grupo CLP-SAL apresentou distorção do parênquima pulmonar, degeneração dos corpos lamelares e apoptose de PII e lesão das microvilosidades dos PII, repercutindo negativamente na produção, secreção e reciclagem do SP. O envolvimento pulmonar durante a sepse, especialmente a formação do edema alveolar e a falência respiratória, representa apenas uma das manifestações de uma resposta sistêmica ao foco periférico da infecção (MALLOY, 1997). Na inflamação pulmonar durante a sepse ocorre o extravasamento de proteínas plasmáticas que normalmente não estão presentes no espaço alveolar (MORAES, 2003). Os mediadores inflamatórios liberados na circulação durante a sepse podem lesar as células epiteliais do tipo II resultando em alterações na síntese, secreção e reciclagem de componentes do surfactante, edema alveolar, déficit na remoção do edema do espaço alveolar pelo pneumócito tipo II (WARE & MATTHAY, 2000). O tratamento com LASSBio596 (CLP-596), surfactante (CLP-S) e a associação do LASSBio 596 com surfactante exógeno (CLP-596-S) preveniu tais distorções no parênquima pulmonar que podem ser observadas pela integridade do parênquima pulmonar, dos PII com preservação das microvilosidades, núcleos e corpos lamelares íntegros, entretanto no grupo CLP-S embora a terapia com surfactante preveniu as alterações ultraestruturais do parênquima pulmonar, é possível observar a presença de edema alveolar neste grupo decorrente do processo inflamatório desencadeado pela LPA/SDRA.

As células do tecido pulmonar constantemente remodelam o seu microambiente, alterando os componentes e a estrutura da MEC. A dinâmica de regulação

da MEC é complexa, envolvendo um balanço entre síntese e deposição das moléculas da mesma, bem como sua degradação (PELOSI & ROCCO, 2008; DOS SANTOS, 2008). Diversas patologias podem alterar a estrutura da matriz extracelular (MEC), ocasionando alterações na histoarquitetura pulmonar. O reparo e remodelamento do tecido pulmonar ocorrem devido à agressão ao tecido pulmonar e da cascata inflamatória envolvida no processo de lesão. Os fatores que regem se vai haver reparo pulmonar permanecem desconhecidos, mas sabe-se que diversos fatores estão envolvidos neste processo tais como interação entre células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas, fatores de crescimento e PII íntegros (BERTHIAUME, 2001). A deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar foi observada no grupo CLP-SAL, e o tratamento com LASSBio596 e sua associação com surfactante exógeno (CLP-S) preveniu a deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar, entretanto, o tratamento com surfactante por si só não pode prevenir a deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Os benefícios observados parecem ser devido aos efeitos terapêuticos apresentados pelo LASSBio596 em agir inibindo os efeitos sobre o remodelamento pulmonar, corroborando com os dados apresentados em estudos prévios (ROCCO, 2003 ; CAMPOS, 2006). É possível que os efeitos benéficos neste modelo de LPA induzida por CLP, seja decorrente de efeitos inibitórios do LASSBio596 interferindo em fatores de crescimento, como o TGF- β .

Os pulmões de pacientes com LPA/SDRA apresentam um número aumentado de PMN dentro dos espaços vasculares, interstício e alvéolos, onde, normalmente, esses fagócitos itinerantes geralmente são encontrados em quantidade muito pequena. Um dos principais paradoxos no campo da lesão pulmonar é a atuação dos PMN, que usualmente servem como importante mecanismo de defesa em virtude da sua capacidade e habilidade de ajudar a resolver uma resposta inflamatória, mas na LPA/SDRA, eles tendem a perpetuar a lesão (CHOLLET-MARTIN, 2000). O influxo de neutrófilo para dentro dos alvéolos ocorre antes do desenvolvimento da lesão pulmonar aguda e, em alguns pacientes, a persistência da resposta inflamatória neutrofílica inicial está associada com alta mortalidade (STEINBERG, 1993). Nós avaliamos o influxo de células presentes no fluido do lavado broncoalveolar, peritoneal e no sangue. Foi possível observar um aumento significativo da celularidade no grupo CLP-SAL em todos os parâmetros analisados, e o tratamento com LASSBio596 (CLP-596) e sua associação com

surfactante (CLP-596-S) preveniu o aumento da celularidade no lavado broncoalveolar, peritônio e sangue, porém, o tratamento com SP exógeno (CLP-S) não preveniu as modificações na celularidade no lavado peritoneal e no sangue apenas no lavado broncoalveolar. Estes dados só vêm a corroborar com a afirmativa de que o surfactante só apresenta atividade local quando administrado (DAVIDSON, 2006).

