

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Abordagens Farmacológicas e Modelos  
Animais para a Lesão Aguda do Pulmão e  
Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda**

João Mário de Vasconcelos Guarino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Prof. Doutor João Pedro Fidalgo Rocha

2015

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Abordagens Farmacológicas e Modelos  
Animais para a Lesão Aguda do Pulmão e  
Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda**

João Mário de Vasconcelos Guarino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Farmacêuticas

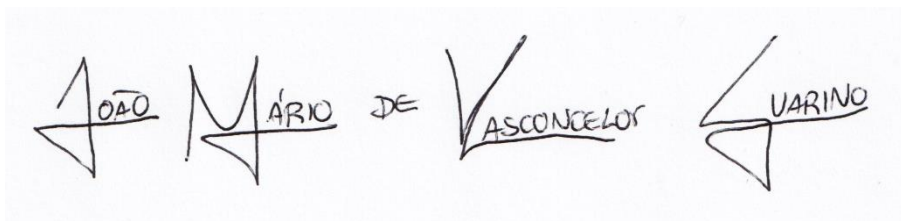
Trabalho efetuado sob a orientação do Prof. Doutor João Pedro Fidalgo Rocha

2015

# Abordagens Farmacológicas e Modelos Animais para a Lesão Aguda do Pulmão e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

## Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

A photograph of a handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature reads 'JOÃO MÁRIO DE VASCONCELOS GUARINO'. The letters are stylized and connected, with a large 'J' for 'JOÃO' and a large 'M' for 'MÁRIO'. The word 'GUARINO' is written at the end of the signature.

*Copyright* João Mário de Vasconcelos Guarino

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

## Dedicatória e Agradecimentos

Representando este trabalho o culminar de um percurso de cinco anos, é minha firme intenção imortalizar neste espaço algumas palavras para as pessoas que mais contribuíram para que este momento chegasse.

Em primeiro lugar, expresso a minha homenagem à minha família, representada pela figura dos meus pais e da minha irmã, que foram os grandes responsáveis pela pessoa que me tornei, tendo-me moldado, não só em termos de valores como também de personalidade, vertentes essas das quais me orgulho e que sempre vi sobressaírem nas alturas da minha afirmação enquanto homem.

Depois, aos meus amigos “alverquenses”, que me acompanharam ao longo dos estudos e que me receberam de braços abertos após cinco anos de uma ausência quase permanente, e que mantêm um companheirismo e uma boa-disposição contagiantes, que pretendo levar comigo para qualquer lugar onde vá.

Aos meus colegas de curso, em particular aos da minha turma, que me proporcionaram momentos inesquecíveis nesta longa jornada e que sempre prezaram por um sentido de união que desde cedo me fascinou. De cada um de vós, sem exceção, extraí algo que pretendo aplicar no meu percurso pessoal e profissional, e que o sentimento de “família” que fomos cultivando crie raízes que nos permitam observar o crescimento de cada um de nós daqui para a frente.

Ao Professor Doutor João Rocha, que prontamente se disponibilizou para ajudar a sustentar esta dissertação, sendo para mim um exemplo a nível da conjugação da responsabilidade inerente à docência com a extroversão e camaradagem fora do contexto de sala de aula.

A todos os professores com quem tive o privilégio de trabalhar, pois sempre exerceram um papel de “segundos pais” e que, através da sua exigência e pedagogia, acabam por construir uma base que suportará o percurso de qualquer aluno (desde o momento em que o ensinam a ler até, por exemplo, à orientação de uma dissertação de mestrado), facto que, injustamente, não é, na maior parte dos casos, reconhecido pela sociedade contemporânea.

Às equipas de trabalho da Farmácia Oceano, do Centro Hospitalar Tondela-Viseu, dos Laboratórios Joaquim Chaves, do Hospital da Luz e da Farmácia Aguiar, por me terem disponibilizado a oportunidade de me preparar mais precocemente para o setor farmacêutico.

Por último, mas não menos importante, à Olga, que me ensinou o que ninguém tinha conseguido até então: o que é amar e ser amado intensa e incondicionalmente, sendo sempre a minha fiel companheira ao longo do curso e a pessoa que, simultaneamente, mais me apoiou, festejando comigo as minhas conquistas ou erguendo-me quando um obstáculo me levava a melhor. Parte deste trabalho também é teu, pois a tua inteligência e capacidade de trabalho serviram de inspiração e de motivação para enfrentar as vicissitudes com que me fui deparando. Infelizmente, as nossas vidas seguem agora caminhos distintos, mas é minha esperança que um dia eles se voltem a encontrar, e que possa, mais uma vez, demonstrar o meu apreço por teres entrado na minha vida.

## Resumo

O Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (SDRA) é uma ocorrência clínica que pode resultar de uma lesão pulmonar direta ou indireta, possuindo elevadas taxas de mortalidade e morbidade. Uma melhor consciencialização dos mecanismos patofisiológicos envolvidos nas diferentes fases da doença tem estimulado a comunidade científica a detetar novos alvos passíveis da instalação de uma terapêutica e a aplicação subsequente de fármacos ou medidas não farmacológicas que possam diminuir os graves índices epidemiológicos a SDRA. No entanto, até à data, apenas a evolução dos cuidados paliativos e uma ventilação mecânica eficaz demonstraram reduzir a mortalidade em pacientes com SDRA. Não obstante, terapêuticas envolvendo surfactante, monóxido de azoto, corticosteroides e células estaminais surgem como alternativas promissoras com vista a impedir a progressão da doença.

O recurso a modelos animais cujas informações possam ser translocadas para a prática clínica tem sido uma das prioridades dos investigadores no campo da SDRA. Apesar das suas divergências (anatômicas e fisiológicas), em relação aos humanos, o rato é das espécies mais utilizadas para testar intervenções farmacológicas a nível da SDRA. Como tal, o desenvolvimento de modelos de rato que permitam estudar este tipo de intervenções, com a correspondente evidência verificada nos humanos, pode constituir um fator preponderante para terapêuticas que diminuam a mortalidade causada pela SDRA.

Consequentemente, com este trabalho pretende-se incidir sobre duas vertentes: (i) elucidar que mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da SDRA, intersectando essa informação com as terapêuticas existentes atualmente e (ii) abordar os modelos animais de SDRA que estão atualmente descritos para, com espírito crítico, tentar delinear as perspetivas futuras com vista a uma melhor aproximação do quadro de lesão pulmonar verificado nos humanos e, por extrapolação, à instalação de terapêuticas mais eficazes para diminuir os (ainda) graves sequelas da SDRA.

Termos-chave: *Sistema respiratório, inflamação, imunidade, terapêutica farmacológica, modelos animais, rato*

## Abstract

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a clinical situation that might be caused by a direct or indirect lesion of the lung and that has a high mortality and morbidity rate. A better awareness regarding the pathophysiologic mechanisms involved in the different stages of this disease has stimulated the scientific community to detect new targets that might be suitable for a therapeutic intervention and therefore the appliance of drugs or non-pharmacologic procedures that can help diminish the ARDS' serious epidemiologic indexes. However, until now, only the evolution regarding the palliative care and an efficient mechanical ventilation have shown capable of reducing mortality in ARDS patients. Despite that fact, therapies involving surfactant, nitric oxide, corticosteroids and stem cells rise as promising alternatives towards stopping the progression of this disease.

Turning to animal models, whose information can be translocated to the clinical practice, has been one of the researchers' priorities in ARDS investigation. Despite all the differences (anatomic and physiologic) with humans, the mouse is one of the most used species in testing pharmacologic strategies towards ARDS. Therefore, the development of models using mice that allow the study of this type of interventions (with the corresponding evidence assessed in humans) might be an important factor towards finding therapies that can reduce mortality caused by ARDS.

Consequently, with this work it's supposed to focus on two aspects: (i) elucidate which mechanisms are involved in the development of ARDS, intersecting that information with the current therapies and (ii) approach in a critical way the actual ARDS' animal models, to try to delineate the future directions towards a better intersection with the clinical data described in humans and, by extrapolation, towards the implementation of more effective treatments to reduce the (still) serious outcomes of ARDS.

Keywords: *Respiratory system, inflammation, immunity, pharmacologic therapies, animal models, mouse*

## Conteúdo

<b>Dedicatória e Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Índice de Tabelas</b> .....	x
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xi
<b>1. Anatomia e Fisiologia Pulmonar</b> .....	1
<b>2. Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (LAP/SDRA)</b> .....	5
2.1. Contextualização Histórica e Definição .....	5
2.2. Dados epidemiológicos .....	8
2.2.1. Fatores de Risco .....	9
2.3. Etiologia .....	11
2.4. Mecanismos fisiopatológicos .....	13
2.4.1. Lesão endotelial e epitelial .....	16
2.4.2. Inflamação desregulada .....	17
2.4.3. Ativação da cascata da coagulação .....	30
2.5. Consequências fisiopatológicas .....	33
2.5.1. Qualidade de vida .....	33
2.5.2. Consequências físicas .....	34
2.5.3. Consequências neurológicas .....	34
2.6. Resolução da LAP/SDRA .....	35
<b>3. Terapêutica da LAP/SDRA</b> .....	38
3.1. Abordagem Não-Farmacológica .....	38
3.1.1. Ventilação mecânica .....	38
3.1.2. Decúbito ventral .....	40
3.1.3. Oxigenoterapia .....	41
3.2. Abordagens Farmacológicas .....	42
3.2.1. Surfactante .....	42
3.2.2. Vasodilatadores inalados .....	43

3.2.3.	Vasodilatadores sistémicos .....	46
3.2.4.	Fármacos anti-inflamatórios .....	46
3.2.5.	Fármacos antioxidantes.....	52
3.3.	Novas perspetivas da terapêutica da LAP/SDRA .....	54
3.3.1.	Anticoagulação .....	54
3.3.2.	Agonistas $\beta_2$ .....	55
3.3.3.	Fator de crescimento dos queratinócitos .....	55
3.3.4.	Células estaminais .....	56
<b>4.</b>	<b>Modelos Animais para o estudo da LAP/SDRA .....</b>	<b>61</b>
4.1.	Características diferenciadoras das espécies animais na mimetização experimental da LAP .....	64
4.2.	Tipos de modelos para o estudo da LAP/SDRA .....	65
4.2.1.	Modelos que privilegiam o endotélio capilar .....	66
4.2.2.	Modelos que privilegiam o epitélio alveolar .....	67
4.2.3.	Modelos de lesão pulmonar por sépsis.....	71
4.3.	O ratinho como modelo animal para o estudo da lesão pulmonar aguda e do síndrome de depressão respiratória aguda.....	75
4.4.	Perspetivas futuras .....	79
<b>5.</b>	<b>Temas emergentes e perspetivas futuras.....</b>	<b>83</b>
5.1.	Biomarcadores de LAP/SDRA.....	83
5.2.	Interação entre elasticidade e imunidade inata.....	85
5.3.	O epitélio alveolar na LAPs .....	86
5.4.	TGF- $\beta$ como mediador-chave da LAP.....	87
5.5.	Compreensão de fatores de risco específicos para a LAP .....	87
5.6.	Células estaminais na LAP.....	88
5.7.	Resolução da LAP .....	89
5.8.	Vírus e LAP .....	89
5.9.	LAP em pediatria.....	90
<b>6.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>93</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1. – Estrutura do aparelho respiratório humano.....	1
Figura 1.2. – Estrutura anatômica do pulmão humano.....	4
Figura 2.1. – Incidência (por fator de risco e por faixa etária) e mortalidade (por faixa etária) de Lesão Aguda do Pulmão.....	10
Figura 2.2. – Progressão de um quadro de SDRA para falência múltipla de órgãos.....	14
Figura 2.3. – Patologia da LAP em humanos.....	15
Figura 2.4. – Disrupção da barreira alvéolo-capilar e sua relação com as ligações entre caderinas endotélio-vasculares.....	17
Figura 2.5. – Evolução do processo de recrutamento e ativação dos neutrófilos na lesão aguda do pulmão.....	22
Figura 2.6. – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....	27
Figura 2.7. – Fenómenos da ativação da proteína C no processo de coagulação.....	31
Figura 2.8. – Processo de resolução da Lesão Pulmonar Aguda.....	37
Figura 3.1. – Função do cortisol e das citocinas pró e anti-inflamatórias na imunidade humana.....	49
Figura 3.2. – Potencial terapêutico das células estaminais mesenquimatosas e o seu efeito parácrino na lesão aguda do pulmão.....	59

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1. – Definição de LAP e SDRA segundo a AECC.....	6
Tabela 2.2 – A definição de Berlim para a LAP/SDRA.....	8
Tabela 2.3. – Principais causas de LAP/SDRA em Portugal, em comparação com um estudo europeu (ALIVE).....	12
Tabela 2.4. – Fisiopatologia do Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.....	32
Tabela 3.1. – Componentes da <i>tissue host defense response</i> .....	47
Tabela 3.2. – Agentes farmacológicos estudados como possível tratamento para a lesão pulmonar aguda e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.....	60
Tabela 4.1. – Manifestações da lesão pulmonar em humanos.....	62
Tabela 4.2. – Características de diferentes espécies animais relevantes para o estudo da lesão pulmonar aguda.....	65
Tabela 4.3. – Modelos animais de Lesão Aguda do Pulmão.....	73
Tabela 4.4. – Vantagens e limitações do ratinho enquanto modelo animal preferencial para o estudo da LAP/SDRA.....	77
Tabela 4.5. – Comparação entre os pulmões do ratinho e os humanos.....	78
Tabela 4.6. – Parâmetros respiratórios em ratinhos e humanos.....	79
Tabela 5.1. – Biomarcadores passíveis de serem medidos num ensaio clínico.....	85

## Lista de Abreviaturas

AECC – *American-European Consensus Conference*

ANG-2 – Angiopietina 2

APC – Proteína C ativada

BNP – Péptido natriurético cerebral

bpm – respirações por minuto

CFU – Unidades formadoras de colónia

CIM – Miopatia derivada de doença aguda

CIP – Polineuropatia derivada de doença aguda

CSDR – Recetores superficiais de morte celular

DAMP – Padrões moleculares associados ao perigo

ECS – Células estaminais embrionárias

EPC – Células progenitoras endoteliais

FBA – Fluido broncoalveolar

FDA – *Food and Drug Administration*

FiO<sub>2</sub> – Fração de oxigénio parcial

G-CSF – Fator estimulador de colónias dos granulócitos

GM-CSF – Fator estimulador de colónias dos macrófagos

GRO – Oncogene regulador do crescimento

GR- $\alpha$  – Recetor alfa dos glucocorticoides

HDR – *Tissue host defense response*

ICAM – Molécula de adesão intercelular

IL – Interleucina

IP - Intraperitoneal

IV - Intravenoso

JMIP – Jornadas de Medicina Intensiva de Primavera

KGF – Fator de crescimento dos queratinócitos

KL-6 – Antígeno Kerbs von Lungren 6

LAP – Lesão Aguda do Pulmão

LBP – Proteína de ligação do LPS

LDH – Lactato desidrogenase

LL-37 – Catelicidina humana

LPMN – Leucócitos polimorfonucleares

LPS – Lipopolissacárido

MCS – Células estromais mesenquimatosas

MIP – Proteína inibidora do macrófago

MMP – Metaloproteinases

MNP – migração dos neutrófilos no pulmão

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NE – elastase do neutrófilo

NF- $\kappa$ B – Recetor nuclear para a transcrição das proteínas de adesão

NHLBI – *National Heart Lung and Blood Institute*

NOS – Espécies reativas de azoto

PAF – fator de ativação das plaquetas

PAI-I – Inibidor da ativação do plasminogénio

PAMP – Padrões microbianos associados à patogeneidade

PaO<sub>2</sub> – Pressão parcial de oxigénio arterial

PEEP – Pressão expiratória final positiva

PIM – Macrófagos intravasculares pulmonares

PSGL-1 – Ligando glicoproteico da P-selectina

RAGE – imunoglobulina transmembranar

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SDRA – Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

SIRS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

SOD – Superóxido dismutase

SP – Proteínas surfactantes

TDSC – Células estaminais derivadas do tecido adulto

TFPi – Inibidor do fator tecidual

TGF- $\beta$  – Fator de transformação do crescimento beta

TLR – Recetores *Toll-like*

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TRAIL – *TNF related apoptosis inducing ligand*

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

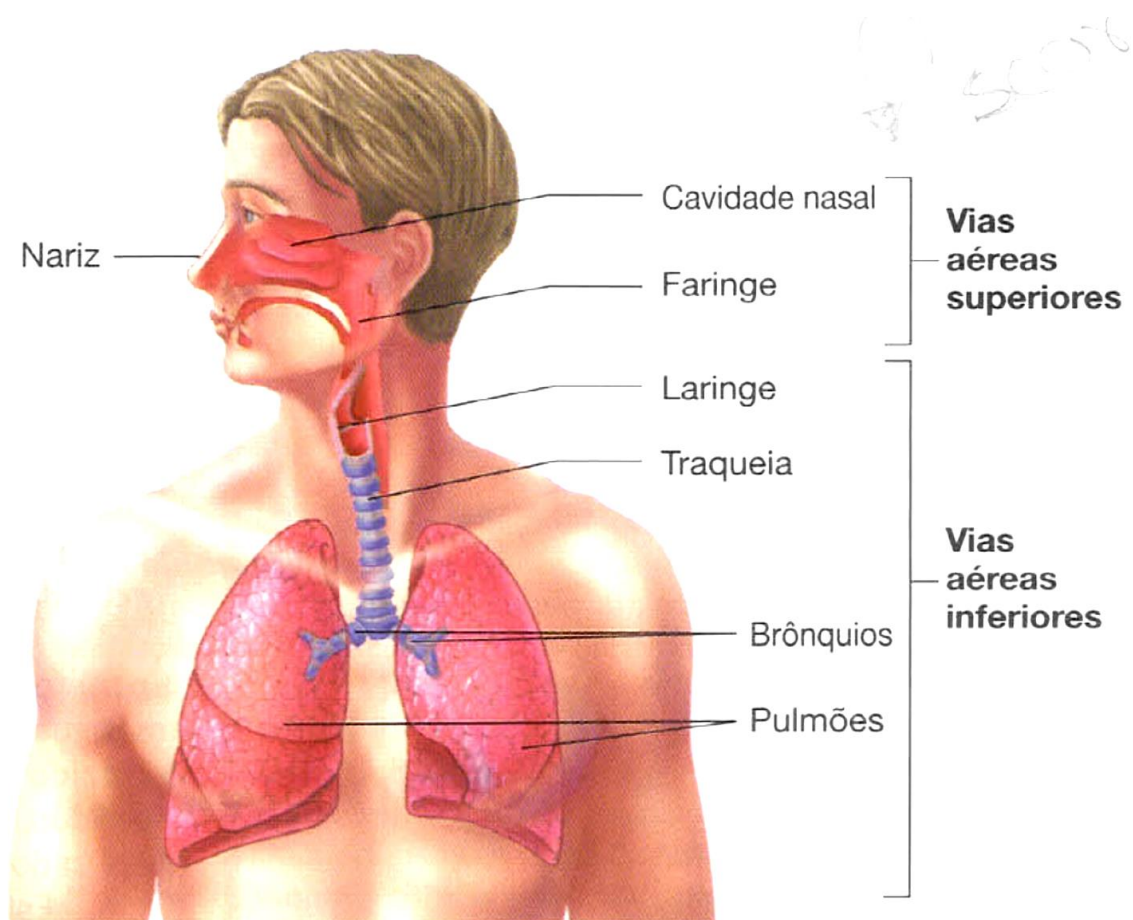
VE-caderina – caderina endotelial da v

VCAM – Caderina vascular endotelial

vWf – Fator de von Wildebrand

## 1. Anatomia e Fisiologia Pulmonar

O aparelho respiratório integra diversas estruturas anatômicas: fossas nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e pulmões, sendo que é comum haver uma divisão em vias aéreas superiores (fossas nasais e faringe) e inferiores (desde a laringe até aos pulmões).



**Figura 1.1. – Estrutura do aparelho respiratório humano (adaptado de(1))**

A traqueia é um tubo membranoso, com cerca de 12 milímetros de diâmetro interno e entre 10 a 12 centímetros de comprimento. Está revestida por uma mucosa constituída por epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, cílios esses que ajudam à propulsão de partículas para o exterior das vias aéreas, constituindo um mecanismo de defesa contra agressões externas e internas, já que também ajudam a expulsar o muco

produzido pelas células do aparelho respiratório. Ao nível da quinta vértebra torácica, bifurca-se nos brônquios principais, que estão separados pela carina (cartilagem que constitui um ponto de referência radiológico importante).

Os brônquios principais, por sua vez, ramificam-se em brônquios de calibre cada vez menor, constituindo a árvore traqueobrônquica.

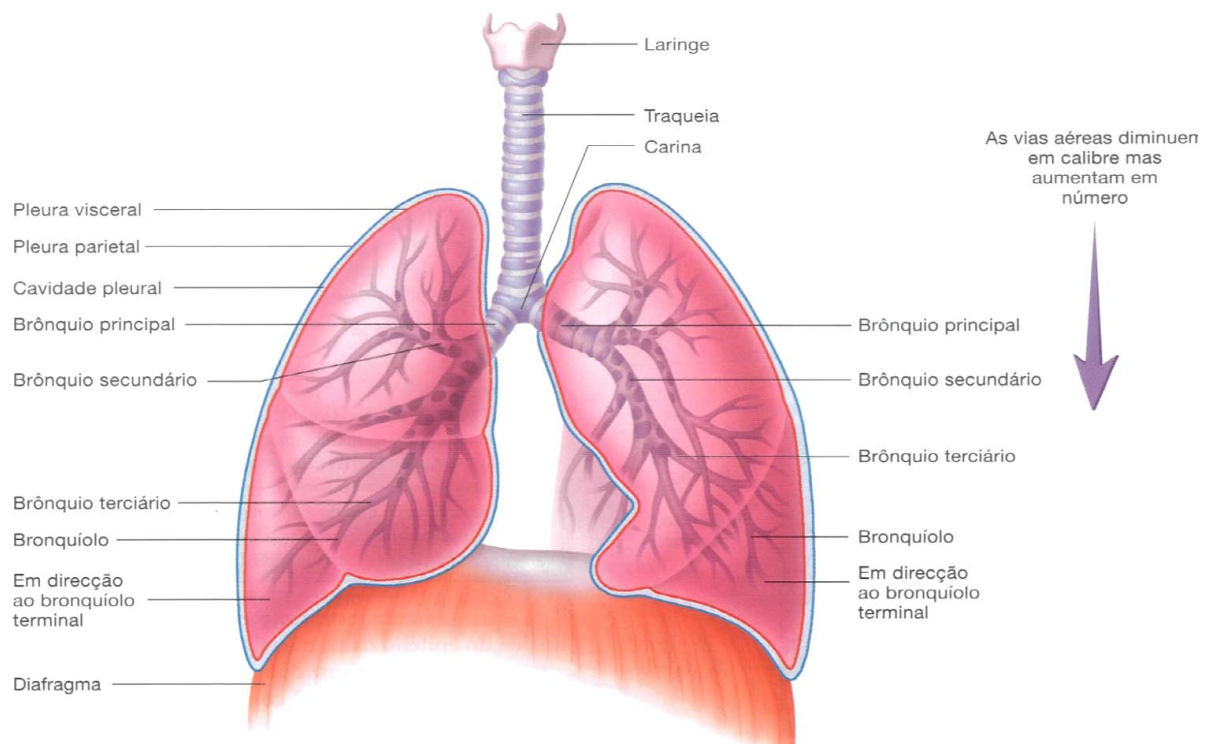
Podemos dividir a árvore traqueobrônquica em duas porções:

- (i) Porção condutora (ou vias aéreas de condução), que se inicia na traqueia e termina nos bronquíolos terminais, sendo a sua função principal conduzir o ar de forma efetiva e, devido às características histológicas supracitadas, remover partículas que possam irritar a mucosa.
- (ii) Porção respiratória (ou vias aéreas de respiração), que engloba os bronquíolos terminais até aos alvéolos, onde ocorrem as trocas gasosas. Nesta zona, o epitélio pavimentoso simples não possui cílios. Como tal, a eliminação de partículas indesejáveis é levada a cabo por macrófagos, que se movimentam pela superfície das células.

Os pulmões são os principais órgãos da respiração e os mais volumosos do organismo (cerca de 200 m<sup>2</sup> e englobando cerca de 300 milhões de alvéolos), possuindo uma forma cônica de base inferior, apoiada no diafragma e são revestidos por uma membrana serosa: a pleura. O pulmão direito possui três lobos, enquanto que o esquerdo possui dois. Cada lobo é originário de um brônquio secundário, que depois se ramificam em brônquios terciários, cada um constituindo um lóbulo.

A complacência é uma medida da facilidade com que os pulmões e o tórax se expandem. Como tal, a complacência pulmonar traduz-se no aumento do volume pulmonar por cada unidade de mudança de pressão intraalveolar, sendo normalmente expressa em litros (volume de ar) por mmHg (unidade de pressão). Em condições de homeostasia, a complacência pulmonar de um indivíduo é de 0,18 L/mm Hg, isto é, por cada 1 mmHg de mudança na pressão intraalveolar, o volume ocupado pelos pulmões aumenta 0,18 L.. Portanto, uma diminuição da complacência pulmonar permite extrapolar que o processo de expansão dos pulmões e do tórax está dificultado, enquanto que, quanto maior o valor desta medida, mais fácil é o processo de expansão (o que pode não ser necessariamente benéfico, visto que, por exemplo, o enfisema, ao destruir as fibras elásticas do tecido pulmonar, diminui a resistência elástica dos pulmões, tornando a sua expansão mais simples).

A ventilação nos pulmões ocorre de forma desigual; estas variações dependem, basicamente, da postura adotada pelo indivíduo, ou seja, da ação da gravidade ou, também, de patologias pulmonares associadas que podem reduzir a capacidade de ventilação. Por exemplo: num indivíduo sem comprometimento pulmonar prévio, em posição ortostática, ocorrerá uma ventilação melhor nas bases do que nos ápices, pois o peso do pulmão reduz o tamanho da via neste ponto (diminuindo ainda mais a pressão intraalveolar). Desta forma, durante a inspiração ocorrerá maior variação de volume, tornando as bases mais ventiladas. Logo, as áreas dependentes da gravidade (aquelas que recebem maior ação da gravidade) são as com maior variação de volume e, portanto, mais ventiladas. Estas discrepâncias a nível de complacência vão influenciar não só a progressão de uma determinada patologia (pois, consoante as áreas afetadas forem dependentes ou não da gravidade, podem agravar o quadro clínico) e a própria terapêutica a ser instalada, conforme descrito posteriormente.



**Figura 1.2. – Estrutura anatómica do pulmão humano (adaptado de(1))**

Adicionalmente, as funções do aparelho respiratório estendem-se para além das trocas gasosas, intervindo também em processos como:

- (i) Controlo do pH do sangue (através da variação das concentrações de dióxido de carbono sanguíneo)
- (ii) Fonação (o ar que atravessa as cordas vocais é importante para a produção de sons)
- (iii) Olfato (As moléculas suspensas no ar atravessam as fossas nasais e interagem com recetores sensoriais)
- (iv) Proteção (O aparelho respiratório possui os seus próprios mecanismos de defesa e expulsão de partículas e microrganismos que estão presentes no ar)

## 2. Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (LAP/SDRA)

### 2.1. Contextualização Histórica e Definição

A primeira descrição científica da SDRA surge no século XIX, nomeadamente em 1821, onde Laennec reportou um fenómeno de edema pulmonar sem causas cardíacas. Este aspeto permaneceu indiferenciado durante mais de um século, na medida em que, durante esse tempo, não houve muita preocupação por parte da comunidade científica em distinguir edemas pulmonares de causa cardíaca daqueles em que esta causa não estava subjacente. (2)

Os primeiros dados relativos a uma definição de SDRA remontam à segunda metade do século XX, mais precisamente em 1967, onde Ashbaugh e seus colaboradores, num total de 272 pacientes, identificaram 12 que reuniam um padrão de *outcomes* que designaram por “Síndrome de Dificuldade Respiratória”: (i) dispneia e taquipneia grave, (ii) cianose refratária à oxigenoterapia e (iii) perda de complacência pulmonar e infiltração alveolar bilateral visível num raio-X torácico. (3) Três anos mais tarde, denominaram este quadro clínico de Síndrome de Dificuldade Respiratória no Adulto, visto que os dados clínicos e patológicos eram semelhantes aos verificados em crianças com dificuldades respiratórias.(4)

No entanto, rapidamente urgiu a necessidade de melhorar a definição e os critérios de diagnóstico. Em 1988, Murray liderou uma equipa que estabeleceu um sistema de pontuação inovador para o diagnóstico de LAP/SDRA. Fundamentalmente, o sistema incluía uma pontuação para o grau de hipoxemia, outra para a complacência pulmonar, outra para o resultado das radiografias e, por último, para o nível de pressão expiratória final positiva (PEEP, do inglês *positive end-expiratory pressure*). Cada uma destas vertentes recebia uma pontuação de 0 a 4, proporcional ao grau de severidade verificado, sendo que, no final, dividia-se a pontuação pelo valor total dos critérios analisados, em que um valor final de 0 correspondia à ausência de lesão pulmonar; valores entre 1 e 2,5 relatavam uma lesão pulmonar moderada, enquanto que valores superiores a 2,5 retratavam um quadro de LAP (5).

Mais tarde, em 1994, a *American-European Consensus Conference on ARDS* (AECC) estabeleceu uma nova definição de SDRA, sendo que o síndrome passou a ser designado de “agudo” em detrimento de “adulto” (uma vez que também está presente na população pediátrica). Mantiveram-se os critérios inicialmente descritos por Ashbaugh à exceção do nível de PEEP, que foi substituído por indicadores que comprovam a não existência de aumento na pressão da aurícula esquerda (pressão capilar pulmonar inferior a 19 mmHg). Simultaneamente, estabeleceu-se o critério da hipoxemia para distinguir LAP de SDRA: valores de pressão parcial de oxigênio arterial para uma fração de oxigênio parcial ( $PaO_2/FiO_2$ ) iguais ou inferiores a 300 enquadravam-se num quadro de LAP, enquanto que valores de  $PaO_2/FiO_2$  inferiores a 200 já se situavam num quadro de SDRA. (2,6) Na tabela 2.1. estão elucidados todos estes parâmetros.

**Tabela 2.1. Definição de LAP e SDRA segundo a AECC (adaptado de (2))**

<b>Lesão Aguda do Pulmão (LAP)</b>	<b>Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (SDRA)</b>
1. Instalação aguda	1. Instalação aguda
2. Presença de infiltrações bilaterais no raio-X torácico	2. Presença de infiltrações bilaterais no raio-X torácico
3. Pressão capilar pulmonar inferior a 19 mm Hg ou ausência de sinais indicativos de hipertensão pulmonar	3. Pressão capilar pulmonar inferior a 19 mm Hg ou ausência de sinais indicativos de hipertensão pulmonar
4. $PaO_2/FiO_2$ inferior a 300	4. $PaO_2/FiO_2$ inferior a 200

Poder-se-ia concluir que, após mais de 20 anos da realização desta conferência, a definição de LAP e de SDRA estaria, finalmente, estandardizada. No entanto, estudos relatam que a sensibilidade e especificidade da definição proposta pela AECC, quando confrontada com análises *post-mortem* de doentes com danos alveolares disseminados, estão longe de serem ótimas, sendo classificadas apenas como moderadas. (7).

Atualmente, o sistema de pontuação de Murray atua como complemento à definição proposta pela AECC (5), na medida em que, ao conter dados relativos à PEEP e à complacência pulmonar, ajuda na medição do grau de lesão pulmonar. Contudo, a principal limitação deste sistema de pontuação reside no facto de não excluir o edema pulmonar cardiogénico (7).

Mais recentemente, em 2011, ocorreu na cidade alemã de Berlim uma reunião que definiu um novo esboço em direcção a uma definição mais criteriosa de LAP/SDRA (consultar tabela 2.2.), dando origem à *Berlin ARDS definition*, que tem em conta quatro critérios: (i) o tempo de instalação da patologia (até 1 semana após uma agressão ou então a exacerbação/presença de novos sintomas de índole respiratório), (ii) a imagiologia torácica (opacidades bilaterais não totalmente explicadas por efusões, colapsos ou nódulos), (iii) a origem do edema (mantem-se o critério antigo da ausência de sintomas sugestivos de insuficiência cardíaca só que associa-se, de forma pioneira, um método analítico – ecocardiograma, por exemplo), e (iv) o grau de oxigenação (que vai determinar a classificação da LAP/SDRA em ligeira, moderada e severa). (8)

**Tabela 2.2. A definição de Berlim para a LAP/SDRA (adaptado de (8))**

<b>Critério</b>	<b>Descrição</b>
<b>Timing</b>	Até 1 semana após uma agressão ou então após exacerbação/presença de um novo sintoma de índole respiratório
<b>Imagiologia Torácica</b>	Opacidade bilateral comprovada por raio X torácico e/ou tomografia axial computadorizada, não totalmente explicada por efusões, colapsos lobar/pulmonar, ou nódulos
<b>Origem do edema</b>	Falha respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca; Necessita de um método complementar objetivo (por exemplo, ecocardiograma) para excluir edema hidrostático em casos em que não há presença de fatores de risco
<b>Oxigenação</b>	<b>SDRA ligeira</b> – $200 < PaO_2/FiO_2 \leq 300$ com PEEP ou CPAP $\geq 5$ cm H <sub>2</sub> O <b>SDRA moderada</b> – $100 < PaO_2/FiO_2 \leq 200$ com PEEP $\geq 5$ cm H <sub>2</sub> O <b>SDRA grave</b> – $PaO_2/FiO_2 \leq 100$ com PEEP $\geq 5$ cm H <sub>2</sub> O
Nota: CPAP: pressão respiratória positiva contínua, do inglês <i>continuous positive airway pressure</i>	

## 2.2. Dados epidemiológicos

Como em qualquer doença, estudos epidemiológicos associados à LAP/SDRA são fulcrais para uma melhor consciencialização da mesma e para diferenciar os mecanismos causais de possíveis associações não-causais. (9)

Caracterizar epidemiologicamente um síndrome considerado como raro não se afigura fácil, sendo que existem dois principais fatores que limitam estudos epidemiológicos nesta área: (i) a supracitada falta de sensibilidade e especificidade dos atuais métodos de diagnóstico e (ii) o facto deste tipo de doentes se encontrarem nos

Cuidados Intensivos, que constitui uma barreira para o acesso à informação por parte dos investigadores. Contudo, um conhecimento detalhado acerca da epidemiologia desta doença é essencial não só para afunilar futuras investigações na área da genética, como também para uma melhor perceção dos mecanismos patofisiológicos que a compõem (e, com isto, intervir nas sequelas que são provocadas a curto e longo prazo para uma redução da morbilidade). (9)

Simultaneamente, é difícil de separar os termos LAP e SDRA (correndo o risco de se tornar redundante) pois, como visto anteriormente, LAP engloba a SDRA, pelos que estudos epidemiológicos costumam surgir associando estes dois fenómenos. (9)

Num estudo publicado por Rubenfeld *et al.*, verificou-se que, nos Estados Unidos, existem 190 000 novos casos de LAP por ano. Relativamente à taxa de mortalidade, esta situa-se nos 35 a 40%, embora os doentes acabem por falecer mais das complicações inerentes aos próprios fatores de risco a que estão expostos do que propriamente devido a problemas respiratórios provocados pela sua condição. (9)

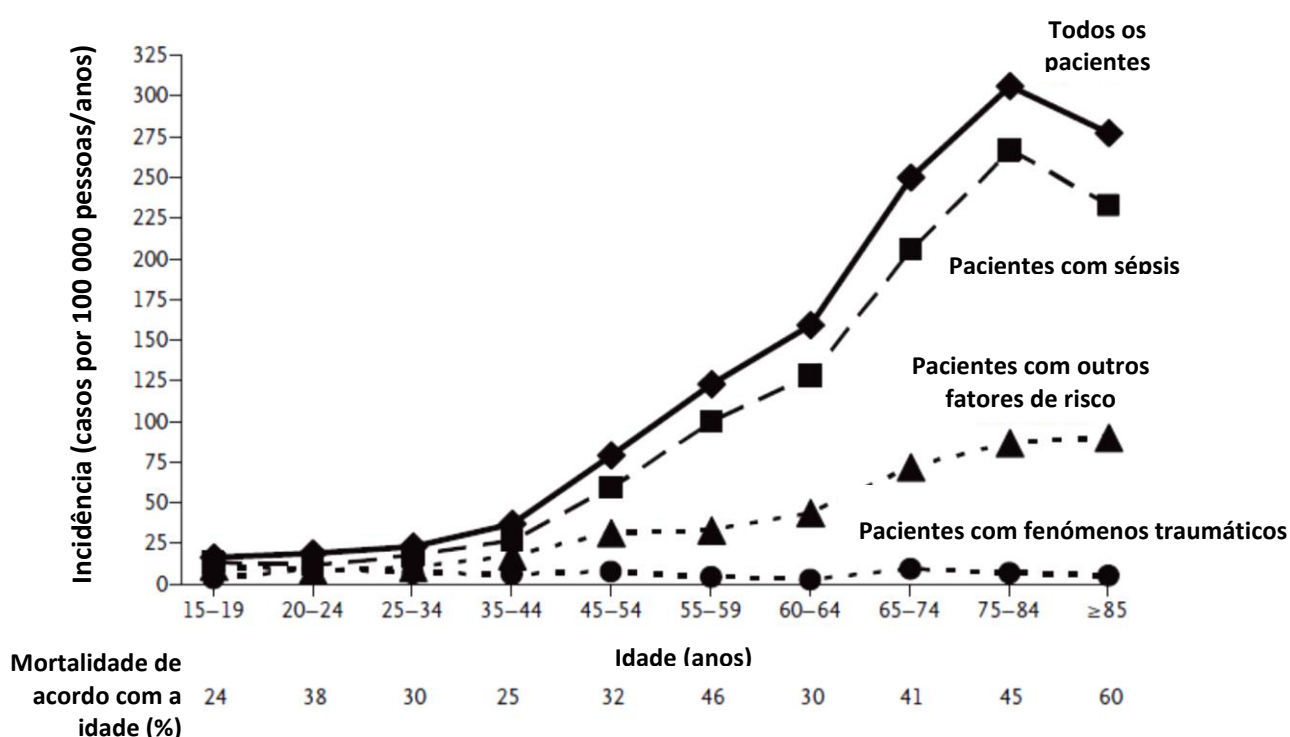
### 2.2.1. Fatores de Risco

O conhecimento dos fatores de risco permite atuar nas fases mais a montante do desenvolvimento de uma doença e impedir a sua progressão para quadros de consequências mais graves. Enquadrando este aspeto na LAP/SDRA, devido aos critérios de diagnóstico não serem os melhores, torna-se difícil de identificá-los, principalmente em pessoas que nem sequer chegam a desenvolver LAP. Aliado a isso, alguns aspetos que se têm vindo a observar a nível clínico permanecem no campo do desconhecido, destacando-se, por exemplo, o facto de não se conseguir explicar porque é que questões raciais e sexuais influenciam significativamente a taxa de mortalidade (almeja-se encontrar justificação para o facto de afro-americanos e homens terem taxas de mortalidade maiores. Será devido a fatores genéticos, de exposição e/ou da própria resposta à terapêutica?) (9)

A maior parte dos casos registados têm como fatores de risco um dos seguintes: sépsis com origem pulmonar, sépsis com origem não-pulmonar ou trauma. No entanto,

variados estudos epidemiológicos têm vindo a comparar características morfológicas e sociodemográficas e a respetiva influência na incidência e mortalidade. (10)

A idade é um fator bastante importante, na medida em que varia proporcionalmente quer com a incidência quer com a taxa de mortalidade. (10) Isto está relacionado com a suscetibilidade do indivíduo em desenvolver sépsis como resultado de um sistema imunitário cada vez mais deficiente. (9) Contudo, relativamente à incidência, é de ressaltar que algumas causas não constituem uma relação direta com a idade (ver figura 2.1.), como é o exemplo do trauma. (10)



**Figura 2.1. – Incidência (por fator de risco e por faixa etária) e mortalidade (por faixa etária) de Lesão Aguda do Pulmão (adaptado de (10))**

Mais, indivíduos com baixa massa corporal apresentam um maior risco do que indivíduos obesos. Este facto pode surgir como uma surpresa mas está sujeito a várias críticas: (i) a radiografia torácica de pessoas obesas é de difícil interpretação e (ii) apresentam-se regularmente com níveis de oxigenação e de complacência pulmonar reduzidas, que derivam da sua patologia de base, o que, mesmo assim, faz com que satisfaçam os critérios de diagnóstico e que, por definição, “tenham” LAP quando, na

verdade, isso não se verifica. Isto faz com que haja um maior contributo numérico para o cálculo das taxas de mortalidade por LAP, enviesando os valores verdadeiros, pois pode parecer que pessoas obesas apresentam um menor risco, mas, na verdade, foram analisadas pessoas com o diagnóstico incorreto e desenquadrado. (9)

Fatores como a diabetes e o consumo crónico de álcool também assumem uma particular relevância. Relativamente ao primeiro, verifica-se que diabéticos apresentam um menor risco, mas talvez se justifique pelo facto de a maior parte deles contrair sépsis não por pneumonia mas sim como resultado de infeções urinárias recorrentes, não se enquadrando, portanto, nos critérios de diagnóstico de LAP. Relativamente ao consumo de álcool, verifica-se um risco acrescido que pode ser explicado pela diminuição da capacidade que estas pessoas têm de neutralizar radicais livres, os quais assumem um papel importante em fenómenos inflamatórios. (9)

Constata-se que uma definição de LAP/SDRA permitirá aos clínicos identificarem com maior precisão quais são, efetivamente, os “seus” doentes. Infelizmente, derivado da (ainda) reduzida viabilidade dos critérios de diagnóstico (por exemplo, a componente da oxigenação é sensível à ventilação e à  $FiO_2$  – que, por sua vez, para valores inferiores a 0,40 torna-se muito pouco fidedigna (10) -, a exclusão de fatores cardíacos é complicada e a interpretação da radiografia torácica pode ser dúbia. (9)), a comunidade científica ainda está longe de otimizar estes dados.

### 2.3. Etiologia

A causa para a ocorrência de LAP/SDRA pode ser dividida em duas vertentes: causas diretas (ou seja, que resultam de uma agressão direta à estrutura pulmonar, o que acaba por desencadear a doença) ou indiretas (em que a lesão pulmonar resulta da conjugação de uma ou mais patologias exteriores ao sistema respiratório). (11)

Relativamente às causas diretas, englobam-se situações como pneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, afogamento, inalação de gases tóxicos, hábitos tabágicos, entre outros, enquanto que nas causas indiretas estão descritos fenómenos como sépsis, transfusões, choque, pancreatite e toxicidade medicamentosa (sendo estes, de resto, os mais comuns). (12)

Não obstante, a pneumonia bacteriana é a principal causa de LAP e SDRA, seguida de sépsis originária de infeções não-pulmonares, aspiração do conteúdo gástrico e trauma. (13) Em Portugal, num estudo realizado em 2001 para as Jornadas de Medicina Intensiva da Primavera (JMIP2001) contando com a colaboração de duas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de Lisboa, duas do Porto, uma de Matosinhos e uma de Gaia, verificou-se que os dados são praticamente coincidentes, havendo apenas uma supremacia da sépsis grave como principal causa de LAP/SDRA em Portugal, em detrimento da pneumonia bacteriana, conforme demonstra a tabela 2.3. (14)

**Tabela 2.3. – Principais causas de LAP/SDRA em Portugal, em comparação com um estudo europeu (ALIVE) (adaptado de (14))**

Lesão Pulmonar Direta		Lesão Pulmonar Indireta	
JMIP 2001	ALIVE	JMIP 2001	ALIVE
Pneumonia bacteriana – 47%	Pneumonia bacteriana – 45%	Sépsis grave – 52%	Sépsis grave – 25,6%
Contusão pulmonar – 17%	Aspiração/inalação – 16,6%	Trauma não-torácico – 10%	Politransfusões – 5,3%
Aspiração/inalação – 12%	Contusão pulmonar – 11,2%	Politransfusões – 9%	Pancreatite – 5%
Pneumonia por <i>P.carinii</i> – 6%	Pneumonia vírica – 2,5%	Pancreatite – 2%	Trauma não-torácico – 2,8%
Pneumonia vírica – 2%	Afogamento – 0,3%	Intoxicação – 2%	Choque não-séptico – 2,8%
Afogamento – 0%		Queimadura – 0%	Intoxicação – 1,2%
Outra – 6%		Choque não-séptico – 0%	Queimadura – 0,9%

## 2.4. Mecanismos fisiopatológicos

Em primeiro lugar, é importante constatar que a história natural da LAP/SDRA pode ser dividida em três fases, embora possa haver sobreposição das mesmas nalguns casos: (i) fase aguda (também designada de exsudativa), em que ocorre uma invasão alveolar por parte dos neutrófilos, com formação de membranas de hialina, hemorragias e edema pulmonar; (ii) fase proliferativa, em que ocorre um processo inflamatório descontrolado e (iii) fase fibrótica, em que há substituição do tecido lesado por tecido fibrótico levando à resolução da doença. (11)

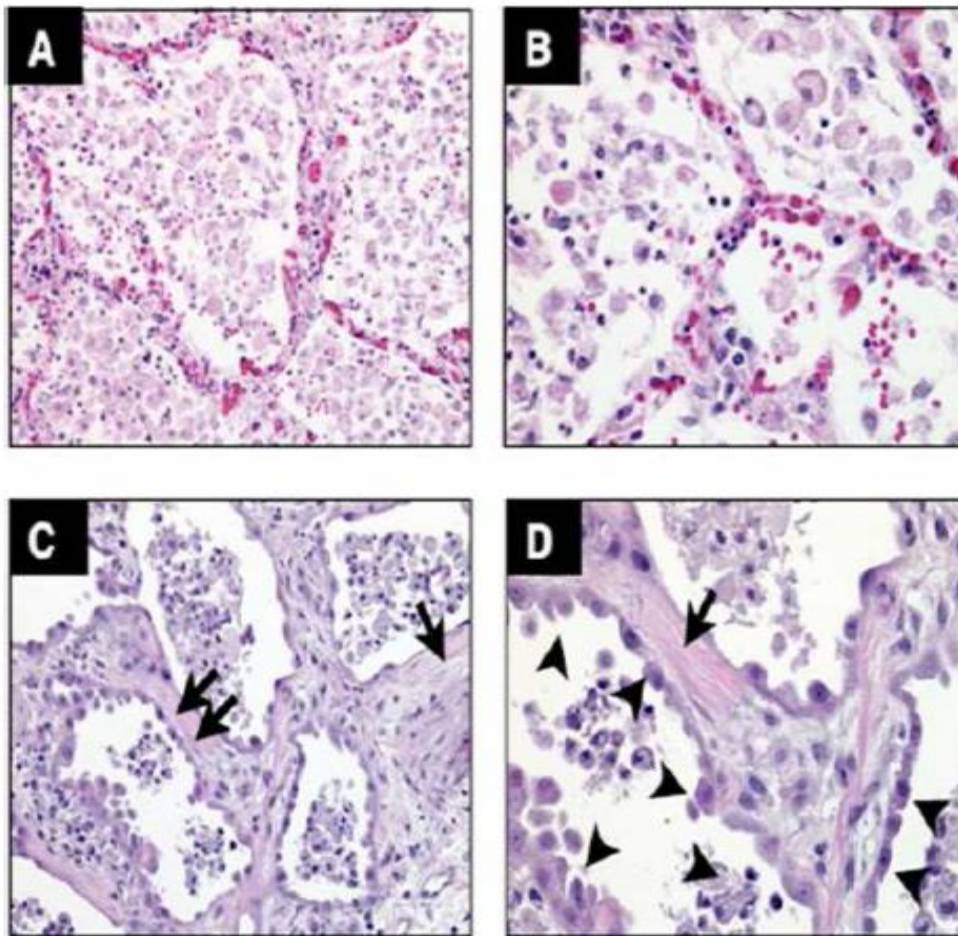
Estabelecendo um período temporal, a fase aguda ocorre nas primeiras 72 horas após a ocorrência da lesão pulmonar, através de um processo inflamatório que danifica a barreira alvéolo-capilar, levando a um extenso edema intersticial e alveolar que impede as normais trocas gasosas. Consequentemente, o processo de respiração torna-se mais complicado, causando falha respiratória e necessidade de ventilação assistida. É interessante verificar que a própria ventilação pode exacerbar a lesão entretanto formada, na medida em que os alvéolos instáveis podem colapsar, enquanto que os alvéolos que resistiram, ao receberem a maior parte do volume ventilatório, podem ultrapassar o seu limite de elasticidade e, eles próprios, acionarem mecanismos de lesão celular. Para além disso, ocorre uma intensa migração de neutrófilos para o local da lesão, com aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (discutido ao longo do trabalho). (11)

Nesta altura, os pacientes podem recuperar do insulto inicial, através da *clearance* do edema alveolar e do restauro da barreira alvéolo-capilar, ou então acabam por progredir para a fase exsudativa da SDRA, não sendo ao certo conhecidas as razões pelas quais duas pessoas expostas ao mesmo insulto podem ter progressões da doença diferentes (aqui, os próprios fatores genéticos e de risco podem sobressair, conforme visto anteriormente).

A fase proliferativa ocorre normalmente ao longo do terceiro ao sétimo dia após a agressão que despoletou a doença, sendo caracterizada por uma extensa formação de membranas de hialina no espaço intraalveolar. A migração neutrofílica continua, sendo que alguns mecanismos fisiológicos começam a desregular-se, nomeadamente o



Contudo, os sobreviventes da primeira semana de LAP/SDRA podem entrar na derradeira fase fibrótica. Esta, que perdura ao longo do oitavo até ao vigésimo oitavo dia (em média), é caracterizada por um processo evidente de fibrose, com proliferação de pneumócitos de tipo II, migração de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos, conforme demonstra a figura 2.3. Verifica-se também um processo crónico inflamatório que pode levar à morte se os pacientes tiverem comorbilidades que impossibilitem a sua resolução eficaz. (11)

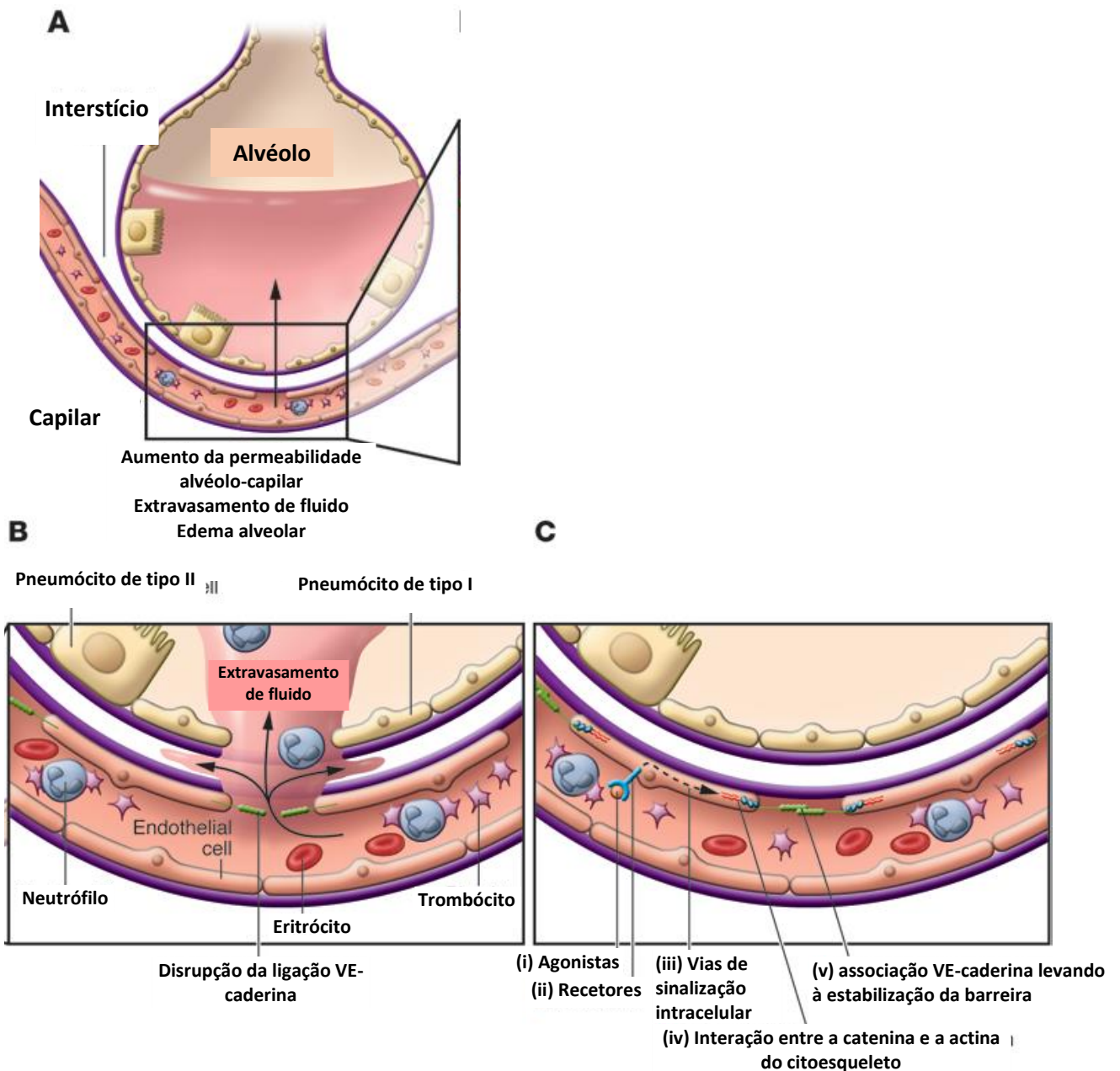


**Figura 2.3. – Patologia da LAP em humanos. Nestas amostras de tecido pulmonar provenientes de dois pacientes diferentes, e recorrendo à coloração de hematoxilina e eosina, pode-se distinguir a fase aguda (A e B), em que os alvéolos foram invadidos por neutrófilos e monócitos. É igualmente visível o fenómeno de hemorragia alveolar. Quanto à fase tardia (C e D) nota-se a deposição de colagénio ao longo das paredes alveolares (setas), sendo que nestas também se detetam células cuboides epiteliais, que não são mais do que pneumócitos de tipo II em processo proliferativo. (adaptado de (11))**

#### 2.4.1. Lesão endotelial e epitelial

A barreira alvéolo-capilar é formada pelo epitélio alveolar e pelo endotélio da microvasculatura. O epitélio alveolar é constituído principalmente por pneumócitos do tipo I (cerca de 90%, sendo células bastante frágeis a possíveis agressões) e do tipo II (que, apesar de apenas reunirem os restantes 10% do epitélio total, assumem um grau de importância muito acentuado, pois têm a capacidade de se diferenciarem nos seus análogos do tipo I aquando de uma lesão e são ainda responsáveis pela produção de surfactante e transporte de iões). (15)