A causa mais comum de morte em pacientes com sepse é a disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), caracterizada pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos. Os órgãos habitualmente envolvidos são pulmões, rins, coração (incluindo o sistema vascular) e fígado. Do ponto de vista histopatológico, os achados incluem áreas focais de necrose e apoptose. A apoptose tem um importante papel no sistema imune e reparo tecidual na LPA/SDRA (LI 2004), podendo assim contribuir tanto na patogênese da fibrose pulmonar como na sua resolução (UHUAL, 2002; MARTIN, 2003). A apoptose de células epiteliais pode levar a destruição do parênquima acometido levando a perda do arcabouço necessário para o reparo tecidual, assim promovendo uma resposta fibrótica (SLEE, 1999).

Devido a letalidade da sepse estar associada a SDMO, avaliamos a função renal e hepática, e a apoptose de células de pulmão, fígado, rim e intestino. O grupo CLP-SAL apresentou deterioração da função renal e hepática, além de apresentar maior taxa de apoptose de pulmão, fígado, rim e intestino. O tratamento com LASSBio596 (CLP-596) e sua associação com surfactante (CLP-596-S) preveniu a deterioração da função renal e hepática, além de apresentarem menor taxa de apoptose de pulmão, fígado, rim e intestino. O tratamento com surfactante não promove alterações significativas sobre as taxas de apoptose de órgãos distais e nos índices de função renal e hepática.

A mecanotransdução é a conversão de estímulos mecânicos, tais como a deformação celular, em alterações bioquímicas e biomoleculares. As forças mecânicas são importantes para a estrutura e função pulmonares e são produzidas por gradientes de gravidade, movimento, força osmóticas, e interações entre células e/ou células da matriz. Como tais forças mecânicas podem ser captadas pelas células (mecanosensores) e convertidas em sinais bioquímicos ainda não é conhecida. É sabido que a hiperdistensão pulmonar e as forças de cisalhamento geradas durante a abertura repetida das unidades alveolares colapsadas das

regiões pulmonares atelectasiadas, podem agravar a lesão pulmonar e a inflamação pulmonar e sistêmica (DOS SANTOS & SLUTSKY, 2000; WIRTS & DOBBS, 1990; SLUTSKY, 1999; SLUTSKY & TREMBLAY, 1998).

Estudos demonstram que o estresse tecidual induzido pela ação de forças mecânicas leva a um aumento da resposta inflamatória, evidenciado pela infiltração de neutrófilos nos pulmões, do lavado broncoalveolar e níveis de mediadores inflamatórios. Acredita-se que compartimentalização da resposta pulmonar local é perdida, e a liberação sistêmica de mediadores inflamatórios perpetua e resposta sistêmica e o desenvolvimento da SDMO (GRASSO, 2000). Ranieri e colaboradores (2000) demonstraram que as concentrações de citocinas pró-inflamatórias no LBA e no plasma de pacientes ventilados com estratégia protetora apresentaram redução dos níveis de PMN, concentrações de células e citocinas pro e anti-inflamatórias, e que estes dados estão correlacionados com a melhora da SDMO.

A prevenção da função hepática e a atenuação da deterioração da função renal nos animais tratados com a terapêutica de reposição de surfactante podem ser explicadas pela diminuição da resposta inflamatória pulmonar induzida por estresse tecidual causado por abertura e fechamento cíclicos das unidades aveolares colapsadas. Isso foi melhor observado na função hepática devido ao acometimento hepático ser mais tardio em comparação aos rins que são mais sensíveis e após o acometimento pulmonar, é o primeiro órgão a ser acometido.

Embora as funções renal e hepática apresentassem melhoras, a terapêutica de reposição de surfactante não promoveu alterações na apoptose celular, isto pode ser devido a associação da resposta inflamatória ocasionada pelo foco intestinal com distúrbio microcirculatórios que são os principais fatores no desenvolvimento da SDMO. Logo, sugere-se que atenuação da liberação de mediadores inflamatórios induzida pelo estresse previne a deterioração da função renal e hepática, porém, o desenvolvimento da SDMO ocorre devido à associação entre resposta inflamatória e distúrbios circulatórios. A terapêutica de reposição com surfactante exógeno previniu a inflamação pulmonar, porém, não apresentou impacto sobre o processo inflamatório sistêmico e sobre distúrbio circulatórios.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O LASSBio596 atuou no processo inflamatório aumentando a sobrevivência dos animais e evitando as alterações funcionais na mecânica e histologia pulmonares, rim, fígado e intestino no presente modelo de LPA induzida por CLP, sendo estes efeitos independentes da sua associação com o SP.

O SP exógeno sozinho melhorou a mecânica e histologia pulmonares, mas não atuou de forma significativa sobre o processo inflamatório sistêmico.

Os efeitos apresentados pelo LASSBio596 sugerem que este fármaco pode se tornar uma importante ferramenta do arsenal terapêutico na LPA/SDRA prevenindo a deterioração da função pulmonar e o desenvolvimento da SDMO.

PERSPECTIVAS FUTURAS

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Alguns resultados deste estudo estão em fase final de análise:

- ✓ O perfil inflamatório através da análise da celularidade diferencial do LBA, LP e Sangue;
- ✓ O perfil de citocinas envolvidas como: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β ;
- ✓ As características SP (perfil lipídico e proteico) no LBA;
- ✓ As proteínas do SP (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D) no LBA;
- ✓ As propriedades biofísicas do SP através da análise da tensão superficial no LBA.

Com base nos resultados benéficos dos tratamentos, principalmente da utilização do LASSBio596 no presente modelo, tais como a prevenção do aumento do processo inflamatório, remodelamento e prevenção da apoptose de órgãos, faz com que nos questionemos os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos observados neste estudo. Para isso, avaliaremos temporalmente os efeitos terapêuticos do tratamento com LASSBio596 associado ao surfactante exógeno sobre a função e histologia pulmonares, bem como sobrevida e reparo de órgãos periféricos em modelo experimental de LPA induzida por CLP.

Para isso, analisaremos:

- ✓ Os efeitos terapêuticos sobre a taxa de mortalidade em 7 dias;
- ✓ As alterações funcionais, histológicas e morfométricas;
- ✓ O perfil inflamatório e anti-inflamatórios por meio da celularidade total e diferencial,
- ✓ Expressão de RNAm para mediadores inflamatórios, fibrogênicos e para proteínas da matriz extracelular pulmonar;

- ✓ A repercussão da terapia sobre a apoptose celular pulmonar e em órgãos periféricos;
- ✓ A função de órgãos periféricos;
- ✓ As características lipídicas e protéicas no LBA,
- ✓ Propriedades biofísicas do SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCP/SCCM. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, 1992, 20:864–74.

Angus, D.C., et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, 29(7): 1303-10, 2001.

Angus, D.C., Wax, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, 29(suppl 7):S109–S116, 2001.

Anzueto, A., et al. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. **N Engl J Med**, 30; 334(22):1417-21,1996.

Ashbaugh, D.G., et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, 2(7511): 319-323, 1967.

Auten, R.L., et al. Surfactant treatment of full-term newborns with respiratory failure. **Pediatrics**, 87: 101–7,1991.

Avery, M.E., Mead, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **Am J Dis Child**, 97:517-26, 1959.

Balaraman, V., et al. Lavage Administration of Dilute Surfactants after Acute Lung Injury in Neonatal Piglets. **Am J Respir Crit Care Med**, 158: 12–17, 1998.

Balibrea, J.L., Arias-Díaz, J. Acute Respiratory Distress Syndrome in the Septic Surgical Patient. **World J Surg**, 27: 1275-1284, 2003.