O aumento da permeabilidade desta barreira é a principal característica fisiopatológica que define a fase aguda da LAP/SDRA. (16) Consequentemente, ocorre o fluxo de fluido rico em proteínas para o espaço extravascular, criando um cenário de edema pulmonar, ilustrado pela figura 2.4. Estão descritos vários mediadores, vias e sistemas moleculares que contribuem para esta desregulação da barreira alvéolo-capilar. No entanto, um fator crítico para a estabilidade da barreira supracitada passa pela caderina vascular endotelial (do inglês *Vascular Endothelial cadherin* – VE-caderina). Esta proteína está presente nas membranas laterais das células endoteliais, formando associações dependentes de cálcio entre elas e que impedem o extravasamento de substâncias para o espaço extravascular. A quebra destas ligações facilita não só a passagem de fluidos provenientes da circulação sanguínea (e, com isso, o aumento do edema alveolar que, por sua vez, leva ao fenómeno de hipoxemia característico da LAP/SDRA) como também a migração trans-endotelial por parte de leucócitos (exacerbando o processo inflamatório em curso). (13) De notar que, em situações de homeostasia, a barreira epitelial é muito menos permeável que a barreira endotelial, pelo que, ao haver dano principalmente nos pneumócitos de tipo II, ocorre não só uma diminuição da capacidade destes em transportar o fluido de volta para o espaço extraalveolar, como também aumenta a probabilidade de ocorrência de choque séptico em indivíduos com pneumonia bacteriana. Simultaneamente, há uma redução da produção de surfactante (característica igualmente presente em doentes com LAP/SDRA). (15)



**Figura 2.4. – Disrupção da barreira alvéolo-capilar e sua relação com as ligações entre caderinas endotélio-vasculares (adaptado de (16)).**

### 2.4.2. Inflamação desregulada

Um processo inflamatório não é mais do que um mecanismo de defesa gerado pelo organismo no combate a uma ameaça à homeostasia. No entanto, este processo deve ser finito e controlado no tempo, funcionando como uma resposta a curto-prazo. Não obstante, o grande problema da LAP/SDRA é que o processo inflamatório não só é

extenso como também é exacerbado ao longo do tempo, levando a um agravamento do estado de saúde do doente que, por si só, pode levar à morte. (17)

Aquando de uma melhor caracterização da fisiopatologia inerente, foi relativamente consensual o facto do aumento da barreira alvéolo-capilar e o edema pulmonar serem sinais cardinais da LAP/SDRA. No entanto, os mecanismos que geravam esses sintomas eram relativamente pouco conhecidos. Suspeitava-se que a inflamação podia ser uma justificação válida, até porque, em autópsias realizadas em pacientes com LAP/SDRA, verificava-se um aumento de leucócitos polimorfonucleares (LPMN) no tecido pulmonar. Estudos subsequentes constataram com mais afinco que, de facto, a inflamação é uma das componentes que mais está presente aquando de uma lesão direta no pulmão. (16)

#### 2.4.2.1. *Desequilíbrio entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios*

A ativação da imunidade inata inicia-se através da ligação de produtos microbianos ou metabolitos de lesão celular a recetores *Toll-like* (TLR – do inglês *Toll-like receptors*) presentes no epitélio alveolar e a macrófagos alveolares. Este fenómeno, de resto, está reconhecido como sendo a *driving force* da LAP/SDRA. Contudo, é de ressaltar que estes mesmos mecanismos são utilizados na eliminação e contenção de substâncias patogénicas, ainda que, na maioria dos casos, ocorram de uma forma controlada (e não excessiva), o que não se verifica na LAP/SDRA. (13)

Os metabolitos endógenos indicativos de lesão celular estão englobados numa categoria denominada “padrões moleculares associados ao perigo” (DAMP – do inglês *danger-associated molecular pattern*), sendo que, a nível de estimulação da resposta imunitária, têm as mesmas funcionalidades dos “padrões moleculares associados à patogenicidade” (PAMP – do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), porventura devido à evolução da célula eucariota a partir da procariota. Os produtos microbianos, por exemplo, enquadram-se nas PAMP’s. (13,18)

Aquando da lesão, as células alveolares são igualmente estimuladas a libertar substâncias quimiotáticas, induzindo a migração de células inflamatórias a partir do espaço intravascular e atravessando não só o endotélio como também o epitélio até

atingir as vias aéreas. Portanto, as agressões etiologicamente classificadas como diretas ou indiretas desencadeiam o denominado Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS – do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), que inclui o recrutamento de leucócitos (macrófagos alveolares e neutrófilos presentes na corrente sanguínea) para o pulmão, sendo que este processo de recrutamento depende bastante da função das quimiocinas e dos seus respectivos recetores. (19)

Perante um processo inflamatório, as células são estimuladas a libertar substâncias que provoquem quimiotaxia, sendo as quimiocinas (moléculas de tamanho reduzido – 8 a 10 kD) secretadas em resposta a produtos bacterianos e/ou marcadores inflamatórios. Depois, são retidas por uma rede de proteoglicanos no local da inflamação, criando um gradiente que acaba por sinalizar o foco da infeção. Os neutrófilos são posteriormente recrutados por este gradiente que se estabelece (de resto, o seu grau de acumulação está relacionado com um pior prognóstico da LAP/SDRA), tendo as quimiocinas a capacidade de torna-los rígidos, porventura devido à indução da polimerização dos filamentos de actina. Esta rigidez faz com que os neutrófilos fiquem retidos no espaço alveolar. (19)

Aquando de todo este processo inflamatório, metabolitos do ácido araquidónico (AA) e nitritos são formados e, derivado de serem potentes quimiocinas, amplificam ainda mais a migração deste tipo de leucócitos. (20).

De resto, citocinas (proteínas libertadas pelas células imunitárias) como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$  – do inglês *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) e a interleucina 1 (IL-1) têm a capacidade de induzir outras células (macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais) a libertar mais quimiocinas, destacando-se a interleucina 8 (IL-8) que é um potente fator quimiotático dos neutrófilos. (21)

O papel de todos estes fatores torna-se evidente em amostras de fluido broncoalveolar (FBA) contendo antagonistas do TNF (sTNFR I e II) e da IL-1 $\beta$  (IL-1RA, que impede a ligação da IL-1 $\beta$  ao respetivo recetor celular). Enquanto que, em pessoas sãs, o rácio de IL-1 $\beta$ /IL-1RA é de 1:1, indivíduos com SDRA podem apresentar rácios de 10:1. Este rácio agonista/antagonista pode inclusive servir como indicador da severidade da doença. (21)

Por último, importa ressaltar que as concentrações de IL-1 $\beta$  são preditivas do *outcome* mas as de TNF já não o são (apesar de também estarem elevadas em pessoas que sofrem de SDRA). (21)

#### 2.4.2.2. *O papel dos neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares*

Os neutrófilos assumem-se como um fator fulcral na LAP/SDRA (22), sendo que o seu recrutamento para o espaço alveolar ocorre quando os macrófagos, por si só, não conseguem repor a homeostasia. (23)

A influência destas células imunitárias na fisiopatologia da LAP está bem patente naquilo a que muitos autores denominam “teoria dos neutrófilos”, em que, numa fase embrionária da LAP, ocorre a ativação destes com consequente diminuição da apoptose e um aumento da migração para o trato respiratório mediado por fatores pró-inflamatórios como o fator estimulador de colónias dos granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*), o fator estimulador de colónias dos macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e várias outras quimiocinas. (24)

Perante este cenário introdutório, é importante realçar que nem sempre é nefasto o facto de haver migração de neutrófilos para o pulmão. De facto, os neutrófilos podem migrar para esta zona sem causar lesões adjacentes. A migração de estas células para o espaço pulmonar não constitui, *per si*, uma situação de LAP (tal acontece, por exemplo, na pneumonia adquirida na comunidade). É necessária uma ativação posterior descontrolada para que tal aconteça. (21) (25)

Os neutrófilos podem proceder à transmigração por mecanismos paracelulares ou transcelulares, sendo o último o mais comum. É importante verificar que as características de migração dos neutrófilos no pulmão (MNP) é, em determinados aspetos, diferente das que se verificam noutros órgãos: (i) a MNP ocorre nos capilares e não em vasos de maior calibre e (ii) devido ao diâmetro reduzido dos capilares (entre 2 e 15  $\mu\text{m}$ ), os neutrófilos precisam de reconhecer especialmente esses mesmos capilares para alterarem a sua forma (pois possuem um diâmetro de 6 a 10  $\mu\text{m}$ ). Logo, conclui-se que o processo de MNP é muito mais demorado que nos restantes órgãos. (21)

A adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular é precedida de uma ativação de integrinas na membrana leucocitária, ativação essa que é quimiocina-dependente. As integrinas atuam na adesão dos neutrófilos à membrana endotelial por um mecanismo de interação com moléculas de adesão específicas no endotélio (como as moléculas de adesão intercelular 1 e 2 - ICAM-1 e ICAM-2, respetivamente -, a molécula de adesão vascular celular 1 - VCAM-1 -, entre outras). (21)

Depois da adesão, as selectinas são proteínas transmembranares que têm um papel importante no processo de “rolamento” dos neutrófilos ao longo do endotélio. Enquanto que os neutrófilos expressam à sua superfície a L-selectina e o ligando glicoproteico da P-selectina (PSGL1 – do inglês *P-selectin glycoprotein ligand 1*), a membrana do endotélio possui proteínas homólogas (nomeadamente a P-selectina, E-selectina e PSGL-1) que vão permitir que o processo de “rolamento” se desenvolva. (21)

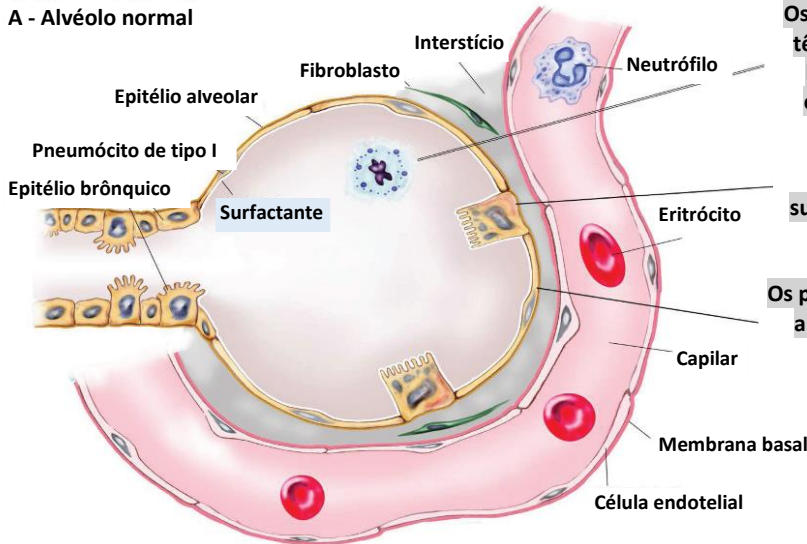
No entanto, há mais vias que permitem o “rolamento” dos neutrófilos, visto que foi demonstrado que a inibição destas selectinas não impede o processo inflamatório (e, por interpolação, o “rolamento”). (21)

Enquanto o processo de migração se desenrola, os neutrófilos vão libertando substâncias indutoras de morte celular (proteases, espécies reativas de oxigénio – ROS, do inglês *reactive oxygen species* - entre outras discutidas posteriormente), que acabam colateralmente por afetar o endotélio e o epitélio, sendo um dos mecanismos envolvidos na disfunção da barreira alvéolo-capilar. (19)

Ao atingirem o foco da inflamação, os neutrófilos libertam com maior intensidade os seus produtos (citocinas, proteases, mieloperoxidasas), que, por sua vez, fazem o *upregulation* dos recetores para as moléculas de adesão supracitadas, exacerbando o fenómeno de quimiotaxia e, por inerência, a permeabilidade vascular e epitelial. (20)

Todos estes fenómenos acerca do recrutamento destas células imunitárias para o espaço pulmonar estão elucidados na figura 2.5.

**A - Alvéolo normal**

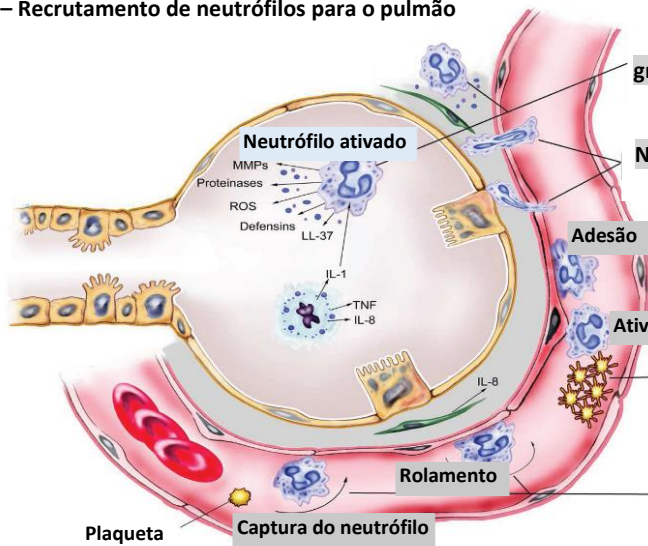


Os macrófagos alveolares são fagócitos que têm um papel determinante na defesa do hospedeiro e na resposta a substâncias exógenas, sendo igualmente uma fonte importante de quimiocinas

Os pneumócitos de tipo II produzem surfactante, podendo também proliferar-se e diferenciar-se em pneumócitos de tipo I

Os pneumócitos de tipo I formam a estrutura alveolar e são responsáveis pelas trocas gasosas aí existentes

**B - Recrutamento de neutrófilos para o pulmão**



Após transmigração, os neutrófilos libertam as proteínas granulares (enzimas proteolíticas e péptidos catiónicos) e ROS

Neutrófilos migram por mecanismos trans ou paracelulares

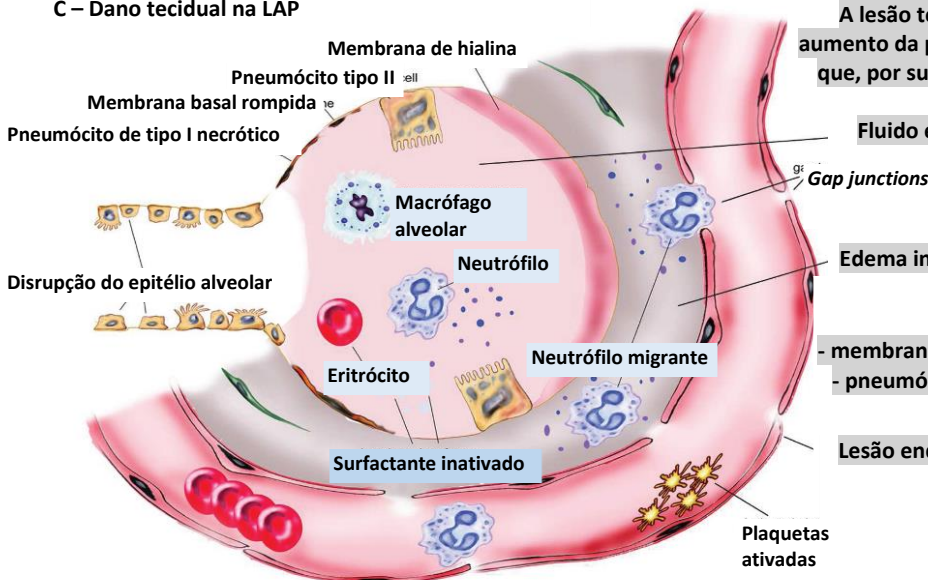
A adesão dos neutrófilos é mediada por integrinas

A ativação dos neutrófilos é mediada por quimiocinas

As plaquetas ativadas libertam quimiocinas (PF4, CCL5) e interagem com os neutrófilos via P-selectina

A adesão e o rolamento dos neutrófilos é mediada por selectinas (L-, E-, P-selectinas)

**C - Dano tecidual na LAP**



A lesão tecidual na LAP é caracterizada por um aumento da permeabilidade do endotélio e do epitélio que, por sua vez, conduzem a um edema pulmonar

Fluido edematoso rico em proteínas presente no espaço alveolar

Edema intersticial

Dano alveolar:

- Inativação do surfactante
- membranas de hialina perturbam as trocas gasosas
- pneumócitos de tipo I em processos apoptóticos ou necróticos

Lesão endotelial com perturbação da barreira endotelial

**Figura 2.5. - Evolução do processo de recrutamento e ativação dos neutrófilos na lesão aguda do pulmão (adaptado de (16))**

#### 2.4.2.2.1. Proteases de serina

A liberação de proteases de serina por parte dos neutrófilos possui uma relevância óbvia no contexto da LAP/SDRA. A elastase do neutrófilo (NE, do inglês *neutrophil elastase*) é uma enzima que, por um lado, comunga com o sistema imunitário em prol da defesa contra infecções bacterianas, mas, por outro, e quando libertada em excesso, tem a capacidade de causar danos aos tecidos humanos. Há vários mecanismos onde a NE pode atuar. A clivagem proteolítica das VE-caderinas (com consequente aumento da permeabilidade desta membrana) pode ser-lhe atribuída mas, concretamente, no pulmão não só degrada proteínas surfactantes (SP-A e SP-D, importantes fatores anti-inflamatórios que atuam na *clearance* de neutrófilos apoptóticos), como também destrói o recetor CXCR-1, componente fulcral no combate a infecções pulmonares. (21,23)

Mais, a NE pode inclusive induzir a apoptose de pneumócitos e/ou estimular a síntese de mais quimiocinas, podendo a severidade da LAP/SDRA ser inferida tendo em conta os níveis de NE no FBA. (21)

Hagio e seus colaboradores mostraram que o sivelestat (inibidor da NE extracelular) ajudou a impedir a progressão da permeabilidade alveolar em hamsters com LAP induzida por *S.pneumoniae*, causando inclusive uma redução da carga bacteriana, embora o fármaco testado não possua propriedades antibacterianas, o que pode colocar a hipótese desta molécula reequilibrar o rácio entre a NE que é indispensável e aquela que é prejudicial. (23)

#### 2.4.2.2.2. Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMP) são endopeptidases que têm um papel ativo em diversas vias celulares. No contexto da LAP, as mais referidas são a MMP-2 (gelatinase A), a MMP-9 (gelatinase B) e a MMP-8 (colagenase 2), estando todas armazenadas no conteúdo granular dos neutrófilos. Todas possuem propriedades anti-inflamatórias, estando cientificamente demonstrado o seu potencial a nível da redução dos níveis e, consequentemente, da atividade de citocinas e quimiocinas. No entanto, como as MMP

têm funções muito específicas que variam, por vezes, antagonicamente entre si, não se consegue sustentar a hipótese de constituírem um alvo terapêutico. (21)

#### 2.4.2.2.3. Polipéptidos catiónicos

Os neutrófilos libertam igualmente para o meio extracelular polipéptidos catiónicos. Muito se tem debatido sobre o papel da lactoferrina, que está em concentrações elevadas nos neutrófilos quando comparada com a da circulação sistémica. Este polipéptido, para além de possuir propriedades antifúngicas, antivirais e antimicrobianas, possui uma atividade moduladora da inflamação: se, por um lado, inibe a migração de neutrófilos e eosinófilos (principalmente quando é libertada de células apoptóticas), por outro estimula a migração de monócitos e já demonstrou também intervir na produção de mediadores pró-inflamatórios, nomeadamente citocinas da família das proteínas inibidoras do macrófago (MIP-1 e MIP-2), porventura por ligação a recetores TLR-4, embora este mecanismo não esteja totalmente esclarecido. (21)

Outros polipéptidos como a catelicidina humana (LL-37), defensinas e azurocidina também são importantes, sendo a sua atividade considerada como pró-inflamatória. (21)

#### 2.4.2.2.4. Espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (NOS)

O papel das ROS e NOS está muito bem descrito no que concerne à fagocitose, sendo libertados apenas para o fagossoma aquando deste processo. (21)

Apesar do seu contributo como fatores de defesa do organismo, tem-se vindo a descobrir outras vias de atuação das NOS e ROS, nomeadamente no que diz respeito a sinalizações celulares envolvidas na homeostase, proliferação e diferenciação celular, e ainda em respostas inflamatórias e imunitárias, porque possuem características indicadas para tal: (i) tamanho reduzido; (ii) enorme capacidade de difusão e (iii) o seu processo de síntese e degradação é célere. (26)

De facto, a capacidade destas ROS e NOS em modificar o equilíbrio *redox* das células pode implicar alterações na regulação de recetores, atividades enzimáticas, ligação de fatores de transcrição e expressão de genes. (26)

No entanto, e segundo o processo de “sinalização *redox*”, os neutrófilos quando estimulados podem libertar pequenas quantidades de ROS e NOS para o meio extracelular, assegurando um efeito parácrino, causando a modificação de conteúdos celulares como lípidos e proteínas, por meio de reações oxidativas. (21)

As ROS e NOS, aquando de uma resposta inflamatória característica da LAP, vão servir como moduladores de lípidos e proteínas cinases e fosfatases, recetores membranares, canais iónicos e fatores de transcrição, incluindo o recetor nuclear para a transcrição das proteínas de adesão (NF- $\kappa$ B, importante na modulação de citocinas e quimiocinas). (26)

Existem diversas vias celulares para a produção de ROS, entre as quais se destacam a NADPH oxidase, a cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria (sendo que as mitocôndrias possuem as suas próprias superóxido dismutase – SOD - para as neutralizar), o metabolismo do ácido araquidónico (quer pela lipooxigenase quer pela ciclooxigenase) e a sintase do monóxido de azoto (que participa, por exemplo, na conversão da L-arginina em L-citrulina, com formação de NO $\bullet$ ). (26)

O papel destas moléculas está bem documentado em modelos animais, estando a sua concentração plasmática e pulmonar igualmente relacionado com a severidade da LAP/SDRA. (21)

Portanto, e em suma, o papel dos neutrófilos passa por libertar moléculas citotóxicas (enzimas granulares, ROS, citocinas, entre outras) que levam a necrose celular e a uma lesão característica de SDRA. (27)

Contudo, os macrófagos também se assumem como um fator relevante, não só na exacerbação da inflamação como na sua própria resolução. (19) Os macrófagos alveolares são a principal fonte de quimiocinas, produzindo IL-8, péptidos derivados do oncogene regulador do crescimento (GRO) e CXCL-5 (21). Outras quimiocinas como CXCL-8, CXCL-1, CXCL-5 e CCL-2 provocam a sua ativação, estando em concentrações

elevadas no FBA de pacientes com LAP, havendo estudos que assinalam a sua importância como fator preditivo do *outcome*. (19)

Portanto, a função fisiopatológica dos leucócitos na LAP/SDRA é importante para uma conceção teórica da doença mas, mais importante, abre espaço a novos alvos terapêuticos a aprofundar. (22)

Factos como no FBA os LPMN poderem atingir 80% do total de células detetadas, em contraste com os 3% verificados em pessoas saudáveis não devem ser ignorados, pelo que estudos que permitam reconhecer quais os alvos terapêuticos mais adequados para posterior intervenção farmacológica são da mais extrema importância. (28)

#### 2.4.2.3. *A relevância da morte celular programada*

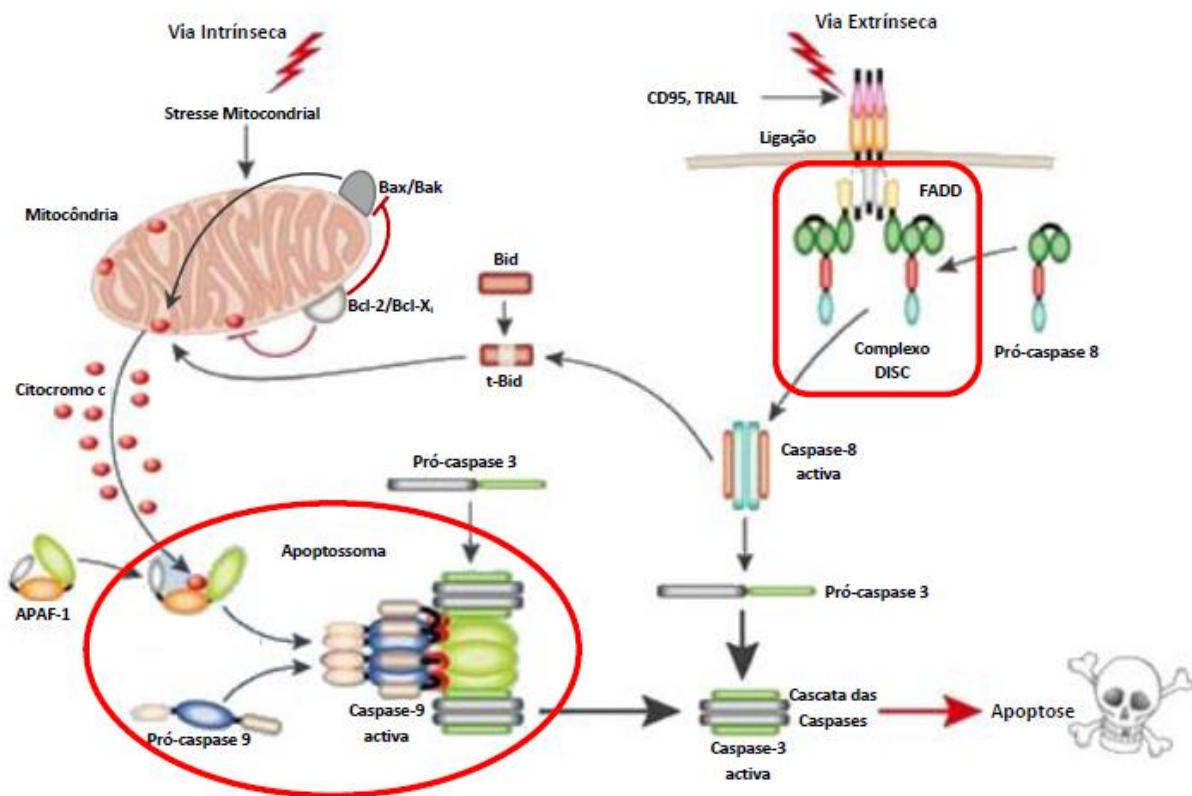
Em primeiro lugar, é importante referir que a apoptose é um tipo de morte celular programada (embora haja a tendência de se referir a estes termos como se fossem um só), porque, por exemplo, a oncosse também se enquadra neste tipo de morte celular. (29)

A apoptose é o processo morfológicamente definido como diminuição do tamanho da célula, fragmentação nuclear e condensação da cromatina, sem libertar o conteúdo celular para o exterior (ao contrário do que se sucede, por exemplo, na necrose). (25) A membrana celular de células apoptóticas mantém-se, geralmente, intacta. (29)

A apoptose pode ser ativada por duas vias: (i) via extrínseca, mediada por recetores superficiais de morte celular (CSDR – do inglês *cell surface death receptors* – que são da família dos recetores TNF- $\alpha$ ) em que ligandos como TNF- $\alpha$ , FasL, linfotóxina A, ligando apo-3 e TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) se ligam a CSDR's e, por transdução de sinal, ocorre a formação de um complexo trimérico entre o recetor, a proteína adaptativa e a procaspase 8, finalizando na sua ativação a caspase 8; (ii) ou pela via intrínseca, sendo este processo ativado em resposta a danos principalmente no DNA, em que gera um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, com posterior libertação do citocromo c, que se vai conjugar não só com uma molécula adaptadora da caspase (*apoptotic-protease-activating-factor-1*) como também à procaspase 9,

formando um complexo ATP-dependente denominado apoptossoma. Posteriormente, a procaspase é depois ativada por autoclivagem proteolítica em caspase 9. (25)

Apesar do mecanismo pela qual se desencadeiam ser substancialmente diferente, ambas as vias estão relacionadas (conforme elucidada a figura 2.6.), sabendo-se igualmente que, no contexto da LAP/SDRA, ambas as vias ocorrem, levando à apoptose dos pneumócitos. Para além disso, linfócitos T-citotóxicos e células *Natural Killer* podem induzir a apoptose por outras duas vias: a do sistema Fas/FasL e a do sistema perforina/granzima, que estão ambas acentuadas durante a fase aguda de LAP derivada de sépsis. (25)