Barie, P.S., et al. Multiple organ dysfunction syndrome in critical surgical illness. **Surg Infec**,10(5): 369-77, 2009.

Bates, J.H., et al. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J Appl Physiol**, 58: 1840-1848, 1985.

Bates, J.H., et al. The low-frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. **Respir Physiol**, 78: 369-382, 1989.

Bates, J.H., et al. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**, 67: 488-92, 1989.

Bates, J.H., et al. Theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol**, 64: 2204-14, 1988.

Bates, J.H., et al. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J App Physiol**, 59: 732-37, 1985.

Bates, J.H., et al. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol**, 65: 408-14, 1988.

Bates, J.H., et al. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J Appl Physiol**, 58: 1840-48, 1985.

- Bates, J.H., et al. The low frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. **Respir Physiol**, 78: 369-82, 1989.
- Bernard, G.R., ET al. The American-European Consensus Conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. **Am J Respir Crit Care Med**, 149: 818-24, 1994.
- Berthiaume, Y., et al. Lung edema clearance : 20 years of progress. Invited review: Alveolar edema fluid clearance in the injured lung. **J Appl Physiol**, 2207-2217, 2001.
- Bhatia, M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Drug Targets – Infl Allergy**, 1: 343-51, 2002.
- Bone, R.C., et al. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, 112: 235–243, 1997.
- Bozza, F.A., et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**, 11(2): R49, 2007.
- Brown, K.A., et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, 368: 157–169, 2006.
- Calkovska, A., et al. Exogenous Surfactant Administration by Asymmetric High-Frequency Jet Ventilation in Experimental Respiratory Distress Syndrome. **Croat Med J**, 46(2): 209-217, 2005.
- Campos, H.S., et al. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Braz J Med Biol Res**, 39 (2): 283-87, 2006.
- Cepkova, M., Matthay, M.A. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **J Intensive Care Med**, 21(3):119-43, 2006.
- Chao, M.C., et al. Degree of endothelium injury promotes fibroelastogenesis in experimental acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, 30:173(2): 179-88, 2010.
- Chollet-Martin, S. Polymorphonuclear neutrophil activation during the acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, 26(10): 1575-7, 2000.
- Christmann, U., et al. Role of lung surfactant in respiratory disease: current knowledge in large animal medicine. **J Vet Intern Med**, 23: 227-42, 2009.
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420: 885-91, 2002.
- Colvero, M.O., et al. Bronchoalveolar Lavage plus Surfactant in a Piglet Model of Meconium Aspiration Syndrome. **Neonatology**, 93: 188–192, 2008.
- Cooke, C.R., et al. A simple clinical predictive index for objective estimates of mortality in acute lung injury. **Crit Care Med**, 37(6): 1913-20, 2009.
- Cordingley, J.J., Keogh, B.F. The pulmonary physician in critical care. 8: ventilatory management of ALI/ARDS. **Thorax**, 57: 729-734, 2002.

- Correa, F.C., et al. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. **J Appl Physiol**, 91(2): 803-10, 2001.
- Cryer, H.G. Advances in the understanding of multiple organ failure. **Surg Infect**, 1: 165–170, 2000.
- Davidson, W.J., et al. Exogenous pulmonary surfactant for the treatment of adult patients with acute respiratory distress syndrome: results of a meta-analysis. **Crit Care**,10(2): R4, 2006.
- DERDAK, S., et al. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. **Am J Respir Crit Care Med**, 15, 166(6): 801-8, 2002.
- Dos Santos, C.C. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. **Intensive Care Med**, 34(4): 619-30, 2008.
- Dos Santos, C.C., Slutsky, A.S. Mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. **J Appl Physiol**, 89: 1645–1655, 2000.
- Dreyer, N., et al. Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. **Respiratory Research**, 9(5), 2008.
- Eijking, E.P., et al. Surfactant Treatment of respiratory Failure Induced by Hydrochloric Acid Aspiration in Rats. **Anesthesiology**, 78(6): 1145-1151, 1993.
- Engle, W. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. **Pediatrics**, 121: 419–32, 2008.
- Farias, L.L., et al. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. **J Appl Physiol**, 98: 53-61, 2005.
- Findlay, R.D., et al. Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. **Pediatrics**, 97: 48–52, 1996.
- Frank, A.J., Thompson, B.T. Pharmacological treatments for acute respiratory distress syndrome. **Curr Opin Crit Care**, 16(1): 62-8, 2010.
- Frerking, I., et al. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. **Intensive Care Med**, 27: 1699-1717, 2001.
- Friedman, G., Silva, E., Vincent, J.L. Has the mortality of septic shock changed with time?. **Crit Care Med**, 26: 2078-2086, 1998.
- Fujishima, S., et al. Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients. **Biomed Pharmacother**, 62: 333–38, 2008.
- Fujiwara, T., et al. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. **Lancet**, 1: 55-9, 1980.
- Garcia, C.S., et al. Pulmonary morphofunctional effects of mechanical ventilation with high inspiratory air flow. **Crit Care Med**, 36(1): 232-9, 2008.

- Gattinoni, L., et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. **N Engl J Med**, 345: 568-573, 2001.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, 119: 493-501, 1992.
- Gilliard, N., et al. Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. **J Clin Invest**, 93(6): 2608-15, 1994.
- Grasso, S., et al. Mechanical ventilation may contribute to the development of MSOF (Abstract). **Am J Respir Crit Care Med**, 161: A212, 2000.
- Gregory, T.J., et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, 88: 1976-81, 1991.
- Gregory, T.J. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 155: 1309-1315, 1997.
- Gribar, S.C., et al. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. **J Leukoc Biol**, 83: 493–498, 2008.
- Günther, A., et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. **Respir Res**, 2: 353-364, 2001.
- Günther, A., et al. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on biophysical and biochemical surfactant properties. **Eur Respir J**, 10: 797–804, 2002.
- Haistsma, J.J., Papadakos, P.J., Lachmann, B. Surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Curr Opin Crit Care**, 10: 18-22, 2004.
- Harter, L., et al. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. **Shock**, 22: 403–409, 2004.
- Hermon, M.M., et al. Surfactant therapy in infants and children: three years experience in a pediatric intensive care unit. **Shock**, 17: 247–51, 2002.
- Herting, E., et al. Surfactant improves oxygenation in infants and children with pneumonia and acute respiratory distress syndrome. **Acta Paediatr**, 91: 1174–8, 2002.
- Hilgendorff, A. Surfactant replacement and open lung concept – Comparison of two treatment strategies in an experimental model of neonatal ARDS. **BMC Pulmonary Medicine**, 8(10): 1-13, 2008.
- Ince, C., Sinaasappel, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. **Crit Care Med**, 27: 1369–1377, 1999.
- Ingenito, E.P., Mark, L., Davison, B. Effects of acute lung injury on dynamic tissue properties. **J Appl Physiol**, 77: 2689-97, 1994.
- Jobe, A.H. Drug therapy: pulmonary surfactant therapy. **New Eng J Med**, 328(12): 861-68, 1993.

Khammash, H., et al. Surfactant therapy in full-term neonates with severe respiratory failure. **Pediatrics**, 92: 135–9, 1993.

Kochi, T., et al. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol**, 64: 2636-46, 1988.

Kochi, T., et al. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, 64: 441-50, 1988.

Kuwahara, I., et al. Neutrophil elastase stimulates MUC1 gene expression through increased Sp1 binding to the MUC1 promoter. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 289: 355-62, 2005.

Leite-Junior, J.H., et al. Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice. **Crit Care Med**, 36(9): 2621-8, 2008.

Lewis, J.F., Veldhuizen, R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. **Annu Rev Physiol**, 65: 613-642, 2003.

Li, X., et al. Apoptosis in lung injury and remodeling. **J Appl Physiol**, 97(4): 1535-1542, 2004.

Lima, L.M., et al. Synthesis and Anti-inflammatory activity of phtalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorg Med Chem**, 10: 3067-73, 2002.

Lima, L.M., de Lima, N.M. Contribuições do LASSBio[®] no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Rev Virtual Quim**, 1(1): 35-48, 2009.