**Figura 2.6. – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose (adaptado de (30))**

A apoptose de pneumócitos representa um mecanismo importante de disfunção da membrana epitelial alveolar. De resto, durante a fase aguda, verifica-se uma diminuição de tamanho com consequente condensação da cromatina nos pneumócitos de tipo I. (25)

A ativação da via Fas/FasL, para além da necrose causada por isquemia, fatores bacterianos e/ou imunitários, é de extrema importância na lesão epitelial alveolar. Esta via, quando ativada, também estimula a resposta pró-inflamatória dos neutrófilos, já que os expõem a estímulos adicionais. Quer o Fas quer o FasL podem estar sob a forma ligada à membrana ou como fator solúvel (sFas e sFasL), existindo diferenças principalmente a nível do recetor, isto é, enquanto que o Fas ligado à membrana induz a apoptose, a sua forma solúvel inibe-a (porventura por diminuir a quantidade de FasL disponível para se ligar ao recetor membranar). (25)

Em modelos de LAP induzida por endotoxina, verificou-se um aumento da expressão de Fas nas células pulmonares bem como o recrutamento de outras células produtoras de Fas para o local. Em animais em que foi provocada a deficiência nesta via verificou-se haver um menor grau de apoptose por parte dos pneumócitos. (25)

Relativamente a pacientes, quer as concentrações de sFas quer as de sFasL estão mais aumentadas no fluido edematoso pulmonar do que no plasma, verificando-se uma capacidade de *upregulation* deste sistema exclusivamente no tecido pulmonar. Adicionalmente, verificou-se que o sFasL está em concentrações elevadas no FBA de pessoas com SDRA, ainda mais elevadas nas que vieram a falecer.(25)

O tipo de estímulo a que uma célula está sujeita pode influenciar o tipo de mecanismo apoptótico ativado: o lipopolissacárido (LPS) está relacionado com a via Fas/FasL; hiperóxia e isquemia com ROS; e exposição prolongada a mediadores inflamatórios com a ativação de proteases. Por exemplo, a angiopoietina-2 é um fator de crescimento que está relacionado com as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose, promovendo essencialmente uma desestabilização dos vasos sanguíneos, aumentando a sua permeabilidade e induzindo a apoptose de células endoteliais. A sua expressão é induzida essencialmente em situações de hiperóxia, sendo que a diminuição da sua expressão em ratos melhorou o seu *outcome* em relação ao fenómeno inflamatório, à mortalidade, à morte celular, entre outros. (29)

É importante salientar que o equilíbrio entre fatores apoptóticos (Fator de transformação do crescimento beta - TGF- $\beta$  - e angiotensina II, por exemplo) e anti-apoptóticos (SP-A e *decoy receptor 3*, entre outros) é importante para determinar o grau de lesão epitelial. (25) De resto, a inibição da apoptose pode ter efeitos benéficos, na

medida em que perpetua a função fagocitária dos LPMN's. No entanto, pode levar a um processo inflamatório que tarda em cessar, o que se acaba por se traduzir num cenário prejudicial. Os LPMN's normalmente têm um tempo de vida a rondar as 24 horas na circulação periférica. Porém, nestes processos inflamatórios, a apoptose é retardada por G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$  e IL-8, aumentando o seu tempo em circulação. (28)

Para além disso, existem diversos marcadores apoptóticos aumentados em pacientes com LAP e SDRA (p53, caspase 3, entre outros) comparativamente a indivíduos que possuem uma função respiratória normal. (25)

A GM-SCF é uma citocina que possui múltiplas fontes, desde monócitos, eosinófilos, linfócitos T e até fibroblastos pulmonares, sendo que níveis plasmáticos aumentados de GM-SCF após trauma podem levar a uma maior predisposição para SDRA, na medida em que fica inibida a apoptose dos LPMN, por inibição da via Fas/FasL. (25,28)

Por outro lado, a *clearance* das células apoptóticas também é um ponto fulcral. O reconhecimento por parte dos macrófagos parte essencialmente da ligação a moléculas de superfície, entre as quais o CD44. Está demonstrado que o processo de fagocitose pelos macrófagos alveolares inibe a sua síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, GM-CSF e TNF- $\alpha$ ) e aumenta a produção de mediadores anti-inflamatórios (TGF-1 $\beta$ , prostaglandina E2 e o fator de ativação das plaquetas - PAF). Portanto, um aumento do processo fagocitário pode levar à resolução do processo inflamatório por diminuição da capacidade pró-inflamatória dos macrófagos alveolares. (25)

Portanto, há imensas vias pelas quais se pode atingir a redução da inflamação em casos de LAP/SDRA: anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , inibidores da NE, ou outras estratégias a nível celular como, por exemplo, alterando as funções dos neutrófilos e dos macrófagos alveolares. No entanto, novas áreas como os fatores pró-apoptóticos têm vindo a erguer-se como passíveis de serem incluídas na racionalização de novas terapêuticas. (31) O facto de a mitocôndria ser um ponto-chave na regulação de ambas as vias (já que ambas intervêm na permeabilidade deste organelo) pode também ser um fator a explorar para atenuar a apoptose que se verifica neste tipo de pacientes. (29)

### 2.4.3. Ativação da cascata da coagulação

Sendo a LAP/SDRA uma patologia que envolve múltiplos mecanismos, cedo se tentou verificar as suas implicações nas vias de coagulação. Após um estudo multi-institucional, verificou-se que, de facto, há uma modificação a nível dos fenómenos da coagulação e fibrinólise, nomeadamente a nível da ativação da proteína C e do inibidor da ativação do plasminogénio-I (PAI-I, do inglês *Plasminogen activator inhibitor-1*). Estes dois fatores não só são indicativos da mortalidade e morbilidade como também da própria progressão da doença, na medida em que se verificou que indivíduos com níveis plasmáticos mais baixos de proteína C e/ou com uma forte inibição do plasminogénio-I necessitavam de ventilação durante um maior período de tempo e tinham uma maior probabilidade de desenvolver FMO. (32)

A proteína C assume um papel fundamental na cascata da coagulação, na medida em que, após formação do complexo trombina-trombomodulina, é induzida a sua ativação, denominando-se, a partir daí, proteína C ativada (APC, do inglês *activated C protein*). Esta molécula vai diminuir a produção de outros fatores endógenos que, em função da sua menor concentração, reduzem o estímulo para a formação de trombina. A trombina, por sua vez, é responsável pela ativação de vias que aumentam a sua própria produção, pela migração e proliferação de leucócitos e pela regulação do tónus muscular. Adicionalmente, em conjunto com o fibrinogénio, promove a fibrose tecidual, facto que está bem patente na fisiopatologia da LAP/SDRA, na medida em que, como consequência dos baixos níveis de proteína C, não há espaço para a inibição da coagulação e da fibrose. (32)

De resto, na figura 2.7. está discriminado todo este processo da ativação da proteína C e do seu impacto nas vias da coagulação.

Adicionalmente, a APC possui propriedades anti-inflamatórias (através da inibição do NF- $\kappa$ B que, por sua vez, inibe a migração dos neutrófilos para o local lesado), anti-apoptóticas (inibe o gene que codifica a proteína p53, que é um importante supressor tumoral) e profibrinolíticas (ao ligar-se ao PAI-I, aumenta a capacidade endógena de clivar as ligações de fibrina e de liquidar coágulos entretanto formados). (1)

Relativamente à PAI-I, a sua elevada concentração no contexto da LAP/SDRA é concordante com os fenómenos verificados, visto que, quando o plasminogénio é ativado, transforma-se em plasmina que, por sua vez, cliva as ligações de fibrina e, conseqüentemente, impede o desenrolar de processos fibróticos. A inibição da ativação deste processo, portanto, leva a uma maior deposição de fibrina, conferindo grandes regiões fibróticas aquando de uma lesão desta envergadura. (32)

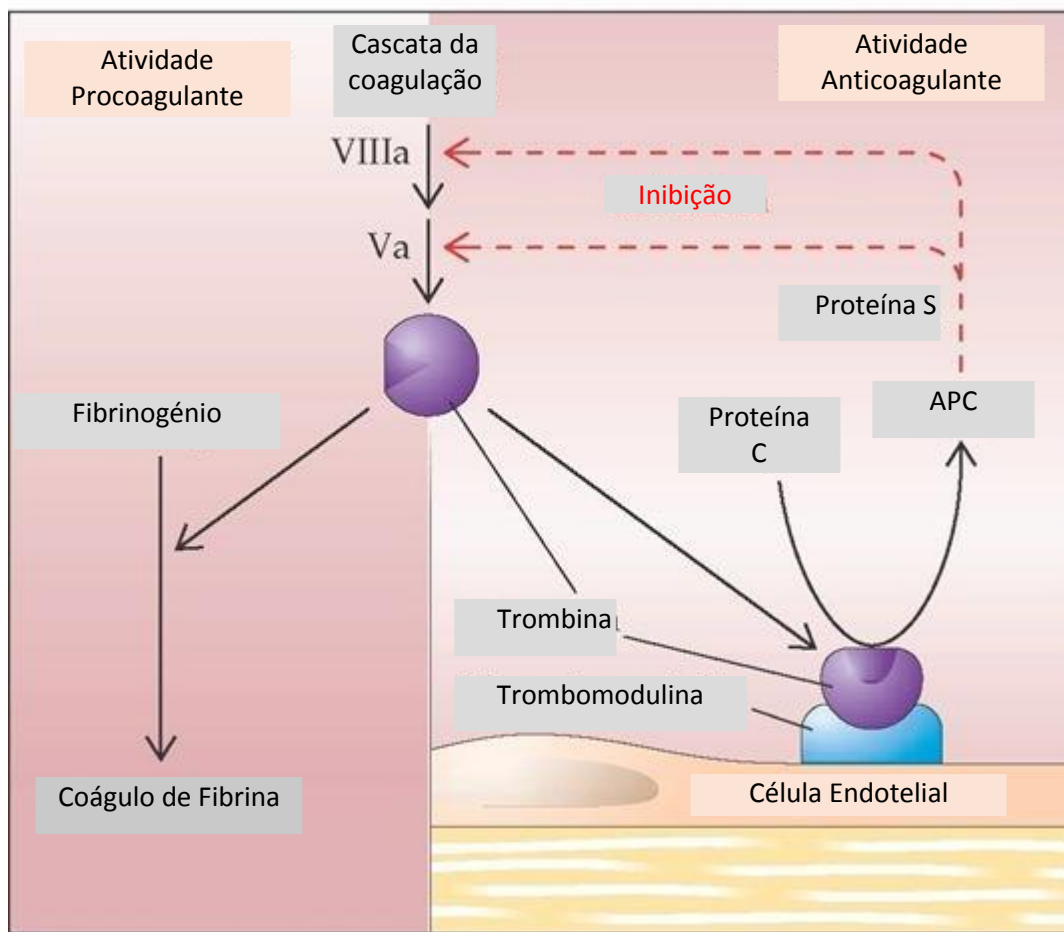


Figura 2.7. Fenómeno da ativação da proteína C no processo de coagulação (adaptado de (33))

**Tabela 2.4. Fisiopatologia do Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (adaptado de (11))**

<b>Fase</b>	<b>Mecanismos envolvidos</b>	<b>Processos fisiopatológicos</b>
<b>Aguda/Exsudativa (0-72 horas)</b>	Dano na barreira alvéolo-capilar	Dano nas células endoteliais capilares Dano nas células epiteliais alveolares
	Formação de edema alveolar	Extravasamento de proteínas para o espaço alveolar Acumulação de fluidos nos alvéolos
	Recrutamento neutrofílico	Mediado por aumento da atividade do NF-κB Mediado por aumento da expressão de ICAM-1
	Ativação de neutrófilos	Libertação de proteases: MMPs, NE, defensinas Libertação de metabolitos do AA: tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas
<b>Média/Proliferativa (0-7 dias)</b>	Atraso na apoptose dos neutrófilos	
	Formação de membranas de hialina no espaço intraalveolar	
	<i>Stress oxidativo</i>	Aumento da produção de ROS Diminuição dos níveis de glutatona
	Aumento de mediadores inflamatórios	Gerais Específicos: FAP, eicosanóides, ácido fosfatídico-1-α, IL-8, TNF-α
	Inativação do surfactante	Destruição e aumento do seu metabolismo
	Ativação do sistema complemento Ativação da cascata da coagulação	Diminuição da concentração de proteína C
<b>Tardia/Fibrótica (8-28 dias)</b>	Organização e fibrose	Proliferação de pneumócitos de tipo II
		Organização dos exsudados alveolares
		Formação de uma matriz rica em colagénio no interstício
		Destruição/fibrose alveolar

## 2.5. Consequências fisiopatológicas

É interessante verificar que as principais consequências a nível de morbidade não estão associadas à intervenção clínica a nível da fase aguda da doença, isto é, não estão relacionadas com a disfunção pulmonar que se verifica no curso inicial da doença mas sim com os processos subsequentes a esta etapa da LAP/SDRA (nomeadamente a nível neuromuscular, cognitivo e fisiológico).(9)

Uma das principais dificuldades em estudar os *outcomes* é separar os quatro principais fatores que podem influenciar a morbidade a curto prazo: o estado de saúde anterior à doença; os fatores de risco associados à LAP; a própria LAP e os tratamentos aplicados, algo que os (ainda poucos) estudos não conseguiram efetuar. (9)

As consequências que remanescem da LAP/SDRA podem resumir-se em três vertentes fundamentais: qualidade de vida, consequências físicas e consequências neurológicas.

### 2.5.1. Qualidade de vida

Numa meta-análise levada a cabo por Dowdy *et al* (34), podem-se constatar uma série de dados relativamente a este aspeto:

- (i) A qualidade de vida em diferentes populações com LAP é diferente;
- (ii) A recuperação dos pacientes tende a ser mais específica, incluindo fatores como a própria terapêutica utilizada e o tipo de cuidados prestados no ambulatório;
- (iii) Pacientes com LAP têm uma redução de qualidade de vida quantitativamente semelhante a outras que possuem doenças agudas igualmente alvo de intervenção nos cuidados intensivos;

### 2.5.2. Consequências físicas

No capítulo das consequências físicas, podem dividir-se em sequelas pulmonares a longo prazo (em que a maioria acaba por não desenvolver disfunção pulmonar a longo prazo devido ao caráter agudo desta patologia) e em sequelas músculo-esqueléticas. Estas últimas, no máximo, atingem 66% das pessoas, nomeadamente na sua capacidade para efetuar exercício. Temos assim:

- (a) Polineuropatia derivada de doença aguda (CIP) e miopatia derivada de doença aguda (CIM) que têm 60% de prevalência e que resultam essencialmente da ventilação mecânica a que o doente está sujeito, sendo que, por se tratar de uma intervenção auxiliar e que substitui os mecanismos fisiológicos, acaba por atrofiar os músculos, resultando, assim, neste quadro clínico. (9)
- (b) Ossificação heterotrópica, que é uma condição existente em 5% dos pacientes e que se caracteriza por uma deposição ectópica de tecido ósseo nas articulações, causando disfunção articular, sendo uma situação que pode ser resolvida com intervenção cirúrgica. (9)

### 2.5.3. Consequências neurológicas

Neste tópico, estão conjugados fatores de natureza mais emocional, na medida em que a própria função psicológica do indivíduo pode ficar afetada numa fase posterior à patologia. (9)

Pessoas que experienciaram esta doença são, muitas vezes, diagnosticadas com depressão, ansiedade e *stress* pós-traumático, havendo vários estudos que relatam um quadro de depressão em, no máximo, 50% dos pacientes um ano após a doença, havendo um ligeiro aumento percentual quando o intervalo de tempo atinge os 2 anos. (35,36)

Estas mesmas consequências neurológicas possuem uma causa que ainda não está completamente estabelecida, na medida em que é difícil escrutinar se são devido a lesões cerebrais induzidas pela própria LAP ou simplesmente pela exposição da pessoa

a uma situação traumática e de extrema gravidade e que colocou em risco a sua própria vida, levando a uma grande carga emocional. A combinação entre estes dois pontos de vista é, também, uma forte possibilidade. (9)

## 2.6. Resolução da LAP/SDRA

A resolução de um episódio de LAP ou de um contexto de SDRA passa por três fases fundamentais: a *clearance* do fluido edematoso presente nos alvéolos, a remoção das células inflamatórias e a reparação do epitélio alveolar, estando todas as fases a ocorrer simultaneamente, não havendo, portanto, uma sequência temporal entre estes processos. (13)

Para a *clearance* do fluido rico em proteínas que está em quantidade abundante nos alvéolos, existe uma forte contribuição do fluxo de íões cloro. Este fluxo é essencialmente controlado por recetores membranares, entre os quais recetores GABA sensíveis ao cloro. (37) Chintagali e Liu estimularam estes mesmos recetores GABA e verificaram uma redução do edema alveolar, pelo que se pode inferir que a agonização deste tipo de recetores pode servir como efeito protetor da LAP, principalmente aquela provocada pela ventilação mecânica. (38)

Por sua vez, os macrófagos alveolares assumem uma preponderância elevada, visto que são os que estão envolvidos na *clearance* não só dos detritos celulares como também das próprias células entretanto degradadas. Este processo de recrutamento envolve um conjunto de células (endoteliais, estromais e parenquimatosas) e a expressão por parte destas de moléculas de adesão à sua superfície, para além da já abordada síntese de quimiocinas e citocinas. (19) No entanto, a eliminação de leucócitos através do mecanismo de apoptose espontânea por secreção aumentada de FasL é um dos mecanismos propostos para a resolução da resposta inflamatória na LAP. (39)

Simultaneamente, a reparação do epitélio alveolar depende da quantidade de pneumócitos de tipo II que resistiram ao processo inflamatório grave e que, mesmo assim, reúnem os mecanismos necessários para se diferenciarem nos seus análogos do tipo I. A reparação do epitélio também está dependente de outras vias, podendo até

envolver o recrutamento de células estaminais residentes no local da inflamação e também aquelas presentes na medula óssea, já que alguns estudos demonstraram que o recetor CXCR4, presente à superfície de células estaminais derivadas da medula óssea, interage com CXCL12 (*stromal-derived factor 1*), uma proteína expressa pelas células pulmonares lesadas. Mais, as células estaminais podem também migrar para locais contendo uma elevada concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-8), uma vez que também podem expressar esses recetores. (19) A discussão mais aprofundada do papel das células estaminais no contexto da LAP/SDRA será abordada posteriormente.

Outros fatores humorais, como o *Kruppel-like factor 4* (KLF-4) também têm demonstrado um papel relevante na resolução da doença. Este fator em específico, por exemplo, mostrou ter uma função transcricional importante na manutenção das junções interendoteliais, através da regulação da expressão das caderinas endotélio-vasculares. (18)

Estes três processos de resolução estão explicitados na figura 2.8.

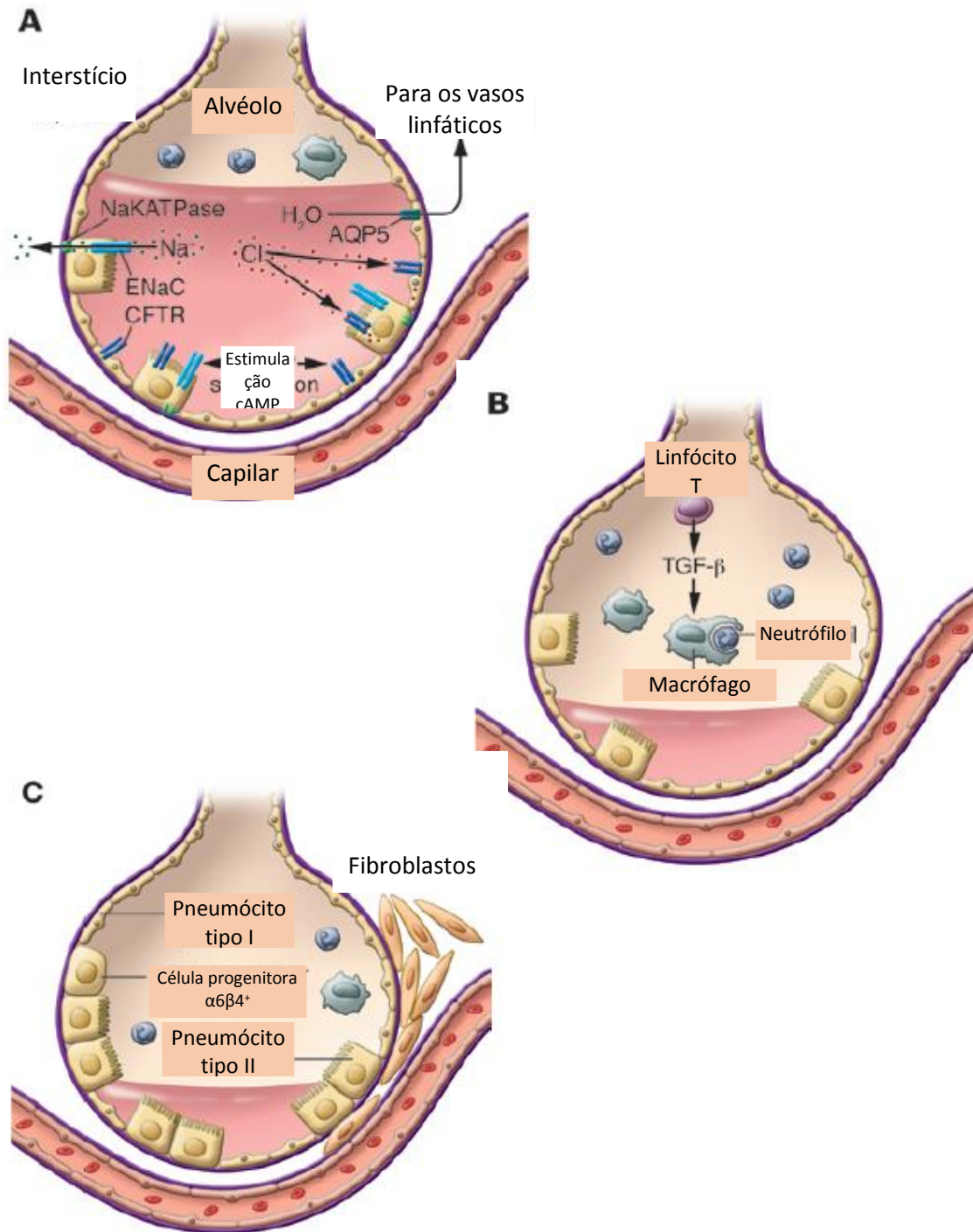


Figura 2.8. Processo de resolução da Lesão Aguda do Pulmão. (A) A eliminação do fluido edematoso presente no espaço alveolar é levado a cabo por transportadores de sódio e cloro para o interstício, criando um mini-gradiente osmótico. (B) Quanto ao processo inflamatório, a sua resolução requer a remoção de neutrófilos das vias aéreas, processo esse que é levado a cabo pelos macrófagos alveolares. Este processo de *clearance* leucocitária pode ser aumentada pela produção de  $\text{TGF-}\beta$  por parte de alguns linfócitos T. (C) Para o restauro da barreira alveolar, é necessária uma proliferação acentuada dos pneumócitos de tipo II, que se diferenciam nos seus análogos de tipo I (adaptado de (13))

### 3. Terapêutica da LAP/SDRA

#### 3.1. Abordagem Não-Farmacológica

Muitas são as abordagens utilizadas para o controlo de sintomas e consequente redução da morbidade e mortalidade inerentes à LAP/SDRA. A terapêutica não-farmacológica passa, essencialmente, pelo controlo hemodinâmico, suporte de oxigénio e controlo de fluídos. (40)

Um dos aspetos mais controversos na LAP/SDRA prende-se com o que se considera um “ótimo controlo de fluidos”, havendo, atualmente, duas visões distintas para o controlo de fluidos de pacientes com esta patologia:

- (i) Um baixo volume de fluidos tem como função proteger os pulmões (diminui o edema pulmonar, aumenta a complacência pulmonar e verifica-se um aumento das trocas gasosas) (40);
- (ii) Um alto volume de fluidos tem como objetivo melhorar o *output* cardíaco bem como a perfusão de órgãos (melhorando, consequentemente, a função renal) e a oxigenação dos tecidos. (40)

Perante estes factos, e apesar do aumento de fluido nos pulmões estar associado a um pior prognóstico, tem sido difícil equilibrar o risco/benefício do aumento do edema pulmonar *versus* a diminuição da perfusão dos órgãos resultante de uma baixa pressão intravascular. (41)

##### 3.1.1. Ventilação mecânica

A ventilação mecânica, para além da conservação de fluidos, são as únicas intervenções que, atualmente, demonstraram reduzir a mortalidade e a morbidade da LAP/SDRA, pois preserva as propriedades da barreira endotélio-capilar presente nos alvéolos. (13) Muitas são as estratégias implementadas para fazer face a esta patologia. Porém, o facto de cada uma possuir vantagens e limitações faz com que não haja uma única intervenção considerada primordial.

**Volumes correntes de oxigénio versus volumes tradicionais:** Este tópico, porventura, é o que mais discussão têm proporcionado à comunidade científica, visto que a aplicação de volumes correntes têm um maior efeito protetor pulmonar, enquanto que os volumes tradicionais são mais úteis do ponto de vista de uma melhor oxigenação dos tecidos.(41)

Não obstante, verifica-se que a ventilação com volumes correntes de oxigénio provaram reduzir a mortalidade de 40% para 31% (42), prevenindo o desenvolvimento de LAP e atenuando a ativação da resposta imunitária, havendo diversos estudos que comprovam que diminuem, essencialmente, a concentração de citocinas pró-inflamatórias. (43)

De facto, os estudos inicialmente realizados não se revelavam consistentes, havendo uns que relatavam um efeito protetor utilizando volumes correntes, em contraste com outros que não detetavam melhorias significativas. No entanto, as dúvidas dissiparam-se num ensaio clínico levado a cabo pela *National Heart Lung and Blood Intitute* (NHLBI) envolvendo 861 pacientes com LAP/SDRA, em que estes foram randomizados para posterior aplicação de volumes de 12 ml/Kg ou de 6 ml/kg, tendo-se verificado uma redução de 22% da mortalidade em pacientes que recebiam volumes reduzidos. (40,42)

Mesmo assim, e apesar da utilização de volumes reduzidos de proteção pulmonar ser, até ao momento, a única intervenção em que está comprovada a redução da mortalidade, a sua introdução na prática clínica continua a ser feita muito timidamente: um estudo feito por Weinert dois anos após a publicação dos dados recolhidos pelo ensaio da NHLBI concluiu que o volume médio administrado aos pacientes rondava os 10 ml/kg. (40,44)

**Elevada PEEP versus baixa PEEP:** Utilizando uma PEEP baixa, há um maior esforço por parte da zona do pulmão que não foi afetada, constituindo, assim, um maior risco de agravamento da lesão induzida pela ventilação. Em contraste, uma PEEP elevada (“*open lung strategy*”) pode minimizar as hipóteses desta lesão ocorrer, na medida em que, ao

manter a pressão alveolar superior à pressão atmosférica, impede o colapso alveolar e melhora as próprias trocas gasosas, levando, conseqüentemente, a uma maior taxa de oxigenação. (45)

Para além disso, o NHLBI conduziu um estudo com 519 pacientes com LAP/SDRA e que estavam a ser ventilados recorrendo a volumes correntes de oxigénio e testaram os efeitos de uma PEEP elevada com uma PEEP baixa, não encontrando, posteriormente, diferenças a nível de sobrevivência, propondo, no final, que talvez o ideal seja a utilização de um valor de PEEP moderado. (45)

**Outras estratégias:** Têm sido estudadas outras alternativas para além das duas vertentes acima enunciadas, das quais se destacam a oxigenação membranar extracorporal (em que estudos prospetivos em pacientes com LAP/SDRA não demonstraram ainda ter utilidade), o decúbito dorsal e a ventilação oscilatória de alta frequência. No entanto, estas necessitam de mais estudos para comprovar a sua real utilidade neste contexto. (40)

### 3.1.2. Decúbito ventral

O uso do decúbito ventral foi pela primeira vez descrito em 1974, sendo que os primeiros estudos do seu efeito não retiraram conclusões motivadoras. (46) Contudo, verificou-se que tal era devido à falta de critérios mais seletivos (por exemplo, foram incluídos pacientes com SDRA ligeira; a duração do decúbito ventral era demasiado curta e, na altura, não se conheciam outros efeitos protetores, como um baixo volume de PEEP). (47).