Lin, C.Y., et al. Mechanical ventilation may increase susceptibility to the development of bacteremia. **Crit Care Med**, 31(5): 1429-34, 2003.

Lopez-Herce, J., et al. Surfactant treatment for acute respiratory distress syndrome. **Arch Dis Child**, 80: 248–52, 1999.

Lotze, A., et al. Improved pulmonary outcome after exogenous surfactant therapy for respiratory failure in term infants requiring extracorporeal membrane oxygenation. **J Pediatr**, 122: 261–8, 1993.

Luchetti, M., et al. Porcine-derived surfactant treatment of severe bronchiolitis. **Acta Anaesthesiol Scand**, 42: 805–10, 1998.

Malloy, J., et al. Alterations of the endogenous surfactant system in septic adult rats. **Am J Respir Crit Care Med**, 156: 617-23, 1997.

Marshall, J.C., et al. Preclinical models of shock and sepsis: what can their tells us? **Shock**, 24: 1-6, 2005.

Martin, C.M., et al. Characteristics and outcomes for critically ill patients with prolonged intensive care unit stays. **Crit Care Med**, 33: 1922–1927, 2005.

- Martin, G.S., et al. Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, 348: 1546-1554, 2003.
- Martin, T.R., Nakamura, M., Matute-Bello, G. The role of apoptosis in acute lung injury. **Crit Care Med**, 31: 184-188, 2003.
- Menezes, S.L., et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **J Appl Physiol**, 98(5): 1777-83, 2005.
- Milberg, J.A., et al. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. **JAMA**, 273: 306-9, 1995.
- Mira, J.P., et al. Association of TNF2, a TNF- promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **JAMA**, 282: 561-568, 1999.
- Mizock, B.A. The Multiple Organ Dysfunction Syndrome. **Dis Mon**, 55: 476-526, 2009.
- Montes, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biol Intern**, 20: 15-27, 1996.
- Moraes, T.J., et al. Proteases and lung injury. **Crit Care Med**, 31(4 Suppl): S189-94, 2003.
- Morard, M., et al. Therapeutic potential of a new TNF-alpha modulator and phosphodiesterases inhibitor on pulmonary ischemia-reperfusion injury. **Rev Port Pneumol**, 12(6 suppl 1): 27-8, 2006.
- Pássaro, C.P., et al. Pulmonary lesion induced by low and high positive end-expiratory pressure levels during protective ventilation in experimental acute lung injury. **Crit Care Med**, 37(3): 1011-7, 2009.
- Pelosi, P., et al. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **Eur Respir J**, 22(Suppl 42): 48s-56s, 2003.
- Pelosi, P., et al. Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: an experimental study. **Am J Respir Crit Care Med**, 164(1): 131-40, 2001.
- Phua, J., et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. **Am J Respir Crit Care Med**, 179(3): 220-227, 2009.
- Puneet, P., Moochhala, S., Bhatia, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 288: 3-15, 2005.
- Raghavendran, K., et al. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Curr Med Chem**, 15(19): 1911-1924, 2008.
- Randhawa, R & Bellingan, G. Acute lung injury. **Anaest Int Car Med**, 477-480, 2007.
- Ranieri, V.M., et al. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. **JAMA**, 284:43-44, 2000.