Este procedimento é bastante utilizado quando se pretende proteger o pulmão, visto que a distensão alveolar varia consoante a gravidade e as relações anatómicas com a caixa torácica e com o coração. Durante o decúbito ventral, há, portanto, uma redução do peso efetuado pelas zonas colapsadas do pulmão e pelo próprio coração contra as regiões funcionais, mantendo, conseqüentemente, a perfusão pulmonar intacta. (47,48)

Estudos mais recentes verificaram que o decúbito ventral diminui a mortalidade quando está associado a uma ventilação protetora (baixos volumes), apresentando um risco relativo de 0,74 quando comparado com o decúbito ventral enquanto intervenção isolada. Concomitantemente, concluiu-se que o decúbito ventral, quando associado a volumes altos, não afeta a mortalidade (risco relativo de 0,98). Entretanto, análises mais detalhadas constataram que o período ideal de tempo nesta posição é, no mínimo, 16 horas por dia, tempo a partir do qual se verificaram as reduções mais significativas da mortalidade. (47)

Relativamente a outros parâmetros, notou-se ainda um aumento da relação  $PaO_2 / FiO_2$  na ordem dos 25 a 36%, o que se revelou consistente com dados anteriores (48).

Não obstante os seus efeitos benéficos, há que ter em consideração alguns efeitos nocivos da exposição prolongada a este tipo de postura, sendo muito comuns a existência de úlceras de pressão e obstrução do tubo endotraqueal. A deslocação do tubo toracostómico é maior em pacientes em decúbito ventral, facto esse que pode ainda ser mais grave em unidades hospitalares que não possuam o conhecimento nem a experiência para lidar com estas situações. (47)

### 3.1.3. Oxigenoterapia

A oxigenoterapia é uma decisão muitas vezes tomada em doentes em estado crítico e que não conseguem respirar de forma eficiente, sendo usadas concentrações de  $O_2$  superiores ao normal (isto é, valores percentuais que ultrapassam os 21%), por forma a manter a viabilidade dos órgãos vitais e a homeostasia. No entanto, uma exposição a um meio hiperóxico é tóxico para as células, em especial para os pulmões (que, perante o stress oxidativo causado, leva a lesão da barreira alvéolo-capilar), uma vez que é o órgão de maior exposição a esta terapêutica.(20)

Portanto, a geração de ROS assume-se como o grande problema desta intervenção, seja direta ou indiretamente por exacerbação de mecanismos inflamatórios que, por si só, geram grandes quantidades de ROS. (20)

A superóxido dismutase extracelular (EC-SOD ou SOD3) é o principal mecanismo de combate ao excesso de ROS, sendo uma enzima secretada para o espaço extracelular e que está presente em vários compartimentos. No entanto, a nível pulmonar, a SOD3 é, em grande parte, produzida pelos pneumócitos de tipo II. De resto, os níveis de SOD estão diretamente relacionados com a sensibilidade individual e com a probabilidade de desenvolver lesão pulmonar aquando de tratamentos hiperóxicos. Em modelos laboratoriais, ratos *knock-out* para a SOD mostraram-se mais propensos a desenvolver LAP quando submetidos a oxigenoterapia.(49) Neste mesmo estudo, amplificou-se o gene para a SOD nas vias aéreas e nos pneumócitos, tendo-se verificado que os ratos obtinham um maior grau de tolerância a esta terapêutica. (20)

### 3.2. Abordagens Farmacológicas

Perante as estratégias (essencialmente ventilatórias) estudadas, urge ainda encontrar alguns agentes de índole farmacológico que possam complementar as abordagens acima referenciadas.

Até à data, nenhum agente farmacológico demonstrou reduzir a mortalidade. A administração de surfactante, de resto, foi das primeiras tentativas descritas na década de 80 mas, até agora, muitas foram as moléculas estudadas e que não constituem, por si só, uma terapêutica eficaz para a LAP/SDRA. (41)

Não obstante, o racional terapêutico inerente a grande parte dos fármacos abaixo descritos tem como base o conceito de que os leucócitos intervêm de uma forma preponderante na progressão da doença, abrindo espaço a que novas moléculas possam ser testadas e, porventura, possam abrir caminho a uma redução dos ainda preocupantes índices de mortalidade e morbidade verificados atualmente. (22)

#### 3.2.1. Surfactante

O surfactante, um complexo lipoproteico secretado pelos pneumócitos de tipo II, é importante na diminuição da tensão superficial dos alvéolos, existindo três proteínas associadas ao surfactante: SP-A, SP-B e SP-C. As duas últimas são de menor

tamanho, intervindo na formação da monocamada de surfactante que acaba por revestir os alvéolos, ao invés da SP-A, uma proteína de maior tamanho e que possui funções mais complexas, principalmente a nível da regulação das vias secretoras e de *reuptake*, para além de ter um papel importante em alguns processos de cariz imunitário. (40)

A terapêutica de substituição de surfactante mostrou-se benéfica em crianças com Síndrome de Dificuldade Respiratória, uma patologia em que o pulmão, derivado do seu grau de imaturidade, não consegue produzir surfactante. No entanto, o cenário em quadros de LAP/SDRA é mais complexo, visto que há todo um processo inflamatório e produtos libertados pelas células (ROS, por exemplo) que diminuem drasticamente a quantidade de SP-A e SP-B no pulmão, aumentando a tensão alveolar, o que pode provocar atelectasia e diminuição da complacência pulmonar. (40)

Diversos estudos tentaram verificar a viabilidade da introdução desta terapêutica na prática clínica. Enquanto ensaios de fase I e II demonstraram uma melhoria na oxigenação e uma tendência para a diminuição da mortalidade, existem atualmente ensaios de fase III que apontam para a não existência de qualquer utilidade terapêutica. Tal presunção pode ser explicada por várias vertentes: a dose administrada pode ter sido insuficiente; a própria biodisponibilidade do surfactante é muito reduzida (apenas 5% atinge os alvéolos após administração endobronquial); o facto de se ter utilizado um surfactante artificial pode ter influenciado as conclusões (é sempre preferível recorrer a surfactante de origem natural) e, por último, a própria tendência para o surfactante se depositar em alvéolos funcionais e não em alvéolos danificados. (40)

### 3.2.2. Vasodilatadores inalados

A LAP/SDRA é caracterizada por uma vasoconstrição acentuada em regiões do pulmão não-ventiladas concomitante com fenómenos de vasodilatação nas regiões não-comprometidas, causando uma deficiente distribuição do fluxo sanguíneo pulmonar, que, por sua vez, resulta num aumento do *shunt* “*right-to-left*” intrapulmonar, hipertensão pulmonar e hipoxemia severa. (40)

Consequentemente, terapêuticas que provoquem, de uma forma mais seletiva possível, vasodilatação nas regiões afetadas do principal órgão do sistema respiratório podem auxiliar na redução da pressão arterial pulmonar, do *shunt* pulmonar e num aumento da razão  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ . Até agora, foram consideradas duas intervenções farmacológicas neste campo: a inalação de monóxido de azoto (NO) e/ou de prostaciclina. (40)

Relativamente ao monóxido de azoto, trata-se, indubitavelmente, de um potente vasodilatador. Devido ao facto de ser rapidamente inativado por contacto com a hemoglobina, possui um forte efeito local sem causar efeitos sistémicos significativos. Devido a esta e outras propriedades promissoras, foram efetuados inúmeros estudos, inicialmente em modelos animais e, depois, em humanos. (40) Roissaint *et al.* comparou em 9 pacientes com LAP/SDRA a inalação de 18 ppm de NO *versus* a administração intravenosa (IV) de prostaciclina ( $\text{PGI}_2$  na proporção de 4 ng/kg de peso) e verificou-se que ambas as estratégias tiveram um efeito semelhante a nível da redução da pressão arterial pulmonar. No entanto, os pacientes aos quais foram administrados NO não exibiram efeitos adversos sistémicos de grande magnitude. Adicionalmente, melhoraram os níveis de oxigenação e viram diminuída a fração do *shunt* intrapulmonar de 36% para 31%. (50)

Estas constatações promissoras foram testadas com mais afinco, na tentativa de verificar se, a nível dos *outcomes* verificados na prática clínica, a inalação de NO podia ser algo inovador. Porém, estudos subsequentes demonstraram que, apesar de poder causar melhorias a nível da oxigenação e no controlo hemodinâmico, não conseguia reduzir significativamente os níveis de mortalidade. (40) Mais, como a maioria dos pacientes com LAP acaba por morrer de disfunção múltipla de órgãos e não por processos de hipoxemia, pequenas alterações na oxigenação podem não ser tão relevantes quanto desejado. (51)

Paralelamente, foram descritos alguns efeitos adversos desta terapêutica, embora de incidência considerada rara, sendo um aumento da metahemoglobinémia e da concentração de dióxido de azoto, aliado ou não a um aumento da disfunção renal, os mais frequentes, para além da óbvia sujeição do indivíduo a um maior grau de *stress* oxidativo. É de ressaltar, no entanto, que estes efeitos costumam surgir em pacientes

que já foram alvo de múltiplas administrações ou em casos em que lhes foram aplicadas doses de NO superiores ao normal.(51)

Portanto, a evidência atual demonstra que a inalação de NO não tem um impacto importante nos *outcomes* clínicos e não deve ser recomendado como uma terapêutica a instaurar num quadro de SDRA. Não obstante, devido à sua capacidade de melhorar a oxigenação, pode ser usada como medida de *rescue* em pacientes com hipoxemia refratária à ventilação. (51)

No que diz respeito à prostaciclina (também denominada de PGI<sub>2</sub>), é um produto endógeno resultante do metabolismo do ácido araquidónico, causando vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, conferindo ainda propriedades anti-inflamatórias através da inibição da ativação de neutrófilos e macrófagos. (52)

A inalação de prostaciclina também provoca uma vasodilatação seletiva a nível pulmonar, com conseqüente aumento da oxigenação, diminuição da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar. Atualmente estão aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) a PGI<sub>2</sub> (cuja denominação comum internacional é epoprostenol, sendo o nome comercial Flolan®), que é usada por via intravenosa no tratamento da hipertensão pulmonar primária, e a PGE<sub>2</sub>. (40)

Estudos envolvendo a administração de PGI<sub>2</sub> na forma de aerossol, quando comparada com a inalação de NO, verificaram que ambos tinham um efeito semelhante a nível da vasculatura pulmonar e na oxigenação. No entanto, verificou-se que o grau de seletividade da PGI<sub>2</sub> é dependente da dose, havendo o risco de efeitos adversos sistémicos para doses maiores, embora o seu tempo de semivida seja reduzido. Aliado ao facto da dose de PGI<sub>2</sub> ser difícil de quantificar (quando comparado com o mesmo processo para o NO), porque as características do nebulizador podem variar a dose administrada, existem atualmente muito poucos estudos que constatem o seu efeito a nível do *outcome* na prática clínica. (40)

Hoje em dia, não há indícios de que a inalação de prostaciclina, enquanto medida terapêutica, reduzam a mortalidade, podendo ser eventualmente usadas em tratamentos de *rescue* em detrimento do NO quando se procura uma alternativa mais barata que este último gás. (40)

### 3.2.3. Vasodilatadores sistémicos

Neste campo, destaca-se a administração de uma prostaglandina específica: a PGE<sub>1</sub>. Trata-se de uma prostaglandina endógena que possui propriedades vasodilatadoras, intervindo igualmente na inibição da ativação neutrofílica. (40)

Quando administrada por via intravenosa, provoca uma vasodilatação e hipotensão sistémica, prendendo-se o benefício da sua administração sistémica com as suas intensas propriedades anti-inflamatórias que advêm da inibição da ativação dos neutrófilos, com conseqüente diminuição da permeabilidade capilar. (40)

Os primeiros estudos a abordarem esta alternativa terapêutica revelaram-se promissores, na medida em que se verificou uma redução dos níveis de mortalidade. Porém, estudos mais alargados verificaram que, afinal, não só não reduzia a mortalidade como também não possuía um efeito significativo ao nível da atividade dos LPMN. Este facto, porventura, pode ser explicado pela utilização de doses não-tóxicas. (53–56)

Mais recentemente, tentou-se estudar as potenciais vantagens de formulações lipossómicas contendo PGE<sub>1</sub>. Contudo, continuou-se a não verificar uma redução significativa da mortalidade, nem dos níveis de oxigenação e complacência pulmonar, pelo que se pode inferir que a administração intravenosa de prostaglandinas não constitui uma terapêutica recomendada para a LAP/SDRA. (40)

### 3.2.4. Fármacos anti-inflamatórios

A *tissue host defense response* (HDR) é um processo de destruição, diluição ou contenção de um agente agressor, consistindo em três passos fundamentais (ver tabela 3.1.): inflamação, coagulação e reparação tecidual, passos esses que coincidem com a evolução histológica verificada na SDRA. Qualquer desregulação destes mecanismos leva a uma exacerbação da resposta imunitária, agravando e atrasando a resolução da patologia.(17)

**Tabela 3.1. Componentes da *tissue host defense response* (adaptado de (17))**

Inflamação	Coagulação	Reparação Tecidual
Vasodilatação e estase	Ativação da coagulação	Angiogénese
Aumento da expressão de moléculas de adesão	Inibição da fibrinólise	Proliferação epitelial
Aumento da permeabilidade da microvasculatura com formação de edema exsudativo	Coagulação intravascular	Proliferação e migração de fibroblastos
Extravasamento de leucócitos*	Deposição extravascular de fibrina	Deposição de matriz extracelular e remodelação
Libertação de produtos leucocitários capazes de provocar dano tecidual		
<b>*Inicialmente de LPMN's; mais tarde, de monócitos</b>		

Derivado do grau exacerbado e descontrolado que se verifica no processo inflamatório inerente à LAP/SDRA, seria contraproducente não explorar a possível implementação de agentes farmacológicos que possuem mecanismos de ação com vista a diminuir um processo inflamatório. Muitas foram as moléculas estudadas, sendo que abaixo se apresentam as mais relevantes para o presente e o futuro nesta área de intervenção.

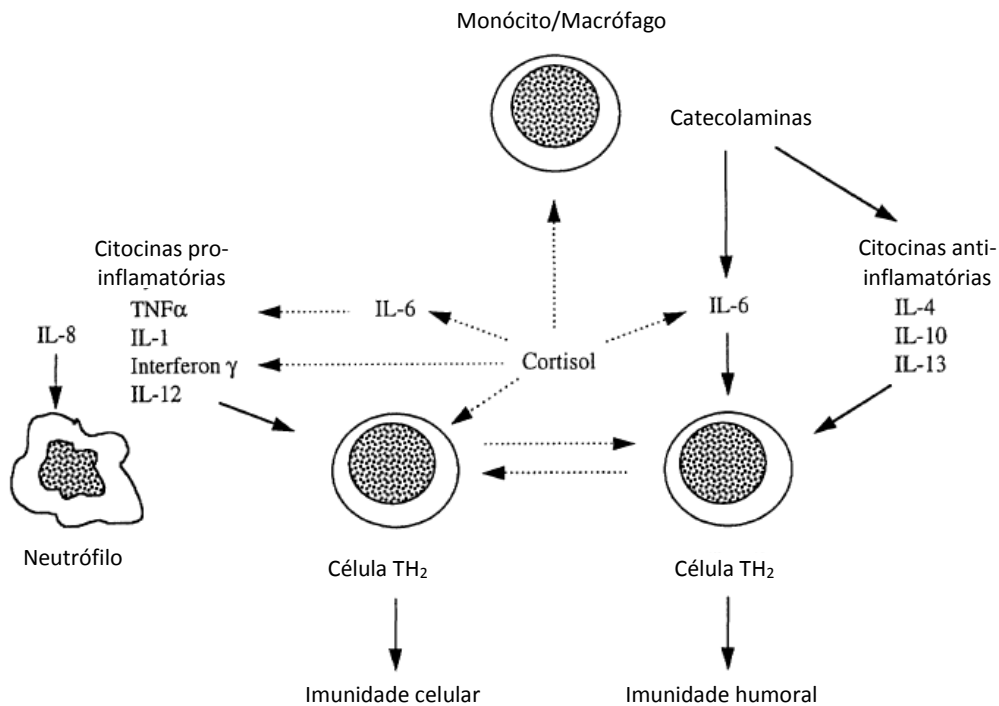
**Corticosteroides:** O complexo formado entre o recetor- $\alpha$  dos glucocorticoides (GR- $\alpha$ ) e o próprio glucocorticoide (GC-GR- $\alpha$ ) é o mais importante inibidor fisiológico da inflamação. Aquando de um estímulo de carácter inflamatório, o equilíbrio entre a transcrição do NF- $\kappa$ B e a presença do GR- $\alpha$  (estimulado pelos GC endógenos e exógenos) é que vai determinar o grau de transcrição de determinados genes importantes para o sistema imunitário. (17)

O eixo hipotálamo-hipófise, aquando da presença de citocinas inflamatórias em excesso, é estimulado a secretar adrenocorticotrofina (ACTH) que induz a síntese de cortisol por parte das suprarrenais para diminuir a inflamação. O cortisol, que não é armazenado pelas suprarrenais, é rapidamente introduzido na célula para estimular a síntese de GR- $\alpha$ , que vai, conseqüentemente, formar complexos com o NF- $\kappa$ B para impedir a interação deste último com o DNA (ver figura 3.1.). Durante a SDRA, o efeito do cortisol endógeno é reduzido devido a uma diminuição da atividade do GR- $\alpha$ , o que leva a uma exacerbação da ativação de células imunitárias por parte do NF- $\kappa$ B, proporcionando um *down-regulation* da inflamação sistémica entretanto gerada. (17)

Os corticosteroides exercem o seu efeito através da ligação a recetores dos glucocorticoides presentes no citoplasma, sendo depois translocados para o núcleo e, após dimerização, modulam a taxa de transcrição de diversos genes responsáveis pela resposta não só inflamatória como também cardiovascular, suprimindo a produção, por exemplo, de diversas citocinas como IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF. Ocorre também um decréscimo da ativação de fatores de transcrição tais como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, que estão envolvido no *up-regulation* de diversos genes inflamatórios e que são ativados como sinal de uma resposta inflamatória extracelular. (57)

Mais recentemente, assumiu-se que os corticosteroides também intervêm na expressão de diversas moléculas de adesão como a ICAM-1 e a E-selectina, diminuindo também a síntese de fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase e a sintase do monóxido de azoto indutível, para além de ter um papel significativo na degradação de colagénio de tipo I (havendo, inclusive, um modelo experimental de LAP que comprovou que os corticosteroides impedem a deposição excessiva de colagénio). (40)

Pensa-se que, no contexto da SDRA, o fator que mais influencia o *outcome* não é a causa etiológica mas sim a capacidade de resposta imunitária por parte de cada indivíduo, mais concretamente a nível do NF- $\kappa$ B (responsável pela transcrição de mais de 100 genes). (57)



**Figura 3.1. – Função do cortisol e das citocinas pró e anti-inflamatórias na imunidade humana. A tracejado estão indicados fenômenos de inibição, enquanto que, com um traço contínuo, estão representados fenômenos de ativação (adaptado de (57))**

Relativamente a ensaios clínicos, diversos testaram o uso deste tipo de moléculas enquanto medida profilática para a LAP.(40) Weigelt constatou, em 1985, que pacientes com elevada probabilidade de desenvolverem SDRA e nos quais foi administrado, por via intravenosa, metilprednisolona (na dose de 30 mg/kg de peso durante 6h ou 48h) não só desenvolveram com maior frequência SDRA como também sofreram de um maior número de complicações de origem infecciosa, quando comparados com o grupo placebo. No entanto, não se registaram diferenças a nível da mortalidade (58). Dois anos mais tarde, um estudo levado a cabo por Bone *et al.* concluiu as mesmas premissas, só que, adicionalmente, conseguiu verificar que pacientes que recebiam metilprednisolona (na dose de 30 mg/kg de peso durante 6h ou 24h) tinham uma maior taxa de mortalidade que a do grupo placebo. (59)

Mais recentemente, outros ensaios clínicos têm vindo a suportar o paradigma de que não há efeitos benéficos na administração de corticosteroides nas fases precoces de LAP. (40) Num ensaio clínico de 2006 com 180 pacientes com SDRA persistente durante 7 dias, não foram encontrados benefícios a nível da mortalidade. Entretanto, notou-se uma melhoria da fisiologia pulmonar passados 3 a 7 dias da administração de metilprednisolona. Mesmo assim, apesar de se notarem melhorias também a nível do número de dias (num espaço de um mês) sem necessidade de ventilação e/ou sem permanecer nos cuidados intensivos, a duração do tempo de internamento não sofreu alterações significativas. (60)

Ainda reportando para este mesmo estudo, pacientes que receberam metilprednisolona conseguiam mais precocemente respirar sem qualquer tipo de assistência. Não obstante, a probabilidade de voltarem a necessitar de ventilação verificou-se maior, sendo que neste aspeto pode estar a “chave” pela qual a promissora utilidade de corticosteroides não se reflete nas taxas de sobrevivência, já que a necessidade destes pacientes em voltarem a ser assistidos para permitir a respiração resulta de complicações relacionadas com a terapêutica: aumento da gravidade (e não da incidência) de neuromiopia, choque derivado da interrupção destes fármacos, e ainda complicações que derivam de uma fibroproliferação acentuada. (60)

Estudos subsequentes verificaram que a administração de glucocorticoides deve ser efetuada por perfusão, para um melhor controlo das variações da glicémia, e deve ser evitada a coadministração de outros dois grupos de medicamentos: bloqueadores neuromusculares (para minimizar a fraqueza neuromuscular adjacente ao tratamento) e etomidato (já que inibe a síntese de cortisol). Verificou-se também que o aumento do risco para infeções secundárias apenas advém da utilização de doses maiores e não em doses moderadas. (17,60)

Em modelos de LAP, notaram-se efeitos benéficos a nível da *clearance* do edema pulmonar e da excessiva produção de colagénio, desde que a administração de corticosteroides fosse prolongada. Portanto, não só é importante prolongar o tratamento como também não descontinuá-lo, pois os efeitos nefastos que daí advêm podem agravar a situação do paciente. (57)

O facto de os corticosteroides não serem recomendados para a fase precoce da LAP fez com que se desenhassem estudos observacionais e ensaios clínicos visando o seu efeito na fase tardia da doença. Porém, chegou-se à mesma conclusão de que estes fármacos não devem ser utilizados quer como meio profilático, quer como estratégia terapêutica para ambas as fases (precoce e tardia) da LAP. (40)

**Cetoconazol:** Para além das suas propriedades antifúngicas, o cetoconazol é um importante inibidor da síntese de tromboxanos A<sub>2</sub> (que se assumem como um potente vasoconstritor e mediador da LAP induzida por sépsis) e de leucotrienos. Para além disso, foi demonstrada a sua capacidade de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por parte dos macrófagos alveolares. Estudos comparativos entre a administração de cetoconazol por via oral com placebo demonstraram não só diminuir a incidência de SDRA como também o tempo de internamento nos cuidados intensivos. No entanto, um estudo com um número alargado de pessoas por parte da *NHLBI ARDS network* demonstrou não haver diferenças a nível da mortalidade. Consequentemente, o cetoconazol poderá ser usado como medida profilática e não como intervenção terapêutica, embora sejam necessários mais estudos para sustentar esta posição. (40)

**Lisofilina e Pentoxifilina:** A pentoxifilina, inibidor da fosfodiesterase, é um derivado da lisofilina, diferindo desta no que diz respeito ao mecanismo de ação pelo qual desencadeiam uma resposta anti-inflamatória. (40)

A pentoxifilina inibe quer o fenómeno de quimiotaxia quer a ativação de neutrófilos, participando também na supressão da libertação de TNF- $\alpha$  por parte dos macrófagos alveolares em resposta à endotoxina em modelos animais de sépsis e LAP/SDRA. Para além disso, este fármaco já demonstrou em modelos animais ser capaz de reduzir a permeabilidade endotelial e o edema pulmonar. Contudo, urge ainda transpor estes resultados para experiências em humanos para comprovar a sua real utilidade para posterior introdução na prática clínica. (40)

Relativamente à lisofilina, também diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) e inibe não só a acumulação de neutrófilos como

também a formação de edema. Contrariamente à pentoxifilina, exerce parcialmente o seu efeito anti-inflamatório por inibir a liberação de ácidos gordos livres que entretanto foram oxidados como resposta ao elevado *stress* oxidativo a que as células estão sujeitas neste tipo de patologias. (40)

Em modelos animais de sépsis e SDRA, foram revelados dados promissores no que diz respeito ao aumento da taxa de sobrevivência em ratinhos e porcos quando submetidos a tratamentos com lisofilina. Apesar da NHLBI ter conduzido um ensaio clínico de fase III recorrendo a este fármaco, o mesmo acabou por ser interrompido, faltando, portanto, dados acerca do seu efeito em humanos para posterior análise. (40)

### 3.2.5. Fármacos antioxidantes

Conforme supracitado, as ROS assumem um papel importante na fisiopatologia da LAP/SDRA, nomeadamente a nível da integridade da barreira alvéolo-capilar. Existem três grandes antioxidantes endógenos: a SOD, a catalase e a glutathione, sendo que, em pacientes com LAP/SDRA, estes encontram-se diminuídos, surgindo, então, a necessidade da comunidade científica em testar novas substâncias que exercem um efeito análogo na tentativa de contrariar este *deficit*.

**N-Acetilcisteína e Procisteína:** Quer a N-Acetilcisteína quer a procisteína restauram os níveis celulares de glutathione, através do metabolismo do seu precursor: a cisteína. (40)

Apesar de alguns ensaios em animais terem revelado melhorias significativas relativamente a parâmetros bioquímicos e à própria lesão histológica, a transposição destes dados para os humanos é, ainda, controversa, não se tendo verificado melhorias nem na mortalidade nem nos parâmetros fisiológicos pulmonares. (40) No entanto, Sutter *et al.* verificou melhorias na oxigenação e na necessidade de suporte ventilatório em pacientes que recebiam 40 mg/kg/dia de N-Acetilcisteína durante 3 dias, quando comparados com o grupo placebo. (61)

Após estes ensaios de fase III terem-se revelado encorajadores, um outro ensaio de fase III entretanto implementado foi interrompido devido à grande taxa de mortalidade verificada no grupo de intervenção, pelo que ainda restam apurar muitos dados que sustentem a viabilidade da utilização de N-Acetilcisteína e da procisteína na terapêutica da LAP/SDRA. (40)

**Albumina:** A albumina é a proteína mais abundante no plasma, exercendo um efeito antioxidante através da capacidade oxidativa do resíduo tiol que possui à sua superfície. De resto, os valores de tiol plasmáticos estão relacionados com o *outcome*, na medida em que estudos observacionais reportaram que os sobreviventes possuíam valores de tiol mais acentuados, sendo que, à medida que a lesão se ia resolvendo, estes valores aumentavam na mesma proporção. De resto, a própria hipoproteinémia está documentada como um fator de risco para o desenvolvimento de LAP e está relacionada, em geral, com um pior *outcome* em doenças críticas. (40,41)

Em 2004, Quinlan *et al.* demonstraram num estudo prospetivo, por randomização de 20 pacientes com SDRA submetidos a albumina *versus* placebo, que a administração de albumina influenciava positivamente a capacidade do organismo em reagir a situações de *stress* oxidativo por aumento da concentração de resíduos tiol disponíveis para neutralizar as ROS entretanto formadas. (62)

Apesar de não se ter mensurado o impacto a nível dos *outcomes*, este estudo serviu como ponto de partida para um outro mais alargado, em que, utilizando 6997 pacientes, não se registaram diferenças significativas a nível de mortalidade quando era comparada a administração de albumina *versus* placebo. No entanto, há que considerar que este estudo foi realizado numa unidade de cuidados intensivos, onde nem todos os pacientes que foram alvo de intervenção sofriam, efetivamente, de SDRA (de facto, apenas 127 foram diagnosticados com SDRA), pelo que estudos mais uniformizados no contexto da LAP necessitam, ainda, de ser efetuados. (63)

### 3.3. Novas perspectivas da terapêutica da LAP/SDRA

#### 3.3.1. Anticoagulação

A ativação das vias da coagulação e a supressão da fibrinólise, bem como a deposição extra e intravascular de fibrina, está bem patente na fisiopatologia da LAP/SDRA, sendo fatores preponderantes para explicar o aumento da resistência vascular pulmonar bem como o aumento do “espaço morto” no decurso desta patologia. Portanto, abaixo estão relatadas algumas estratégias que podem atuar nesta área.

**Inibidor do fator tecidual:** O fator tecidual ativa a via extrínseca da coagulação por formação de um complexo com o fator V, posteriormente ativando o fator X. O inibidor do fator tecidual (TFPi) inibe a formação deste complexo, tendo sido provada a sua capacidade de reduzir a mortalidade em 20% em modelos animais de sépsis. Não obstante, um ensaio clínico de fase III foi interrompido devido ao elevado risco de hemorragia que se verificou nos pacientes. Portanto, e apesar de não existirem modelos de LAP/SDRA em que o TFPi seja utilizado, a similaridade que esta proteína possui a nível de ativação da coagulação com modelos de sépsis permite inferir que pode ser uma alternativa a explorar no futuro. (40)

**Anti-trombina III:** A anti-trombina III inibe fatores de coagulação entretanto ativados como o IXa, Xa e a trombina. Modelos animais de LAP/SDRA demonstraram que houve melhoria a nível de características fisiológicas do pulmão aquando da administração de anti-trombina III. Infelizmente, um ensaio clínico de fase III contendo 2314 pacientes com sépsis grave demonstrou não haver efeitos a nível da redução da mortalidade, havendo inclusive um aumento do risco hemorrágico em pacientes que tomavam concomitantemente heparina enquanto medida profilática. (40)

**Proteína C ativada:** A proteína C ativada (APC), conforme abordado anteriormente, é uma proteína endógena que estimula a fibrinólise e diminui o processo inflamatório. Num ensaio clínico de fase III, ficou demonstrada a sua capacidade de reduzir a

mortalidade de pacientes com sépsis grave de 30% para 24%. No entanto, a falta de pacientes neste estudo com LAP coexistente tornam os dados de difícil transposição para o contexto desta última patologia. (40)

No entanto, estão documentados vários estudos que revelam níveis reduzidos de APC em pacientes com SDRA relativamente a pessoas saudáveis, estando até essas mesmas concentrações diminutas relacionadas quer com o *outcome* quer com a própria mortalidade. Contudo, há ainda poucos trabalhos que permitam assegurar com afinco que esta proteína se trata, efetivamente, de uma terapêutica segura. (40)

### 3.3.2. Agonistas $\beta_2$

A *clearance* do fluido acumulado no espaço alveolar está relacionado com o prognóstico da doença. Derivado das extensas lesões a nível das células epiteliais alveolares, os canais iónicos que transportam fluidos para o interstício tornam-se diminutos. Perante isto, os agonistas  $\beta_2$  têm a capacidade de acelerar a *clearance* do fluido edematoso por aumentarem o transporte transepitelial de sódio e cloro. O seu papel a nível da diminuição da permeabilidade alveolar e da diminuição da produção de citocinas também está documentado. (40)

Por exemplo, a administração intravenosa de salbutamol já demonstrou reduzir a quantidade de água extravascular pulmonar. Porém, a incidência de arritmias no grupo de tratamento levanta algumas dúvidas sobre a sua viabilidade e segurança aquando da sua introdução na prática clínica. (41)

Wright *et al.*, de resto, efetuou um ensaio clínico com 8 pacientes com SDRA, em que lhes foi administrado um agonista  $\beta_2$  aerossolizado, tendo tido efeitos a nível da complacência pulmonar. No entanto, esta é apenas uma referência a um número muito reduzido de estudos que há sobre estes fármacos em particular.(64)

### 3.3.3. Fator de crescimento dos queratinócitos

O fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) integra a família dos fatores de crescimento dos fibroblastos. Derivado do facto do seu recetor apenas ser produzido

em células epiteliais, torna-se necessário o seu estudo como potencial alternativa terapêutica para lesões do foro epitelial, na qual se insere, embora parcialmente, a LAP. Para além de intervir no crescimento celular, o KGF possui um papel importante como fator anti-inflamatório. (40)

O seu efeito protetor foi, de resto, demonstrado em estudos de LAP. Os mecanismos pelos quais o KGF atua são variados, desde a diminuição da apoptose das células epiteliais, proteção a nível dos estímulos nocivos celulares, aumento da produção de surfactante, aumento da proliferação de pneumócitos de tipo II, entre outros. No entanto, estes efeitos supracitados só foram constatados quando os pacientes foram alvo de um tratamento prévio com KGF. Não obstante, derivado da LAP ser uma lesão que se estende no tempo, podem existir condições para que o KGF surta efeito, provavelmente a longo prazo. (40)

#### 3.3.4. Células estaminais

As células estaminais podem ser agrupadas em derivadas do tecido adulto (TDSC, do inglês *tissue derived stem cells*) ou em embrionárias (ECS, do inglês *embryonic stem cells*), sendo a principal diferença entre ambas o facto de as ECS poderem proliferar-se indiferenciadamente, tendo até características neoplásicas, enquanto que as TDSC possuem um grau de diferenciação mais restrito. (65)

Noutras áreas clínicas, verificou-se que células epiteliais e endoteliais de dadores foram identificadas no pulmão de pessoas alvo de transplantação, o que sugeriu a hipótese das células estaminais terem a capacidade de migrar para os órgãos lesados e modular a resposta inflamatória, intervindo igualmente na reparação de órgãos. (65)

No contexto da LAP/SDRA, as TDSC assumem um especial grau de importância, em particular dois subtipos: as células progenitoras endoteliais (EPC, do inglês *endothelial progenitor cells*) e as células estromais mesenquimatosas (MSC, do inglês *mesenchymal stromal cells*), uma vez que ambas já demonstraram melhorar os *outcomes* em estudos pré-clínicos. (65)

Quanto às primeiras, as EPC apenas se conseguem diferenciar em células endoteliais, pelo que a sua utilização como restaurador da microvasculatura das vias

respiratórias poderá ser interessante de explorar. De resto, a contagem nos primeiros dias de unidades formadoras de colônia (CFU) de EPC pode ser preditivo do *outcome*, já que uma maior mobilização destas células está assegurada para o local da lesão, promovendo, simultaneamente, uma resolução mais eficaz. Vários modelos animais descrevem que as EPC melhoram o cenário de edema pulmonar em LAP induzida por LPS. Da mesma forma, não foram detetadas EPC em pulmões saudáveis, sustentando a ideia de que, aquando da lesão, são produzidas substâncias quimioatrativas que provocam a migração destas células estaminais (houve também resultados sobreponíveis quando se utilizaram MSC). (65)

No que diz respeito às MSC, são essencialmente extraídas da modela óssea (podendo também ser provenientes, embora em menor quantidade, do tecido adiposo, do sangue presente no cordão umbilical e da placenta), tendo sempre de passar, posteriormente, por um processo de expansão *in vitro* devido à quantidade reduzida que se obtém após a extração. (65,66).

No pulmão, a capacidade deste tipo de células estaminais em se diferenciar em vários tipos (pneumócitos de tipo I ou II, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais bronquiolares) tornam-nas um importante alvo a estudar como possível terapêutica. Adicionalmente, possuem outras virtudes como não serem imunogénicas (têm uma expressão constitutiva relativamente baixa de MHC I e MHC II, para além de não possuírem coreceptores que ativam a resposta imunitária celular, como CD80 e CD86), produzirem fatores de crescimento (o que lhes confere propriedades parácrinas) e inibirem a proliferação de linfócitos. (65)

Os primeiros estudos focavam a sua aplicação como meio compensatório e auxiliar na reparação do dano verificado no epitélio alveolar, apesar de, mais recentemente, a comunidade científica ter envidado esforços para estudar com mais afinco as propriedades parácrinas destas células, o seu papel limitativo da lesão pulmonar e, em contraste, contributivo no processo de resolução. (66) Porém, os trabalhos de Ortiz e Xu foram muito importantes neste campo, na medida em que demonstraram que a administração de MSC em modelos animais de LAP diminuía o grau de lesão pulmonar e até aumentava a sobrevivência, sendo que para tal não era fundamental a presença destas células nos pulmões mas sim o seu efeito parácrino,

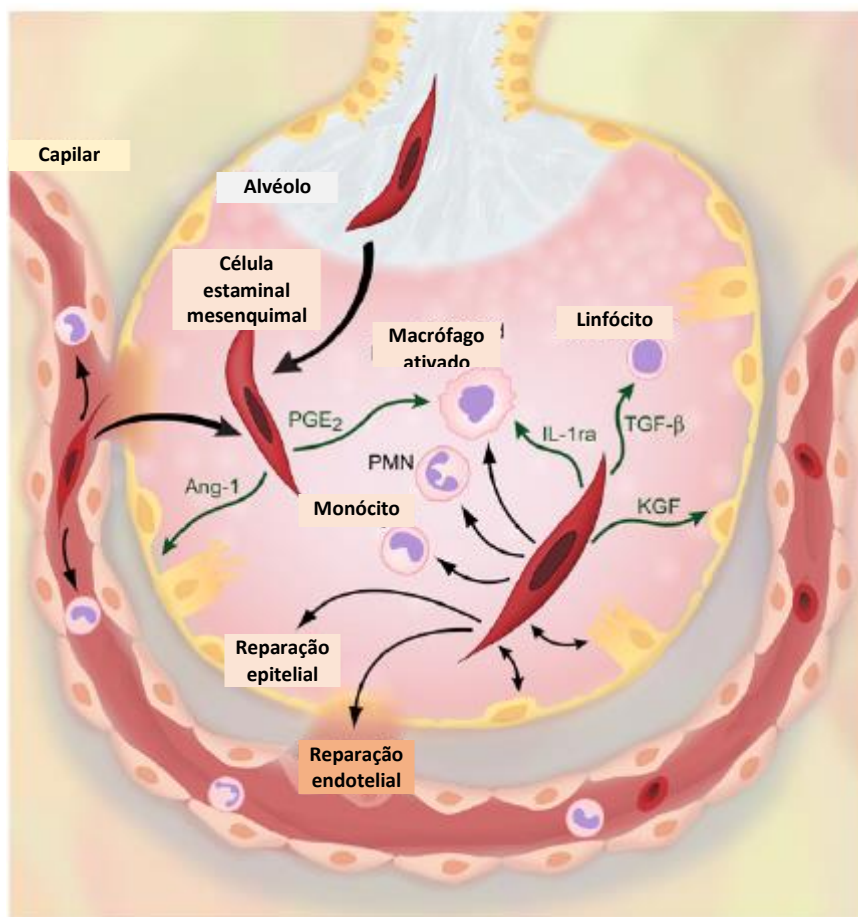
responsável pela diminuição da migração de neutrófilos para as zonas lesadas e pela diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e MIP-2, por exemplo), contrastando com o aumento da concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-10, IOL-13), conforme é possível verificar na figura 3.2. (66–68)

Paralelamente, testou-se a possibilidade das MSC produzirem KGF, um importante modulador da reparação dos tecidos (conforme supracitado). Quando as MSC foram submetidas a um siRNA para a produção de KGF, verificou-se um decréscimo de 80% no seu efeito terapêutico, deixando aberta a hipótese deste fator de crescimento em particular ser um ponto-chave na clearance do fluido edematoso alveolar. Mais, outro estudo verificou que células EPC que sobreexpressam a sintase do monóxido de azoto têm um efeito terapêutico muito maior, bem como células análogas capazes de produzir angiopoietina 1 (comparando com a administração separada de ambas as substâncias), deixando em aberto a hipótese da manipulação genética das células estaminais como o futuro da terapêutica da LAP/SDRA. (65)

Do ponto de vista clínico, as MSC podem ser administradas diretamente nas vias expiratórias ou através da corrente sanguínea, em que a sua posterior interação com células residentes ou circulantes permite-lhes atingir os alvéolos onde exercem os seus efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios. (69)

Atualmente, mais de 100 ensaios clínicos estão em andamento utilizando células estaminais, englobando variadíssimas doenças, como são exemplo a esclerose múltipla, insuficiência renal e hepática, sépsis, entre outros. A maior parte destes ensaios estão em fase I ou II pelo que muita pouca informação ainda pode ser retirada. Em termos de LAP muitos critérios ainda têm de ser bem estabelecidos e implementados: (i) seleção de pacientes (ainda nenhum ensaio com MSC foi feito em pacientes em estado crítico, apesar de em pacientes com enfarte agudo do miocárdio já o ter sido, não se tendo verificado complicações decorrentes da administração); (ii) a via de administração preferencial, existindo ainda muita discussão acerca das vantagens e desvantagens da via intravenosa *versus* a via intraalveolar (contudo, sendo um dado praticamente adquirido o facto das MSC migrarem para locais onde ocorre lesão, a via IV – também por ser uma via relativamente mais fácil de administração – parece levar vantagem, para além de que uma porção das MSC entretanto administradas poderem exercer o seu

efeito protetor noutros órgãos que sofreram complicações derivadas da LAP, algo que a via IV permite com maior facilidade que a intraalveolar); (iii) a dose e o intervalo de administração (muitas são as correntes científicas que identificam como sendo o tempo ideal de administração 3 dias, visto ser o espaço temporal que se intersesta com a duração da fase aguda desta patologia); e (iv) indicadores de segurança e eficácia (visto que, se os pacientes se encontram internados, o acesso aos parâmetros vitais está, de alguma forma, salvaguardado, pelo que uma medição constante e atenta destes pode determinar o grau de segurança de um ensaio deste género. Quanto à eficácia, pode ser verificada recorrendo a alguns possíveis biomarcadores). (69)



**Figura 3.2. – Potencial terapêutico das células estaminais mesenquimatosas e o seu efeito parácrino na lesão aguda do pulmão (adaptado de (69))**

**Tabela 3.2. Agentes farmacológicos estudados como possível tratamento para a lesão pulmonar aguda e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (adaptado de (41))**

<b>Terapêutica</b>	<b>Outcomes</b>
Surfactante	Sem benefícios na mortalidade (população adulta)
Monóxido de azoto	Melhorias na oxigenação mas sem benefícios na mortalidade
Corticosteroides (prevenção)	Não demonstrou eficácia na prevenção da LAP/SDRA
Corticosteroides (tratamento)	Sem benefícios na mortalidade, podendo aumentar o risco em pacientes com SDRA com 14 ou mais dias de duração
Antifúngicos	Sem benefícios na mortalidade na SDRA já estabelecida, podendo, no entanto, ajudar na prevenção do seu desenvolvimento
Inibidores da fosfodiesterase (lisofilina e pentoxifilina)	Sem benefícios na mortalidade

## 4. Modelos Animais para o estudo da LAP/SDRA

Muita da informação que hoje se conhece acerca da LAP/SDRA foi recolhida no período *post-mortem* dos pacientes, havendo uma fração muito residual de pacientes que, enquanto vivos, efetuaram uma biópsia pulmonar. (70)

Uma questão interessante relacionada com estudos em humanos é que, mesmo após a uniformização dos pacientes, continua a haver respostas diferentes a alguns agentes etiológicos. (70) Por exemplo, após a administração de LPS, a produção de citocinas pode variar até 2 graus de magnitude entre diferentes pessoas (71), tendo estudos posteriores identificado um polimorfismo a nível do TLR1, que exacerbava a imunidade inata do doente, estando este mesmo polimorfismo mais associado a pacientes críticos, muitos dos quais vieram a falecer. (72) Perante isto, a comunidade científica viu-se na obrigatoriedade de recorrer a modelos animais na tentativa de contornar estas adversidades.

Os modelos animais, como em qualquer outra situação de índole clínica, estabelecem a ponte entre as terapêuticas praticadas nos humanos e os testes que são efetuados em meio laboratorial, na medida em que, por um lado, podem ser usados para estudar isoladamente mecanismos de lesão pulmonar verificada nos humanos, como também podem ser utilizados depois de conclusões retiradas de testes efetuados *in vitro* tendo em conta o contexto da LAP/SDRA. (73)

O modelo ideal deve ilustrar o quadro completo da LAP/SDRA (ver tabela 4.1.), isto é, uma fase aguda com uma resposta inflamatória célere com um aumento da permeabilidade microvascular e epitelial ao nível dos alvéolos; um influxo neutrofílico para as vias aéreas com formação de exsudados alveolares com alto teor de proteínas e fibrina. De seguida, o ideal seria um período de aumento dos níveis de células mononucleadas alveolares bem como de linfócitos intersticiais, e, por fim, uma fase de resolução com aumento da proliferação de pneumócitos de tipo II e fibroblastos, com acumulação de fibrina. Estas mudanças fisiológicas deveriam estar acompanhadas de hipoxemia aguda e de uma diminuição da complacência pulmonar. Os animais, entretanto, deveriam ser tratados com ventilação mecânica, sendo que esse acompanhamento demoraria vários dias, com estudos posteriores a serem efetuados

nos animais que, eventualmente, sobrevivessem, com o intuito de determinar as sequelas na função pulmonar e neuromotora. (70)

**Tabela 4.1. Manifestações da lesão pulmonar em humanos** (adaptado de (73))

<b>Manifestações clínicas</b>	Instalação aguda
	Lesão bilateral alveolar difusa
	Fase aguda exsudativa
	Processos reparadores por fibrose
<b>Alterações fisiológicas</b>	Rácio Ventilação/perfusão deficiente
	Hipoxemia grave
	Complacência pulmonar diminuída
	<i>Clearance</i> do fluido alveolar deficiente
<b>Alterações biológicas</b>	Aumento da permeabilidade alveolar e capilar
	Aumento da concentração pulmonar de citocinas
	Ativação de proteases
	Anormalidades a nível da coagulação
<b>Alterações patológicas</b>	Infiltrados neutrofílicos nos alvéolos
	Coagulação intraalveolar e deposição de fibrina
	Lesão do epitélio alveolar com degradação da membrana basal

O facto de ter havido um grande investimento em modelos animais para a LAP nas últimas décadas poderia indiciar que esta patologia se encontra muito bem estruturada em termos de critérios de diagnóstico no que diz respeito a experimentações animais. No entanto, se se fizer uma análise mais profunda e detalhada, verifica-se exatamente o oposto, isto é, não existe atualmente, no mundo científico, um consenso universal para a resposta à pergunta “o que é a LAP num animal?” (74)

Numa tentativa de analisar a pergunta supracitada, poder-se-ão erguer uma série de questões complexas. Quantos fenómenos são suficientes para se constatar que um animal possui, de facto, LAP? Bastará o aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, ou esta mesma permeabilidade tem que estar associada a uma migração neutrofílica para as vias aéreas? E, examinando este último ponto, é suficiente considerar como havendo migração a presença de neutrófilos no interstício ou apenas quando são detetados nas vias aéreas propriamente ditas? Exatamente por existir esta panóplia de mecanismos patofisiológicos, bem como a inexistência de um marcador específico para a LAP, é que se torna difícil concluir não só se esta patologia está efetivamente presente como também se as intervenções abordadas (farmacológicas ou não) ajudam a prevenir ou a tratar a doença. Consequentemente, devido a esta panóplia de variantes “em jogo”, torna-se quase bélica a tarefa de comparar estudos experimentais em modelos animais de LAP. (74)

Mesmo assim, apesar de nenhum modelo animal conseguir reproduzir todas as características verificadas nos humanos, se essas mesmas características de cada modelo forem bem estudadas e interpretadas, podem fornecer informações relevantes acerca da resposta pulmonar perante uma lesão deste tipo. (73)

#### 4.1. Características diferenciadoras das espécies animais na mimetização experimental da LAP

Devido ao facto da espécie humana ter divergido das restantes há milhões de anos, é natural que, após este fenómeno evolucionista, cada espécie se tenha adaptado de forma distinta na resposta a agentes microbianos, estando relacionado inclusive com o ambiente em que se inserem. (73)

A nível do sistema imunitário, essa diferença é por demais evidente. Os leucócitos e outras células mesenquimatosas humanas e animais reconhecem as estruturas microbianas através de TLR's, havendo investigações bem documentadas acerca da diferença a nível do reconhecimento de estruturas lipopolissacáridas entre os humanos e seres "inferiores". (75) Adicionalmente, em animais tais como ovelhas, porcos, gatos, cavalos e alguns cetáceos, a presença de macrófagos intravasculares pulmonares (PIM, do inglês *pulmonar intravascular macrophages*) confere-lhes a capacidade de fagocitar microrganismos, endotoxinas e/ou detritos existentes na vasculatura pulmonar, algo que não é possível por exemplo, em cães, ratinhos, coelhos, entre outros. Acredita-se que os humanos não possuem estes PIM's, havendo, contudo, indícios da sua presença em pessoas com disfunção hepática. Outras diferenças sobressaem, nomeadamente no que diz respeito à sensibilidade ao LPS e à produção de NO (neste último aspeto, os roedores apresentam uma maior taxa de produção que os humanos, conforme demonstra a tabela 4.2.). (76)

**Tabela 4.2. Características de diferentes espécies animais relevantes para o estudo da lesão pulmonar (adaptado de (73))**

<b>Animal</b>	<b>% Similaridade com a RHV do TLR4 humano</b>	<b>Macrófagos intravasculares pulmonares</b>	<b>Sensibilidade ao LPS</b>	<b>Produção de NO</b>
Humano	100%	Não	Intermédia	+
PNH	95%	Não	Intermédia	+
Porco	ND	Sim	Alta	++
Cão	ND	Não	Baixa	++
Ovelha	ND	Sim	Alta	++
Coelho	57%	Não	Intermédia	++
Rato	48%	Não	Baixa	+++
Ratinho	48%	Não	Baixa	+++

RHV: região hipervariável; NH: Primata não-humano; ND: Não foi determinado

#### 4.2. Tipos de modelos para o estudo da LAP/SDRA

Existem atualmente diversos modelos, cada um deles com o intuito de mimicar o que se verifica nos humanos. Porém, sendo a sépsis e a pneumonia as principais causas de LAP/SDRA (ver capítulo 1), o recurso ao LPS de bactérias gram-negativas é bastante frequente, podendo a sua administração ser por via inalatória ou através de uma injeção intratraqueal. Mesmo assim, existem outros modelos que procuram entender outras situações passíveis de provocar esta patologia. (77)

Um ponto fulcral para todo este processo da escolha do modelo animal passa, portanto, pela questão a ser abordada, isto é, se o objetivo da investigação se prende com LAP induzida por sépsis, por exemplo, é recomendada a administração intraperitoneal (IP) ou IV de bactérias vivas; se, porventura, se pretender estudar lesões diretas do pulmão, recomenda-se a aspiração de ácido, hiperóxia, entre outros. (74)

#### 4.2.1. Modelos que privilegiam o endotélio capilar

##### 4.2.1.1. Ácido oleico

O ácido oleico é o ácido gordo livre mais abundante nos mamíferos, sendo detetado em grandes quantidades em casos de embolia pulmonar causada por traumas ósseos. Ao destruir o endotélio, causa a migração de fluido rico em proteínas quer para o interstício quer para os alvéolos, criando um quadro de edema com conseqüente necrose dos pneumócitos de tipo I, não existindo evidência de causar apoptose nos mesmos, visto que, apesar de não estar muito estudado, o principal mecanismo de lesão celular prende-se com a lesão direta da membrana. Porém, a necessidade de diluir estes compostos oleosos para uma administração IV causa algumas limitações a nível da sua utilização em animais de pequeno porte. No entanto, este modelo possui a vantagem de ser um método bastante reprodutível e de mimicar as características básicas da lesão pulmonar, sendo muito utilizado para estudar estratégias ventilatórias e a própria dinâmica pulmonar, enquanto que as desvantagens prendem-se com a própria via de administração (IV) e com a etiologia da lesão pulmonar, isto é, são muito reduzidos os quadros de LAP em humanos que são originados através de traumas ósseos ou de situações de dislipidemia. (73)

#### 4.2.1.2. Endotoxina

O LPS está presente na membrana exterior das bactérias gram-negativas. Ao ligar-se à proteína de ligação do LPS (LBP, do inglês *Lipopolysaccharide binding protein*), desencadeia uma ativação do recetor CD14/TLR4 presente nos monócitos, macrófagos e outras células capazes de induzir uma resposta inflamatória. Conforme explicitado em cima, existe muita variabilidade de resposta ao LPS, e há que ter em conta a presença ou não de PIM's (porque animais com PIM's necessitam de doses inferiores de LPS para desenvolver o mesmo grau de sépsis e lesão pulmonar que os animais que não possuem estes leucócitos) e a própria variabilidade de PIM's entre seres da mesma espécie: ratinhos BALBc são mais sensíveis ao LPS que os C57BL16, por exemplo. (73) Para além disso, há que ter em consideração o próprio tipo de LPS, nomeadamente no que diz respeito às colónias utilizadas para a sua produção, uma vez que a pirogenicidade varia (78) e as próprias preparações podem conter contaminantes (lipoproteínas bacterianas, por exemplo) que podem exacerbar a sensibilidade da resposta inflamatória. Este modelo possui algumas vantagens: (i) é bastante reprodutível; (ii) é fácil de administrar; (iii) é representativo da resposta do organismo humano às infeções de origem bacteriana e (iv) estimula a imunidade inata. Contrabalançando, a principal desvantagem tem a ver com o facto de existir a referida variabilidade na pureza do LPS e de não causar disrupção da barreira endotélio-capilar (que é um mecanismo bastante importante da lesão pulmonar, conforme descrito anteriormente). (73)

#### 4.2.2. Modelos que privilegiam o epitélio alveolar

##### 4.2.2.1. Aspiração de ácido

A aspiração do conteúdo gástrico é um dos principais fatores de risco para a LAP/SDRA. Além do seu pH bastante ácido, a lesão epitelial também é determinada pela presença no conteúdo gástrico de partículas de comida digeridas, resíduos bacterianos, citocinas (como a IL-1 $\beta$ ), entre outros produtos que, devido à sua imensa osmolaridade, acabam por ter a sua própria quota-parte na lesão. Esta lesão induzida laboratorialmente pela aspiração de ácido clorídrico com valor de pH na ordem dos 1,5 é mediada por neutrófilos, havendo destruição dos pneumócitos de tipo I, seguido de

uma acentuada proliferação de pneumócitos de tipo II, concomitante com fenómenos de edema intraalveolar e intersticial. Após esta fase aguda de resposta inflamatória, ocorre uma fase fibroproliferativa. Quanto a vantagens, este modelo é interessante a nível do estudo hemodinâmico e patofisiológico inerente à LAP, bem como se se pretender estudar estratégias ventilatórias e de recrutamento de neutrófilos. Por outro lado, as principais limitações prendem-se com o facto do limite entre concentrações nefastas e inócuas de ácido clorídrico ser muito ténue, aliado ao facto dos humanos não aspirarem ácido clorídrico a um pH de 1,5 quando desenvolvem LAP/SDRA mas sim conteúdo gástrico na gama de pH's entre 3 e 4. (73)