- Rasaiah, V.P.A., et al. Early surfactant administration protects against lung dysfunction in a mouse model of ARDS. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 284: L783–L790, 2003.
- Remick, D.G., et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, 13: 110-116, 2000.
- Rittirsch, D., et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, 4: 31-36, 2009.
- Riva, D.R., et al. Recruitment maneuver in pulmonary and extrapulmonary experimental acute lung injury. **Crit Care Med**, 36(6): 1900-8, 2008.
- Rocco, P.R., et al. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, 12,143(1): 49-61, 2004.
- Rocco, P.R., Pelosi, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality?. **Curr Opin Crit Care**, 14(1): 50-5, 2008.
- Rocco, P.R., Zin, W.A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? **Curr Opin Crit Care**, 11: 10-7, 2005.
- Rocco, P.R.M., et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **Eur Respir J**, 22: 20-7, 2003.
- Rocco, P.R.M., et al. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Rev Virtual Quim**, 1(4): 1-17, 2009.
- Rocco, P.R., et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 164(6): 1067-71, 2001.
- Saldiva, P.H., et al. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J Appl Physiol**, 72: 302-306, 1992.
- Sandrock, C.E., Albertson, T.E. Controversies in the treatment of sepsis. **Semin Respir Crit Care Med**, 31(1): 66-78, 2010.
- Schumann, R.R., et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**, 249: 1429–1431, 1990.
- Sevransky, J.E., et al. Pulmonary vs Non-pulmonary sepsis and mortality in acute lung injury. **Chest**, 134: 534-38, 2008.
- Sevransky, J.E., et al. Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. **Crit Care**, 13: 1-6, 2009.
- Silva, E., et al. Surviving Sepsis Campaign: a project to change sepsis trajectory. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, 6: 217-222, 2006.
- Silva, E., et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study: Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, 8: 251-260, 2004.
- Silva, J.D., et al. Terapia com surfactante na síndrome do desconforto respiratório agudo: prós e contras. **Pulmão RJ**, 18(3): 148-154, 2009.

Similowski, T., et al. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J Appl Physiol**, 67: 2219-2229, 1989.

Slee, E.A., et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J Cell Biol**, 144: 281-292, 1999.

Slutsky, A.S. Lung injury caused by mechanical ventilation. **Chest**, 116: 9S–15S, 1999.

Slutsky, A.S., Tremblay, L.N. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? **Am J Respir Crit Care Med**, 157: 1721–1725, 1998.

Spragg, R.G., et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. **Am J Respir Crit Care Med**, 167: 1562-1566, 2003.

Steinberg, K.P., et al. Safety of bronchoalveolar lavage in patients with adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, 148(3): 556-61, 1993.

Strieter, R.M., Belperio, J.A., Keane, M.P. Cytoquines in innate host defense in the lung. **J Clin Invest**, 109(6): 699-705, 2002.

Strohmaier, W. Bilateral lavage with diluted surfactant improves lung function after unilateral lung contusion in pigs. **Crit Care Med**, 33(10), 2005.

Sylenki, L., et al. Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation. **Critical Care Medicine**, 35(3): 842-48, 2007.

Teles, J.M., et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**. 30, (Suppl 1): 47-52, 2008.

Tsujimoto, H., et al. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock**, 29: 315–321, 2008.

Uhal, B.D. Apoptosis in lung fibrosis and repair. **Chest**, 122: 293-298, 2002.

Walmrath, D., et al. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, 154: 57–62, 1996.

Ware, M., Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 342: 1334-49, 2000.

Warren, J.D., et al. Exogenous pulmonary surfactant for the treatment of adult patients with acute respiratory distress syndrome: results of a meta-analysis. **Critical Care**, 10(2): 1-11, 2006.

Weibel, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. Models of lung disease-microscopy and structural methods, **Marcel Dekker**, New York, 199–247, 1990.

Wijisman, J.H., et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. **J Histochem Cytochem**, 41: 7-12, 1993.

Willson, D.F., et al. Calf lung surfactant extract in acute hypoxemic respiratory failure in children. **Crit Care Med**, 24: 1316–22, 1996.

Willson, D.F., et al. Effect of exogenous surfactan (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. **JAMA**, 293: 470–6, 2005.

Wirtz, H.R., Dobbs, L.G. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. **Science**, 250: 1266–69, 1990.

Wiswell, T.E., et al. Bronchopulmonary segmental lavagewith Surfaxin (KL(4) - surfactant) for acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 160: 1188–95, 1999.

Witchterman, K.A., Baue, A.E., Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, 29: 189-20, 1980.

Xisto, D.G., et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, 171(8): 829-37, 2005.

Zar, J.H. Biostatistical analysis. 3th ed, Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, 282p, 1996.

Zuo, Y.Y., et al. Current perspectives in pulmonary surfactant – inhibition, enhancement and evaluation. **Bioch et Bioph Acta**, 1778: 1947-77, 2008.

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](#)