#### 4.2.2.2. *Hiperóxia*

Na maioria dos mamíferos, a inalação de ar contendo 100% de oxigénio resulta em falha respiratória com conseqüente morte. No entanto, em humanos, a situação é distinta, visto que, em pessoas saudáveis, apenas está descrito um ligeiro aumento da permeabilidade capilar. De facto, é discutível se o oxigénio pode exacerbar ou mesmo causar LAP em pacientes críticos. Porém, o mesmo não é capaz de provocar LAP em humanos saudáveis. O mecanismo da lesão induzida por hiperóxia passa pela produção excessiva de radicais livres, quantidade essa que é só parcialmente neutralizada pelas enzimas antioxidantes endógenas, como a SOD, a catalase e a glutathione peroxidase. Para além disso, está provado que os aniões superóxido entretanto formados reagem com o NO formando peroxinitritos, aumentando, assim, a lesão oxidativa (foi detetada a sua formação em pulmões humanos sujeitos a um ambiente de hiperóxia, estando ainda o aumento da produção de NO diretamente relacionado com o agravamento da lesão pulmonar). A nível celular, o excesso de radicais livres ativa mecanismos não só necróticos como também apoptóticos (apesar destes últimos não estarem suficientemente descritos), associados à oxidação de proteínas, lípidos membranares e ácidos nucleicos. (73)

A exposição a condições de hiperóxia aumenta a translocação de NF- $\kappa$ B nas células mononucleadas, havendo também um aumento dos mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . O papel dos LPMN é controverso, pois, apesar

de estarem aumentados nestas situações, em modelos animais em que foram eliminadas da circulação não se notaram melhorias a nível da mortalidade. (73)

Este modelo, cuja técnica passa pela colocação dos animais numa jaula selada com um fluxo de oxigénio controlado e com níveis de dióxido de carbono semelhantes ao ambiente atmosférico natural, possui a vantagem de provocar uma fase aguda de lesão pulmonar (com grande formação de exsudado com conseqüente morte de pneumócitos de tipo I) seguida de uma fase proliferativa (com aumento da produção de fibroblastos e diferenciação dos pneumócitos de tipo II) que são, em tese, semelhantes às verificadas nos humanos, permitindo um estudo mais eficaz. Contudo, o facto de, nos humanos, a exposição a concentrações elevadas de oxigénio não provocar LAP/SDRA até 3 dias, bem como o facto de ser um modelo que exige muita *expertise* e equipamentos, pode constituir uma limitação. (73)

#### 4.2.2.3. *Depleção de surfactante por lavagem salina*

A depleção de surfactante está associada à LAP/SDRA, pelo que uma lavagem repetida das vias aéreas com uma solução isotónica de soro fisiológico provoca não só uma situação de hipoxemia como também uma diminuição do equilíbrio lipídico, com conseqüente decréscimo da concentração de surfactante e, por inerência, um aumento da tensão alveolar. Perante isto, ocorre o colapso dos alvéolos, com diminuição dos mecanismos de defesa pulmonares. Quando associado à ventilação mecânica, o tipo de lesão induzida por este modelo passa pelo aumento da permeabilidade endotelial, com infiltração dos LPMN nas vias respiratórias, aumento da produção de citocinas e formação de membranas de hialina. Este modelo possui a limitação de, no caso dos humanos, a depleção de surfactante ser normalmente uma consequência e não uma causa de LAP/SDRA (exceto em recém nascidos), pelo que se torna limitativo no que concerne ao estudo etiológico da doença nos humanos; para além disso, a principal desvantagem prende-se com a necessidade de implementar um sistema muito complexo (intubação, ventilação mecânica e anestesia geral). Porém, surge como um modelo útil para testar estratégias ventilatórias, porque a lesão induzida resulta em maior parte da própria ventilação do que propriamente da lavagem com soro. (73)

#### 4.2.2.4. *Ventilação mecânica*

Contrariamente aos outros modelos, este foi desenvolvido após a instalação de uma terapêutica (enquanto que os restantes aqui descritos surgiram através da consciencialização dos fatores de risco inerentes à própria doença). A sujeição a ventilação mecânica causa uma distensão excessiva dos alvéolos, com consequente despreendimento das junções interendoteliais e interepiteliais, provocando, simultaneamente, um quadro de edema intersticial com hemorragias alveolares, diminuição da complacência pulmonar e deficientes trocas gasosas. A presença de uma fase inflamatória é determinante, na medida em que a concentração na zona afetada de LPMN vai aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Neste modelo, o método de intubação pode ser por via endotraqueal ou por traqueostomia, sendo que o primeiro é mais eficaz a evitar uma resposta inflamatória associada ao próprio procedimento invasivo. Mais, os animais devem estar anestesiados, o que dificulta a própria perceção por parte do manipulador se o animal está vivo ou morto (a não ser que sejam monitorizados parâmetros vitais, o que pode ou não ser conseguido consoante a espécie utilizada – mais difícil de o fazer em ratinho, por exemplo – e o orçamento disponível). O modelo de ventilação mecânica possui a supremacia de ser o único modelo que já provou ter um impacto na prática clínica, tornando-o um forte candidato a aperfeiçoamento. No entanto, possui a adversidade de, para além da complexidade técnica e tecnológica inerente a todo o processo, existem animais em que o seu uso se encontra limitado, nomeadamente com ratinhos, visto que só podem ser alvo de ventilação por curtos períodos de tempo, enquanto que os humanos requerem dias ou semanas. (73)

#### 4.2.2.5. *Bleomicina intratraqueal*

Modelos recorrendo a este antineoplásico da classe dos antibióticos estão mais relacionados com quadros clínicos de fibrose pulmonar. No entanto, como este fenómeno é intersectável com algumas situações de LAP/SDRA, não é rara a sua utilização em meio laboratorial. A bleomicina forma complexos com  $Fe^{2+}$  e com  $O_2$ , levando à produção de radicais livres com danos diretos no DNA e conseqüente morte celular. Devido ao facto da extensão de lesão pulmonar estar relacionado com uma protéase cisteínica – bleomicina hidroxilase, que causa a sua inativação – há animais mais suscetíveis (tais como o ratinho C57BL/6, em que os níveis de expressão desta enzima estão diminuídos) e outros menos (como, por exemplo, o coelho), havendo inclusive variabilidade intraespécie (os ratinhos BALBc são resistentes à bleomicina, por exemplo). Este modelo tem como vantagem ser de fácil execução, reprodutível e que representa fielmente o cenário verificado na LAP/SDRA (isto é, provoca inicialmente um processo inflamatório seguido de fibrose), sendo que a multiplicidade de vias de administração (IV, intratraqueal, IP e subcutânea) também é um fator importante. Não obstante, a sua relevância a nível fisiológico é muitas vezes posta em causa, já que, por exemplo, a administração por via intratraqueal causa uma exacerbação demasiado intensa do processo inflamatório. (73)

#### 4.2.3. *Modelos de lesão pulmonar por sépsis*

A sépsis é uma das principais causas de LAP/SDRA conforme supracitado, sendo, portanto, bastante estudada em modelos animais. Existem várias formas de induzir sépsis em animais: (i) administração de bactérias vivas, que provoca uma fase inicial de hipotensão e leucopenia, podendo progredir para choque séptico com uma intensa coagulação intravascular. De resto, a disrupção do epitélio alveolar com formação de edema intraalveolar e recrutamento neutrofílico apenas parece ser passível de ser alcançado com concentrações elevadas de bactérias, pelo que se conclui que este modelo não reflete todas as características patofisiológicas pretendidas. Mais, o fenómeno da bacteriemia (sem síndrome de sépsis) não constitui, *per si*, nos humanos um fator de risco grave para o desenvolvimento de LAP/SDRA, pelo que este modelo

ainda é bastante passível de discussão na comunidade científica; (ii) produção de uma infecção sistêmica endógena (através de ligação e perfuração cecal, que consiste na perfuração do cécum três a cinco vezes com uma agulha), em que este é um modelo de indução cirúrgica de lesão pulmonar secundária a peritonite e que surge como uma alternativa melhorada face à administração direta de bactérias na cavidade peritoneal, isto porque, neste último caso, ou eram rapidamente eliminadas pelos mecanismos imunitários locais ou, caso o inócuo fosse bastante concentrado, poderia causar morte fulminante. É importante também referir que o próprio tamanho da agulha, bem como o nível das perfurações efetuadas vão determinar a extensão da infecção, sendo que, neste modelo, é um processo mais demorado (podendo levar dias até que surja um quadro de hipoxemia, inflamação neutrofílica, edema intersticial e alveolar, podendo até estar acompanhado de hipertensão pulmonar). Este procedimento possui, de resto, a desvantagem de necessitar de uma intervenção cirúrgica, para além de levar em conta a existência de variabilidade no que concerne à flora saprófita de cada animal; (iii) administração de produtos bacterianos (como a endotoxina, já discutida neste capítulo).

(73)

Concluindo, todos os modelos animais de LAP/SDRA abordados neste trabalho encontram-se estruturados na tabela 4.3.

**Tabela 4.3. - Modelos animais de Lesão Aguda do Pulmão (adaptado de(73))**

<b>Modelo</b>	<b>Semelhanças com LAP/SDRA humana</b>	<b>Diferenças para com LAP/SDRA humana</b>	<b>Condicionantes técnicas</b>
<b>Ácido oleico</b>	Similaridades histopatológicas e fisiológicas a nível da fase aguda e da resolução	Apenas uma fração reduzida da LAP/SDRA humana é devida a embolia causada por gordura. Não mimica a fisiopatologia causada por sépsis	Boa reprodutibilidade. Requer injeção intravenosa de ácido oleico, o que pode ser difícil em animais de pequeno porte
<b>LPS</b>	Resposta inflamatória dos neutrófilos com aumento das citocinas no espaço pulmonar	As alterações na permeabilidade alvéolo-capilar são modestas	Reprodutibilidade muito acentuada
<b>Aspiração de ácido</b>	Disrupção da barreira alvéolo-capilar com infiltração neutrofílica	Os humanos aspiram conteúdo gástrico, e não ácido na sua forma mais pura	Método muito reprodutível. Margem estreita entre doses tóxicas e não-tóxicas
<b>Hiperóxia</b>	Fase aguda de lesão epitelial e infiltração neutrofílica seguida de proliferação de pneumócitos de tipo II e cicatrização	Em pulmões normais, um meio com 100% de oxigénio não induz lesão pulmonar; é ainda incerto se a hiperóxia é um fator envolvido na patogénese da LAP/SDRA	Boa reprodutibilidade. Requer equipamento especial para a administração e monitorização das concentrações do gás
<b>Bleomicina</b>	Lesão inflamatória aguda seguida de fibrose reversível	Não ocorre formação de membranas de hialina. Relevância incerta do ponto de vista patofisiológico	Boa reprodutibilidade
<b>Lavagem salina</b>	Depleção de surfactante. Diminuição da complacência pulmonar. Desregulação das trocas gasosas	Sem um estímulo adicional, ocorre uma diminuição residual da permeabilidade e pouco recrutamento neutrofílico	Os animais têm de ser anestesiados, intubados e ventilados ao longo do procedimento e após o mesmo

<b>Modelo</b>	<b>Semelhanças com LAP/SDRA humana</b>	<b>Diferenças para com LAP/SDRA humana</b>	<b>Condicionantes técnicas</b>
<b>Isquemia/ Reperusão pulmonar</b>	Aumento na permeabilidade vascular aos leucócitos polimorfonucleares	Esta lesão é normalmente de índole hemorrágica	Requer uma cirurgia complexa
<b>Isquemia/ Reperusão não-pulmonar</b>	Aumento na permeabilidade microvascular aos LPMN	Esta lesão é ligeira, e a componente inflamatória está limitada ao interstício	Requer uma cirurgia complexa
<b>Bactérias por via intravenosa</b>	Edema intersticial, congestão intravascular e recrutamento de LPMN	Inflamação alveolar mínima; não ocorre formação de membranas de hialina	Variabilidade biológica relevante
<b>Bactérias por via intrapulmonar</b>	Aumento da permeabilidade, edema intersticial, e inflamação alveolar	Culturas positivas são raras na fase aguda da LAP/SDRA	Variabilidade biológica relevante
<b>Peritonite</b>	Aumento da permeabilidade, inflamação alveolar em diferentes graus	Mínima formação de membranas de hialina	Variabilidade biológica. Dose letal muito próxima da dose tóxica
<b>Legação e perfuração cecal</b>	Aumento da permeabilidade; inflamação alveolar em diferentes graus	Mínima formação de membranas de hialina	Variabilidade biológica. Requer uma intervenção cirúrgica

#### 4.3. O ratinho como modelo animal para o estudo da lesão pulmonar aguda e do síndrome de depressão respiratória aguda

A existência de reagentes específicos para análises laboratoriais, bem como a possibilidade de uma manipulação genética mais fácil e prática tornou o ratinho como um dos principais animais utilizados para o estudo da inflamação pulmonar. (73)

Algumas vertentes que erguem o ratinho como um dos principais animais alvos de estudo (e que estão igualmente referidos na tabela 4.4.) são: (i) possui um genoma bastante caracterizado e similar ao dos humanos, o que permite transpor estudos genéticos efetuados nestes roedores para a prática humana; (ii) os mecanismos imunológicos pelos quais o ratinho se rege estão cada vez mais descritos; (iii) ocorreu uma otimização tecnológica nos últimos anos no sentido de manipular a sobreexpressão de genes ou depleção de proteínas específicas nestes animais, permitindo estudar vias individualizadas e determinar a sua importância em diversas situações clínicas. (79)

No entanto, existem diferenças anatómicas entre os ratinhos e os humanos (igualmente expostos na tabela 4.4.), a começar, desde já, pelo facto destes roedores terem uma superfície nasal muito maior que a dos humanos, o que lhes confere uma *clearance* substancialmente maior de substâncias nocivas, por exemplo; a própria taxa respiratória dos ratinhos (250 a 300 respirações por minuto – bpm, do inglês *breaths per minute*) excede largamente a dos humanos (situada entre os 12 e os 16 bpm), tornando, desde já, este parâmetro fisiológico inviável para o diagnóstico de LAP/SDRA nestes roedores (ver tabelas 4.5. e 4.6.); depois, os ratinhos apenas conseguem exercer o processo respiratório através das fossas nasais (pois a epiglote e o palato mole estão demasiadamente juntos, impedindo a respiração através da boca); se “descermos” ainda mais pelas vias respiratórias, os ratinhos não possuem cartilagem depois dos brônquios primários, havendo ainda a destacar o facto da própria enervação ser diferente, impedindo os ratinhos, por exemplo, de tossir em resposta a estímulos mecânicos das vias aéreas. Mais, os ratinhos não possuem artérias a nível dos brônquios, tendo ainda os alvéolos e a própria barreira alvéolo-capilar de menores dimensões; têm menos lóbulos e menos ramificações nas vias condutoras proximais e possuem mais

células Clara (que são células secretoras presentes nos brônquios primários que auxiliam na reconstrução do epitélio quando danificado); por último, possuem também uma maior quantidade de tecido linfático nos brônquios. (74) (79)

Existem também algumas diferenças a nível da resposta imunológica, não só celular como também humoral, entre ratinhos e humanos: (i) os ratinhos têm menos neutrófilos circulantes (entre 10 a 25%); (ii) não expressam defensinas e (iii) existem diferenças a nível do tipo de quimiocinas CXC que produzem. (74)

Eventualmente, poder-se-á igualmente referenciar o facto de, apesar da LAP/SDRA já estar caracterizada nos humanos, esses mesmos quatro critérios da AECC (ver capítulo 1) não são extrapoláveis para os ratinhos, isto é, apesar dos dispositivos médicos que auxiliam o diagnóstico (radiografias torácicas, ecografias cardíacas e cateterizações) poderem ser efetuados em ratinhos, essas mesmas técnicas apenas podem ser realizadas num número demasiado limitado de laboratórios. (74)

**Tabela 4.4. Vantagens e limitações do ratinho enquanto modelo animal preferencial para o estudo da LAP/SDRA**

Vantagens	Limitações
Existência de reagentes específicos para análises laboratoriais	Dificuldade em estudar causas multifatoriais devido ao seu tamanho reduzido
Genoma bastante estudado e caracterizado	Maior <i>clearance</i> respiratória
Similaridade genética com os humanos	Inexistência de cartilagem nos brônquios
Noção aprofundada dos mecanismos fisiológicos inerentes à sua imunidade pulmonar	Enervação distinta a nível das vias aéreas (ausência do mecanismo de tosse)
Fácil manipulação genética	Maior quantidade de tecido linfático e de células Clara nas vias respiratórias
	Resposta imunológica diferente a estímulos nocivos

**Tabela 4.5. Comparação entre os pulmões do ratinho e os humanos (adaptado de (79))**

<b>Parâmetro</b>	<b>Ratinho</b>	<b>Humano</b>
Anatomia	Pulmão direito: 4 lobos Pulmão esquerdo: 1 lobo	Pulmão direito: 3 lobos Pulmão esquerdo: 2 lobos
Diâmetro dos brônquios primários	1 mm	10 – 15 mm
Diâmetro dos bronquíolos	0,01 – 0,05 mm	<1 mm
Diâmetro dos bronquíolos terminais	0,01 mm	0,6 mm
Diâmetro dos bronquíolos respiratórios	Inexistente	0,5 mm
Diâmetro alveolar	0,0039 – 0,0069 mm	0,2 – 0,4 mm

**Tabela 4.6. Parâmetros respiratórios em ratinhos e humanos (adaptado de (79))**

Parâmetro	Ratinho	Humano	Unidades
Volume corrente	0,16 – 0,20	500	ml
Taxa respiratória	215 – 230	12	min <sup>-1</sup>
Ventilação por minuto	33,5 – 47,5	6000	ml/min
Capacidade total pulmonar	0,9 – 1,44	6000	ml
Volume residual	0,11 – 0,14	1500	ml
Complacência pulmonar	0,053 – 0,13	200	ml/cm H <sub>2</sub> O
Resistência das vias aéreas	1,5	0,0016	cm H <sub>2</sub> O/ml <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Pa <sub>CO2</sub>	34 – 35	40	mmHg
Pa <sub>O2</sub>	78 – 84	80 – 100	mmHg
pH	7,37	7,4	

#### 4.4. Perspetivas futuras

Derivado do extenso número de abordagens possíveis em meio laboratorial, é indubitável a necessidade de ter em consideração o tamanho do animal, isto é, em animais muito pequenos torna-se difícil a monitorização de parâmetros fisiológicos (como a PaO<sub>2</sub> e a pressão arterial). Para além disso a recolha de amostras de sangue

para a monitorização de funções como a contagem de leucócitos, quimiocinas e gases sanguíneos é muito mais difícil, não só a nível da técnica de recolha como também no que diz respeito à quantidade de amostras. (73)

Apesar de todas as contrariedades, o ratinho ainda se afigura como um modelo bastante aproximado ao ser humano, mesmo tendo em consideração a própria variabilidade entre espécies de ratinhos (não há, atualmente, uma espécie representativa deste tipo de roedores, tendo de se adequar a escolha do ratinho às próprias condições experimentais). Mesmo assim, muitas das conceções imunológicas atribuídas ao pulmão humano foram primeiramente descritas neste animal. Um dos principais recursos é o FBA, que é um importante centro de concentração de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, entre outros. Não obstante, há que ter em consideração que o FBA apenas reflete a situação nas vias respiratórias, não podendo o resultado da sua análise ser extrapolado para, por exemplo, a mucosa pulmonar (para tal, são necessárias análises adicionais). (79)

Portanto, o FBA é um importante indicador do funcionamento intersticial pulmonar, providenciando informações válidas sobre a situação intraalveolar. Por questões óbvias, é difícil proceder à colheita de grandes volumes de FBA em ratinhos. Contudo, o objetivo passa pela recolha da maior quantidade possível, já que permitirá a obtenção de resultados mais precisos e fidedignos. (80)

Ainda assim, a extrapolação de todos estes modelos para a prática clínica continua controversa. Desde já, porque existe a condicionante da LAP/SDRA surgir em pacientes com múltiplas comorbilidades (insuficiência renal, síndrome coronário agudo, diabetes *mellitus*, insuficiência hepática), ao invés do que acontece nos modelos animais, em que são utilizados seres sem comorbilidades. Simultaneamente, outro aspeto importante é que, devido às limitações no que diz respeito ao tamanho do ratinho (por exemplo), normalmente em cada modelo só se estuda um mecanismo específico da LAP (alteração da permeabilidade da barreira endotélio-capilar, ativação leucocitária, concentração de fatores humorais, entre outros), ao invés do que se passa nos humanos, em que existem múltiplas vertentes que contribuem para o quadro

clínico, criando-se aqui um problema de representatividade da situação humana em relação a estes modelos.(70,77)

Não obstante, têm-se enumerado outras preocupações por parte da comunidade científica perante a criação de modelos animais cada vez melhores:

- i) **Cuidados intensivos a animais:** no contexto humano da LAP/SDRA, a lesão pulmonar é, de tal forma, grave que é necessário recorrer a suporte ventilatório para assegurar as trocas gasosas. No entanto, esse mesmo suporte é impossível de fornecer a ratinhos durante longos períodos de tempo, pelo que a lesão que é induzida a estes roedores tem de ser de um grau menor, caso contrário a provável morte dos animais condicionaria o estudo do modelo. Para além disso, o controlo hemodinâmico efetuado a humanos (com recurso a titulações de vasopressores e cateterizações) não é possível de ser transferido para os ratinhos, por limitações óbvias de índole tecnológica. Em primatas, por exemplo, seria possível essa criação de uma “UCI animal” mas por questões éticas e económicas, nunca se concretizou. Estas limitações podem, eventualmente, ser ultrapassadas recorrendo a modelos animais em que a lesão é induzida apenas num pulmão, cabendo ao outro assegurar o suporte mínimo de vida, mas é ainda um modelo muito pouco estudado. (77)
  
- ii) **Não replicação de fatores-chave de índole patofisiológico na LAP humana:** ao não haver uma reprodutibilidade de todos os fatores patofisiológicos inerentes à LAP humana nos modelos animais, acaba-se por condicionar bastante a investigação. Por exemplo, e conforme já abordado, a aspiração de ácido provoca uma extensa lesão mas uma resposta inflamatória diminuta. Ao invés, a administração intratraqueal de LPS tem um efeito exatamente oposto. Face à evidência de que a coagulação e a fibrinólise são processos modulados nas vias respiratórias e que são importantes para o quadro de LAP/SDRA, os estudos que envolvem estas vias serão fulcrais, havendo ainda um número bastante reduzido de estudos que satisfaçam estas condições. (77)

iii) **Falta de bons marcadores de referência:** O ponto-chave para definir o sucesso de um ensaio clínico é a redução da mortalidade causada pela LAP/SDRA. No entanto, a falta de tempo, de pessoal e de recursos financeiros tornam este aspecto um *endpoint* impraticável. Um grande problema no ramo da investigação é a falta de bons *endpoints* capazes de o substituir nos pacientes. Por exemplo, um *endpoint* substituto bastante utilizado em estudos pré-clínicos é a melhoria da oxigenação, o que por si só, pode indiciar melhorias pois uma maior quantidade de oxigénio é fornecida aos tecidos, aumentando a probabilidade de um melhor *outcome*. Porém, muitos estudos demonstraram intervenções que melhoraram a oxigenação mas sem qualquer benefício na mortalidade. Para além disso, noutro estudo que visava abordar estratégias de ventilação, pacientes com um menor volume corrente e com piores níveis de oxigenação obtiveram uma menor taxa de mortalidade. Em modelos animais, de resto, torna-se muito complicado utilizar a oxigenação como *endpoint* porque o grau de hipoxia necessário para se enquadrar nos critérios de diagnóstico de SDRA é inviável. Por outro lado, um *endpoint* substituto utilizado em modelos animais e que ainda não foi capaz de ser transposto para a terapêutica é o influxo de células inflamatórias, visto que a sua influência nos humanos ainda não está devidamente estabelecida. Este problema de interpolação entre a investigação e a prática clínica pode ser contornada através de melhores biomarcadores para a frase patológica e para a fase de resolução. Até à data, ainda nenhum biomarcador foi usado para o diagnóstico, pelo que esta vertente necessita ainda de ser aprofundada (posteriormente será discutido este tópico). (77)

Portanto, a prestação de melhores cuidados de saúde aos animais, uma maior incisão em vias ainda pouco estudadas e a colaboração institucional são fatores preponderantes para o progresso. (77)

## 5. Temas emergentes e perspectivas futuras

### 5.1. Biomarcadores de LAP/SDRA

O avanço notável das análises clínicas, com métodos cada vez mais sofisticados e sensíveis, é uma alternativa a explorar na tentativa de encontrar marcadores celulares e humorais que permitam a sua inclusão na profilaxia, diagnóstico e/ou tratamento da LAP/SDRA. (81)

Apesar de, atualmente, o rácio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  ser o único parâmetro indicador da severidade da doença, existem outros biomarcadores cujo uso se encontra limitado mas que podem ser úteis em situações extraordinárias, como o péptido natriurético cerebral (BNP, do inglês *brain natriuretic peptide*) e a procalcitonina. O BNP diferencia SDRA de edema pulmonar hidrostático, enquanto que a procalcitonina distingue uma infeção de carácter bacteriano das fúngicas e víricas, podendo ser útil para distinguir pneumonia de SDRA (no entanto, como a primeira pode desencadear a segunda, justifica-se, assim, o facto do seu uso se encontrar limitado). (27).

#### **Fatores humorais como possíveis biomarcadores**

As quimiocinas, neste campo, podem ser úteis, sendo possível constatar que fatores humorais como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-8}$  estão aumentados no FBA de pacientes com SDRA, sendo a sua concentração proporcional à gravidade de prognóstico. Adicionalmente, valores plasmáticos e do FBA de  $\text{CXCL-8}$ ,  $\text{CXCL-1}$ ,  $\text{CXCL-5}$  e  $\text{CCL-2}$  estão elevados em pacientes com elevado risco ou que já sofrem de SDRA. Para além disso, os valores de  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-8}$  estão ainda relacionados com o tempo que os pacientes não necessitam de ventilação enquanto medida auxiliar de terapêutica.(27)

Mais recentemente, foi descrito um possível novo biomarcador: a  $\text{IL-18}$ , que, de resto, tem sido alvo de um número considerável de estudos que confirmam a sua relação com a mortalidade e com um pior *outcome*. (82) Porém, existem outras proteínas que também merecem a atenção da comunidade científica, tais como o VEGF, o KGF (que estão ambos relacionados com a severidade e com o *outcome* da doença) e ainda a anti-tripsina, que forma um complexo com a NE ( $\text{NE-At}$ ) que já foi identificado como estando aumentado em pacientes que padecem de SDRA. (27)

### **Substâncias derivadas das células ativadas ou de tecidos lesados**

Porventura, as substâncias mais analisadas neste campo são as derivadas do facto da barreira endotélio-capilar ser um ponto-chave na progressão da doença. A nível do endotélio, a ICAM (molécula que modula a migração trans-endotelial dos neutrófilos, sendo, simultaneamente, uma importante molécula de adesão presente no endotélio) é a mais interessante do ponto de vista de incentivo a estudos futuros, enquanto que, no que diz respeito ao epitélio alveolar, as proteínas SP-B e SP-D são as que mais podem balizar não só a presença desta patologia como também acompanhar a própria progressão da mesma. (27)

Uma meta análise publicada em 2014 pode ter dado um contributo significativo na tentativa de sistematizar que marcadores podem ser utilizados em diferentes etapas da doença, referenciando que, para o auxílio no diagnóstico, fatores como a KL-6, LDH, RAGE e VWF podem ser utilizados, enquanto que, para a previsão do *outcome*, assumem especial destaque a IL-4, IL-2, ANG-2 e KL-2. (81)

Na tabela 5.1. estão organizados cada um dos possíveis biomarcadores a serem utilizados no diagnóstico e/ou tratamento da LAP/SDRA em função da fase da doença que se pretende avaliar.

**Tabela 5.1. Biomarcadores passíveis de serem medidos num ensaio clínico (adaptado de (69))**

<b>Fenómeno a estudar</b>	<b>Biomarcador</b>
<b>Lesão endotelial</b>	Antigénio do fator de von Willebrand
	Angiopietina-2
<b>Lesão epitelial pulmonar</b>	Surfactante D
	Recetor para a glicosilação terminal avançada
<b>Processo inflamatório agudo</b>	Interleucina-6
	Interleucina-8
<b>Fase procoagulante e antifibrinolítica</b>	Proteína C
	Trombomodulina
	Fator tecidual
	Inibidor da ativação do plasminogénio-1

## 5.2. Interação entre elasticidade e imunidade inata

Estudos experimentais relataram que, em pacientes com pulmões normais, a ventilação com grandes volumes correntes (superiores a 10 ml/kg) pode ser efetuada sem causar lesões. De resto, em ratos saudáveis, apenas se começa a notar a capacidade máxima de extensão alveolar quando o volume ventilatório ultrapassa os 40% da capacidade total do pulmão. (83) Contudo, em pulmões com função reduzida ou danificada, nota-se uma redução óbvia e inerente do volume efetivo alveolar, fazendo com que o volume ventilatório usado num pulmão saudável cause colapso alveolar. (70)

Esta elasticidade injuriosa causa um *upregulation* do recetor CD14 que, por sua vez, altera a sensibilidade dos macrófagos ao LPS (determinação essa que foi feita *ex vivo*), sustentando o facto do LPS poder surgir associado à ventilação na indução da lesão pulmonar, pois o CD-14 é um coreceptor chave na integração LPS-TLR4. (70)

No entanto, Smith *et al.* verificou que este sinergismo apenas aparenta existir à medida que a idade do paciente aumenta. (84) Outras moléculas ativadoras da resposta inata estão presentes em lesões desta envergadura, nomeadamente as DAMP's que conseguem desencadear uma resposta inflamatória na ausência de micróbios e somente com a ventilação. (70)

### 5.3. O epitélio alveolar na LAPs

A lesão epitelial alveolar disseminada, que pode ocorrer por processos necróticos e/ou apoptóticos, foi comprovada em análises *post mortem* a pacientes com SDRA/LAP, sendo do conhecimento geral, que a ventilação mecânica causa uma disrupção direta e/ou necrótica em modelos utilizando ratinhos. Por seu turno, toxinas bacterianas causam lise direta das células epiteliais do trato respiratório. Portanto, em virtude de não se conseguir intervir nos mecanismos celulares associados à necrose, a principal estratégia passa por minimizar e prevenir os fatores predisponentes para a patologia, pela técnica de utilização de volumes correntes reduzidos e pela erradicação da infeção bacteriana. (70)

Relativamente à apoptose, está mais do que evidenciado o seu papel contributivo na morte celular verificada nas principais regiões pulmonares, mediada principalmente pelos recetores TNF e Fas. Portanto, minimizar a ativação da apoptose pode ser uma estratégia efetiva não só a nível da progressão da doença como também para a sua própria resolução.

#### 5.4. TGF- $\beta$ como mediador-chave da LAP

A ativação cutânea e pulmonar da citocina TGF- $\beta$  assume-se como um fator preponderante no aumento da permeabilidade epitelial (por depleção da glutathione intracelular), conforme testado *in vitro*. De resto, ratinhos em que lhes foi retirado o fator de ativação do TGF- $\beta$  (integrina  $\alpha$ -v- $\beta$  6) demonstrou-se ser um fator protetor contra a LAP induzida por administração de bleomicina ou LPS. (85)

Estudos posteriores também demonstraram que o TGF- $\beta$  reduz a expressão, a nível epitelial, de canais de sódio em pneumócitos de tipo II (quer em ratinhos quer em humanos), levando a um menor efluxo de água do espaço intraalveolar, pelo que, concluindo, a inibição desta citocina pode ser uma alternativa para diminuir a lesão pulmonar. (86)

#### 5.5. Compreensão de fatores de risco específicos para a LAP

É possível afirmar com clarividência que os modelos animais ajudaram a complementar informação sobre alguns dos fatores de risco mais importantes para a LAP, nomeadamente a aspiração de conteúdo gástrico, transfusões, febre e o consumo crónico de álcool. (70)

Relativamente ao primeiro fator supracitado, o modelo clássico de aspiração do conteúdo gástrico envolve, conforme discutido anteriormente, a instilação de ácido com um valor de pH na ordem de 1,5, causando lesão direta nos pulmões por um processo inflamatório grave, com produção de IL-8 e outras citocinas proinflamatórias. No entanto, é do conhecimento geral que os humanos com LAP são geralmente tratados com inibidores da bomba de prótons e/ou antagonistas dos recetores  $H_2$  por forma a aumentar o pH do seu meio gástrico. Por norma, este aumento do pH é suficiente para não causar lesão em animais. Não obstante, o facto de algumas citocinas proinflamatórias poderem estar presentes no conteúdo gástrico podem, *per si*, criar uma lesão pulmonar quando instiladas em animais, tendo sido esse facto provado por Bregeon em que, após recolha de amostras de suco gástrico de pacientes com LAP em estado crítico e de pacientes sob ventilação, verificou que os primeiros, ao conterem uma maior concentração de citocinas no meio gástrico (nomeadamente IL-1 $\beta$ ),

provocam uma lesão pulmonar mais grave em coelhos, independentemente do pH, o que pode ajudar a explicar o facto de, em pacientes alvo de terapêuticas antiácido, a aspiração do conteúdo gástrico desencadear na mesma uma resposta inflamatória intensa, embora transiente. (87)

Por sua vez, a lesão pulmonar induzida por transfusões em modelos animais é normalmente precedida de uma exposição ao LPS, o que permite justificar o facto deste tipo de etiologia ser mais comum em humanos em estado crítico. (70)

Quanto à febre, embora possa ser perspectivada como um fator protetor do organismo, diversos modelos animais visaram entender de que forma este mecanismo pode estar associado ao *outcome*. Em modelos de peritonite, a febre melhora o *outcome* dos pacientes (88) sendo que, em modelos de hiperóxia ou de sujeição a baixas doses de LPS, o processo febril causa um aumento significativo da mortalidade não só devido a um aumento do recrutamento de neutrófilos como também por exacerbação do processo apoptótico celular. (89,90)

Por último, o mecanismo pelo qual o álcool pode potenciar o aparecimento de LAP foi, em grande parte, desvendado por recurso não só a ensaios clínicos como também a modelos animais, em que ratinhos com um aporte calórico proveniente de uma dieta rica em álcool desenvolveram uma redução das concentrações de glutatona nos pneumócitos de tipo II, associado a uma redução do transporte de sódio e água, evidenciando o álcool como um fator que aumenta a suscetibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento de LAP. (91–93)

## 5.6. Células estaminais na LAP

O surgimento da hipotética utilização de células estaminais na terapêutica da LAP tem levado à criação de novos modelos animais. (70) Estudos embrionários envolvendo a utilização de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea (BM-*MSC*, do inglês *bone marrow mesenchymal stem cells*) em ratinhos com LAP induzida por bleomicina verificaram uma redução da lesão pulmonar, mas apenas quando as células estaminais eram administradas imediatamente após a bleomicina, já não se registando esse mesmo efeito quando o espaço temporal entre as mesmas administrações eram de

7 dias, emergindo, então, a hipótese da bleomicina induzir a migração destas células para o tecido pulmonar lesado, onde ocorre uma posterior diferenciação (67,68,94). Contudo, este processo migratório não é reportado em vários outros estudos, sendo algo raro e passível de discussão ao nível da sua relevância clínica.(95) Mesmo assim, o facto das células estaminais exercerem um potente efeito protetor por mecanismos anti-inflamatórios (reduzindo a expressão de citocinas e estimulando a diferenciação celular) é um dado adquirido, conforme verificado pela sua administração intratraqueal em modelos animais de LPS. (96)

### 5.7. Resolução da LAP

Os modelos animais vieram acrescentar novos dados relativos à resolução da LAP, nomeadamente no que diz respeito ao papel dos linfócitos ao longo deste mesmo processo. Ratinhos *knock-out* para a existência de células maduras linfocitárias obtiveram um processo de resolução mais atrasado, tendo, inclusive, taxas de mortalidade maiores devido a uma maior extensão temporal da doença. (70) De facto, aquando do fornecimento de células T contendo, entre outros, o recetor para a IL-1 $\alpha$ , verificou-se uma melhoria do processo de resolução. (97)

### 5.8. Vírus e LAP

O facto dos mecanismos de infeção levados a cabo por algumas classes de vírus envolverem o sistema respiratório pode incitar à sua utilização como vetores terapêuticos. Por exemplo, a infeção do epitélio das vias respiratórias por parte de adenovírus dá-se pela sua entrada através da superfície basolateral das células, colocando, assim, em aberto a hipótese de se utilizarem adenovírus modificados (em que a sua replicação se encontra deficiente) como vetores para possíveis terapêuticas. Outros vírus que afetam principalmente o aparelho respiratório, como o vírus SARS (coronavírus que afeta principalmente pneumócitos de tipo II) ou o hantavírus (que provoca um edema generalizado por se encontrar nas células microvasculares endoteliais do pulmão) podem igualmente ser opções a considerar. (70)

Porém, também está demonstrado que infecções virais aumentam a sensibilidade dos pulmões à ventilação mecânica, na medida em que, ao interagirem com recetores TLR dos macrófagos, os vírus provocam o aumento da produção de citocinas e outros mediadores pro-inflamatórios, levando a um aumento da permeabilidade alvéolo-capilar e, como tal, exacerbando a lesão induzida pela própria ventilação mecânica. Consequentemente, esta ativação sinérgica da imunidade inata tem de ser considerada aquando da instalação de uma terapêutica. (70)

### 5.9. LAP em pediatria

O facto das crianças desenvolverem LAP com menor frequência e com melhor prognóstico também é alvo de interesse para a comunidade científica, e a transposição dessas questões para os modelos animais é prova disso. Aliado ao facto de possuírem menos (ou mesmo nenhuma) comorbilidades, quando comparadas com os adultos com LAP, existem estudos que confirmam que a interação prejudicial entre a imunidade inata e a ventilação mecânica aumenta com a idade. (70) Smith *et al.* submeteu ratinhos de 3 e 16 semanas à mesma frequência de ventilação (entre 2 e 4 horas) e constatou que houve uma exacerbação do processo inflamatório apenas nos ratinhos mais velhos (84). Para além disso, Alvira e os seus colaboradores indicaram que existem diferenças a nível da ativação de genes *cluster* em ratinhos jovens e adultos aquando da administração de LPS, o que influenciou a própria resposta imunitária. (98)

## 6. Conclusões

Mesmo após um longo período de investigação, verifica-se que, no contexto da LAP/SDRA, a comunidade científica ainda está longe dos objetivos propostos pelos principais prestadores de cuidados de saúde.

Em primeiro lugar, é ainda difícil balizar os pacientes que sofrem de LAP/SDRA daqueles que, apesar de reunirem sinais e sintomas sugestivos, não padecem da mesma patologia. Consequentemente, se a partir do momento em que nem sequer há uma definição precisa e exata de uma doença (apesar da definição de Berlim, em 2011, ter estreitado um pouco o caminho em direção a tal) todo o trabalho que fica a jusante do diagnóstico acaba por estar afetado. Com este trabalho, ficou patente a ideia de que é necessário apurar os critérios de diagnóstico da LAP/SDRA, para se poder instaurar uma terapêutica mais eficaz. Para este efeito, a necessidade de encontrar um biomarcador específico almeja-se como uma opção viável, visto que, ao estarmos perante uma evolução vertiginosa a nível das análises clínicas, permitirá indubitavelmente assegurar aos profissionais de saúde que estão a lidar com casos de LAP/SDRA.

É ainda importante realçar que os mecanismos fisiopatológicos inerentes a esta enfermidade já se encontram bem estabelecidos. A divisão em três fases fundamentais (aguda, proliferativa e fibrótica) permite acompanhar com maior precisão a evolução da doença, e adequar estratégias terapêuticas em função da sua progressão.

Apesar disso, infelizmente ainda não existe um fármaco que seja capaz de diminuir a (ainda) elevada taxa de mortalidade verificada para a LAP/SDRA. Não obstante já existirem intervenções farmacológicas que preservem a vida de alguns doentes, almeja-se ainda encontrar o tal fármaco *life-saving* que atenuar todos estes dados epidemiológicos. O facto da LAP/SDRA ser uma situação patológica que envolve múltiplas vias, desde um processo inflamatório descontrolado até à ativação exacerbada da coagulação, por exemplo, torna este processo muito moroso e desafiador. Diversos fármacos já demonstraram atuar numa via em específico, mas não se notam repercussões nos dados epidemiológicos exatamente por haver uma multiplicidade de alvos a atenuar.

É praticamente um dado adquirido que não existem fármacos que sejam autênticas “balas mágicas” mas, mesmo assim, podem haver alguns que estejam mais próximos de o ser. Neste campo, as células estaminais podem trazer um novo paradigma na abordagem a esta patologia, na medida em que o seu carácter seletivo para se instalarem em zonas de lesão celular pode permitir o seu usufruto como vetores para o encaminhamento de alguns fármacos para zonas críticas, obtendo, conseqüentemente, a tão desejada seletividade no tratamento.

Contudo, existem ainda poucos estudos sobre novas abordagens terapêuticas na LAP/SDRA, sendo necessário um maior investimento nesta área, visto que a manipulação laboratorial é de extrema importância no contexto de estudo de qualquer doença, uma vez que permite elucidar os mecanismos pelas quais esta se desenvolve, desbravando, simultaneamente, possíveis pontos-chave que podem ser utilizados em estudos subsequentes com vista a otimizar a terapêutica já existente. Um dos objetivos deste trabalho foi explicar quais são os modelos animais mais utilizados para este fim, e constata-se que há muitas alternativas a explorar, desde a criação de um modelo que replique todas as fases da patologia verificada nos humanos, até à escolha do animal que mais se assemelhe à fisiologia humana.

Concluindo, serve a presente dissertação para demonstrar que uma melhor elucidação a nível dos critérios de diagnóstico, articulada com melhores cuidados de saúde durante e após o internamento (com vista a melhorar as sequelas físicas e, sobretudo, psicológicas), permitirão, em associação com modelos animais mais concisos e representativos, direcionar a comunidade científica para a utilização e criação de fármacos que permitam tornar a LAP/SDRA numa doença cada vez menos mortal e causadora de índices de morbilidade cada vez mais reduzidos.

## 7. Bibliografia

1. Seeley RR. Seeley's anatomy & physiology. New York, NY: McGraw-Hill; 2011.
2. Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de Outubro de 2005;172(7):798–806.
3. Ashbaugh D, Boyd Bigelow D, Petty T, Levine B. ACUTE RESPIRATORY DISTRESS IN ADULTS. *Lancet*. Agosto de 1967;290(7511):319–23.
4. Petty TL, Ashbaugh DG. The Adult Respiratory Distress Syndrome. *CHEST J. American College of Chest Physicians*; 1 de Setembro de 1971;60(3):233–9.
5. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis. American Lung Association*; 17 de Setembro de 1988;138(3):720–3.
6. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. Março de 1994;149(3 Pt 1):818–24.
7. Raghavendran K, Napolitano LM. ALI and ARDS : Challenges and Advances. *Crit Care Clin*. Julho de 2011;27(3):429–37.
8. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin definition of ARDS: An expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38(10):1573–82.
9. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*. Fevereiro de 2007;131(2):554–62.
10. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 20 de Outubro de 2005;353(16):1685–93.
11. Bosma KJ, Taneja R, Lewis JF. Pharmacotherapy for prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome: current and experimental approaches. *Drugs*. 9 de Julho de 2010;70(10):1255–82.
12. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 5 de Maio de 2007;369(9572):1553–64.
13. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 1 de Agosto de 2012;122(8):2731–40.
14. Carneiro AH, Amaro P. Disfunção respiratória: ALI/ARDS. Manual do Curso de Sepsis e Infecção Grave para Médicos. 1.ª ed. Porto: Reanima; 2011. p. 43–52.

15. Ware LBM a. M. the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342:1334–49.
16. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Outubro de 2005;33(4):319–27.
17. Meduri GU, Annane D, Chrousos GP, Marik PE, Sinclair SE. Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy. *Chest.* Dezembro de 2009;136(6):1631–43.
18. Vadász I, Sznajder JI. Update in acute lung injury and critical care 2010. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de Maio de 2011;183(9):1147–52.
19. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Maio de 2012;46(5):566–72.
20. Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB. Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest.* Abril de 1999;103(7):1055–66.
21. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med.* Janeiro de 2011;17(3-4):293–307.
22. Rinaldo JE. Mediation of ARDS by leukocytes. Clinical evidence and implications for therapy. *Chest.* Abril de 1986;89(4):590–3.
23. Hagio T, Kishikawa K, Kawabata K, Tasaka S, Hashimoto S, Hasegawa N, et al. Inhibition of neutrophil elastase reduces lung injury and bacterial count in hamsters. *Pulm Pharmacol Ther.* Dezembro de 2008;21(6):884–91.
24. Perl M, Chung C-S, Perl U, Lomas-Neira J, de Paepe M, Cioffi WG, et al. Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de Setembro de 2007;176(6):591–601.
25. Galani V, Tatsaki E, Bai M, Kitsoulis P, Lekka M, Nakos G, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. *Pathol Res Pract.* 15 de Março de 2010;206(3):145–50.
26. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 15 de Janeiro de 2007;42(2):153–64.
27. Fujishima S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. *J intensive care.* Janeiro de 2014;2(1):32.

28. Goodman ER, Stricker P, Velavicius M, Fonseca R, Kleinstein E, Lavery R, et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch Surg*. Outubro de 1999;134(10):1049–54.
29. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Abril de 2008;294(4):L632–41.
30. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep*. Julho de 2004;5(7):674–8.
31. Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. Março de 2001;163(3 Pt 1):762–9.
32. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. Agosto de 2010;23(4):243–52.
33. Hemostasis and Its Regulation Part 1 [Internet]. Obtido de: <http://what-when-how.com/acp-medicine/hemostasis-and-its-regulation-part-1/>
34. Dowdy DW, Eid MP, Dennison CR, Mendez-Tellez PA, Herridge MS, Guallar E, et al. Quality of life after acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Intensive Care Med*. Agosto de 2006;32(8):1115–24.
35. Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, et al. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. Maio de 2001;163(6):1389–94.
36. Weinert CR, Gross CR, Kangas JR, Bury CL, Marinelli WA. Health-related quality of life after acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. Outubro de 1997;156(4 Pt 1):1120–8.
37. Goligher EC, Fan E, Slutsky AS. Year in review 2012: Critical Care--Respirology. *Crit Care*. Janeiro de 2013;17(6):249.
38. Chintagari NR, Liu L. GABA receptor ameliorates ventilator-induced lung injury in rats by improving alveolar fluid clearance. *Crit Care*. Janeiro de 2012;16(2):R55.
39. Mizuta M, Nakajima H, Mizuta N, Kitamura Y, Nakajima Y, Hashimoto S, et al. Fas ligand released by activated monocytes causes apoptosis of lung epithelial cells in human acute lung injury model in vitro. *Biol Pharm Bull*. Março de 2008;31(3):386–90.
40. Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care Med*. Janeiro de 2006;21(3):119–43.

41. Calfee CS, Matthay MA. Nonventilatory treatments for acute lung injury and ARDS. *Chest*. Março de 2007;131(3):913–20.
42. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*. 4 de Maio de 2000;342(18):1301–8.
43. Fanelli V, Zhang H, Slutsky AS. Year in review 2010: Critical Care--Respirology. *Crit Care*. Janeiro de 2011;15(6):240.
44. Weinert CR, Gross CR, Marinelli WA. Impact of randomized trial results on acute lung injury ventilator therapy in teaching hospitals. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de Maio de 2003;167(10):1304–9.
45. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 22 de Julho de 2004;351(4):327–36.
46. Bryan AC. Conference on the scientific basis of respiratory therapy. Pulmonary physiotherapy in the pediatric age group. Comments of a devil's advocate. *Am Rev Respir Dis*. Dezembro de 1974;110(6 Pt 2):143–4.
47. Sud S, Friedrich JO, Adhikari NKJ, Taccone P, Mancebo J, Polli F, et al. Effect of prone positioning during mechanical ventilation on mortality among patients with acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 8 de Julho de 2014;186(10):E381–90.
48. Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A, Taccone P, Mascheroni D, Labarta V, et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. *N Engl J Med*. 23 de Agosto de 2001;345(8):568–73.
49. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 de Julho de 1995;92(14):6264–8.
50. Rossaint R, Falke KJ, López F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 11 de Fevereiro de 1993;328(6):399–405.
51. Adhikari NKJ, Burns KEA, Friedrich JO, Granton JT, Cook DJ, Meade MO. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 14 de Abril de 2007;334(7597):779.
52. Katzung B, Masters S, Trevor A. *Basic and Clinical Pharmacology*, 11th Edition. 2009.

53. Holcroft JW, Vassar MJ, Weber CJ. Prostaglandin E1 and survival in patients with the adult respiratory distress syndrome. A prospective trial. *Ann Surg*. Abril de 1986;203(4):371–8.
54. Slotman GJ, Kerstein MD, Bone RC, Silverman H, Maunder R, Hyers TM, et al. The effects of prostaglandin E1 on non-pulmonary organ function during clinical acute respiratory failure. The Prostaglandin E1 Study Group. *J Trauma*. Abril de 1992;32(4):480–8; discussion 488–9.
55. Bone RC, Slotman G, Maunder R, Silverman H, Hyers TM, Kerstein MD, et al. Randomized double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with the adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 Study Group. *Chest*. Julho de 1989;96(1):114–9.
56. Rossignon MD, Khayat D, Royer C, Rouby JJ, Jacquillat C, Viars P. Functional and metabolic activity of polymorphonuclear leukocytes from patients with adult respiratory distress syndrome: results of a randomized double-blind placebo-controlled study on the activity of prostaglandin E1. *Anesthesiology*. Fevereiro de 1990;72(2):276–81.
57. Meduri GU, Chrousos GP. Duration of glucocorticoid treatment and outcome in sepsis: is the right drug used the wrong way? *Chest*. Agosto de 1998;114(2):355–60.
58. Weigelt JA, Norcross JF, Borman KR, Snyder WH. Early steroid therapy for respiratory failure. *Arch Surg*. Maio de 1985;120(5):536–40.
59. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA. Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome. *Chest*. Dezembro de 1987;92(6):1032–6.
60. Efficacy and Safety of Corticosteroids for Persistent Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 20 de Abril de 2006;354(16):1671–84.
61. Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverrière MC, Ritz R, Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest*. Janeiro de 1994;105(1):190–4.
62. Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JMC, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. Março de 2004;32(3):755–9.
63. Finfer S, Norton R, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J. The SAFE study: saline vs. albumin for fluid resuscitation in the critically ill. *Vox Sang*. Julho de 2004;87 Suppl 2:123–31.

64. Wright PE, Carmichael LC, Bernard GR. Effect of bronchodilators on lung mechanics in the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Chest*. Novembro de 1994;106(5):1517–23.
65. Cribbs SK, Matthay MA, Martin GS. Stem cells in sepsis and acute lung injury. *Crit Care Med*. 2010;38(12):2379–85.
66. Matthay M a, Goolaerts A, Howard JP, Lee JW. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit Care Med*. 2010;38(10):S569–73.
67. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Agosto de 2005;33(2):145–52.
68. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de Julho de 2003;100(14):8407–11.
69. Matthay M a, Thompson BT, Read EJ, McKenna DH, Liu KD, Calfee CS, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest*. Outubro de 2010;138(4):965–72.
70. Martin TR, Matute-Bello G. Experimental Models and Emerging Hypotheses for Acute Lung Injury Access. *Crit Care*. 2012;27(3):735–52.
71. Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J, et al. Identification of high and low responders to lipopolysaccharide in normal subjects: an unbiased approach to identify modulators of innate immunity. *J Immunol*. 15 de Agosto de 2005;175(4):2570–8.
72. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, Kajikawa O, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de Outubro de 2008;178(7):710–20.
73. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Setembro de 2008;295(3):L379–99.
74. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay M a., Slutsky AS, et al. An official american thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):725–38.
75. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*. Agosto de 2002;23(8):375–8.
76. Warner AE. Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. *Clin Chest Med*. Março de 1996;17(1):125–35.

77. Bastarache J a, Blackwell TS. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):218–23.
78. Komuro T, Yomota C, Kimura T, Galanos C. Comparison of R- and S-form lipopolysaccharides fractionated from *Escherichia coli* UKT-B lipopolysaccharide in pyrogen and *Limulus* tests. *FEMS Microbiol Lett.* 1 de Julho de 1989;51(1):79–83.
79. Braun A, Ernst H, Schaudien D, Hoymann H. *The Respiratory Tract.* Em: Hedrich HJ, editor. *The Laboratory Mouse.* 2nd ed. Academic Press; 2012.
80. Callol L, Barbero E., Blasco E. New method of collection of bronchioloalveolar lavage in rat. *Respir Med.* 1994;88:399.
81. Terpstra ML, Aman J, van Nieuw Amerongen GP, Groeneveld ABJ. Plasma biomarkers for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis\*. *Crit Care Med.* Março de 2014;42(3):691–700.
82. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de Junho de 2012;185(11):1225–34.
83. Tschumperlin DJ, Margulies SS. Alveolar epithelial surface area-volume relationship in isolated rat lungs. *J Appl Physiol.* Junho de 1999;86(6):2026–33.
84. Smith LS, Gharib SA, Frevert CW, Martin TR. Effects of age on the synergistic interactions between lipopolysaccharide and mechanical ventilation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Outubro de 2010;43(4):475–86.
85. Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, et al. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest.* Junho de 2001;107(12):1537–44.
86. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 7 de Novembro de 2003;278(45):43939–50.
87. Brégeon F, Papazian L, Delpierre S, Kajikawa O, Payan M-J, Martin TR, et al. Role of proinflammatory activity contained in gastric juice from intensive care unit patients to induce lung injury in a rabbit aspiration model. *Crit Care Med.* Dezembro de 2008;36(12):3205–12.
88. Jiang Q, Cross AS, Singh IS, Chen TT, Viscardi RM, Hasday JD. Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis. *Infect Immun.* Março de 2000;68(3):1265–70.

89. Hasday JD, Garrison A, Singh IS, Standiford T, Ellis GS, Rao S, et al. Febrile-range hyperthermia augments pulmonary neutrophil recruitment and amplifies pulmonary oxygen toxicity. *Am J Pathol*. Junho de 2003;162(6):2005–17.
90. Lipke AB, Matute-Bello G, Herrero R, Kurahashi K, Wong VA, Mongovin SM, et al. Febrile-range hyperthermia augments lipopolysaccharide-induced lung injury by a mechanism of enhanced alveolar epithelial apoptosis. *J Immunol*. 1 de Abril de 2010;184(7):3801–13.
91. Guidot DM, Modelska K, Lois M, Jain L, Moss IM, Pittet JF, et al. Ethanol ingestion via glutathione depletion impairs alveolar epithelial barrier function in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Julho de 2000;279(1):L127–35.
92. Brown LA, Harris FL, Bechara R, Guidot DM. Effect of chronic ethanol ingestion on alveolar type II cell: glutathione and inflammatory mediator-induced apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res*. Julho de 2001;25(7):1078–85.
93. Brown LA, Harris FL, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- $\alpha$ -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Agosto de 2001;281(2):L377–86.
94. Xu J, Mora A, Shim H, Stecenko A, Brigham KL, Rojas M. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Setembro de 2007;37(3):291–9.
95. Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, et al. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de Abril de 2008;177(7):701–11.
96. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*. 1 de Agosto de 2007;179(3):1855–63.
97. D’Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest*. Outubro de 2009;119(10):2898–913.
98. Alvira CM, Abate A, Yang G, Dennery PA, Rabinovitch M. Nuclear factor- $\kappa$ B activation in neonatal mouse lung protects against lipopolysaccharide-induced inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de Abril de 2007;175(8):805–15.