

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Erika Kristina Incerpi Garcia

**INFLUÊNCIA DOS GLICOCORTICÓIDES NA LESÃO
PULMONAR AGUDA DE RATOS SUBMETIDOS A
SEPSE**

Alfenas/MG
2015

Erika Kristina Incerpi Garcia

**INFLUÊNCIA DOS GLICOCORTICÓIDES NA LESÃO
PULMONAR AGUDA DE RATOS SUBMETIDOS A
SEPSE**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientação: Prof.^a Dra. Roseli Soncini.

Alfenas/MG
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Garcia, Erika Kristina Incerpi.

Influência dos glicocorticóides na lesão pulmonar aguda de ratos submetidos à sepse. / Erika Kristina Incerpi Garcia. -- Alfenas/MG, 2015. 94 f.

Orientadora: Roseli Soncini.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Lesão Pulmonar Aguda. 2. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. 3. Glicocorticóides. 4. Receptores de Glicocorticóides. 5. Metirapona. 6. Dexametasona. 7. Sepse. I. Soncini, Roseli. II. Título.

CDD-612

Erika Kristina Incerpi Garcia

INFLUÊNCIA DOS GLICOCORTICÓIDES NA LESÃO PULMONAR AGUDA DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE

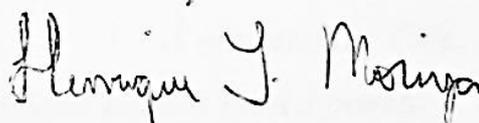
A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas

Aprovada em: 24/04/2015

Prof.^a Dra. Roseli Soncini
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya
Escola politécnica da USP/SP

Assinatura: 

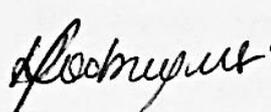
Prof.^a Dra. Jôse Mára de Brito
Faculdade de Medicina da USP/SP

Assinatura: 

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof.^a Dra. Maria Rita Rodrigues
UNIFAL-MG

Assinatura: 

À minha mãe, Cila.

A saudade parece nunca passar....

Seu rosto, seu cheiro, sua voz, seu sorriso....

Tudo agora está guardado dentro de mim....

Tenho certeza que você está sempre comigo

e meu pensamento sempre com você.

Meu eterno agradecimento,

carinho e amor.

...Há uma força extremamente poderosa que a ciência ainda não encontrou explicação formal. É uma força que governa todas as outras e está atrás de qualquer fenômeno que opera no universo e que ainda não foi identificado por nós. Esta força universal é o AMOR. O Amor é Luz, que ilumina a quem dá e recebe. O Amor é gravidade, porque faz com que pessoas se sintam atraídas às outras. O Amor é potência, porque multiplica o melhor que temos, e permite que a humanidade não se extinga em seu cego egoísmo. Por amor se vive e se morre... Sem dúvida, cada indivíduo leva em seu interior um pequeno, mas poderoso gerador de amor cuja energia espera para ser liberada. Quando aprendermos a dar e receber esta energia universal, comprovaremos que o amor tudo vence, tudo transcende e tudo pode, porque o amor é a quinta essência da vida.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade oferecida.

À Profa. Dra. Roselí Soncini, pela orientação recebida e pela amizade demonstrada durante o desenvolvimento desse trabalho, sempre me apoiando.

Ao Prof. Dr. José Antunes (USP – Ribeirão Preto) pelo material e espaço cedido para as dosagens de corticosterona.

À Profa. Dra. Elisângela Monteiro Pereira pelo apoio, cedendo conhecimento e material para dosagem de nitrito/nitrato, auxílio na planilha dos resultados e pela amizade.

À Profa. Dra. Estela Regina de Oliveira pela ajuda prestada no momento da análise dos cortes histológicos.

À Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginski Leitão pelo auxílio na técnica e nas análises de imunofluorescência, pela paciência e amizade.

Ao meu marido José Antônio Dias Garcia, meu porto seguro, meu amigo, meu companheiro, com quem posso tudo dividir. Sem você tudo seria muito mais difícil.

Ao meu filho Henri Incerpi Garcia, meu sentido de viver. Obrigada pela alegria que você me dá a todo momento. A quem também peço perdão pela ausência em muitos períodos.

Aos meus gatos Paco, Pipoca e Austin, pelo imenso bem-estar que me proporcionam quando abraço vocês.

Ao meu pai, Osvaldo, por estar sempre ao meu lado apoiando-me em todas as minhas decisões.

Ao meu querido amigo Luiz Marcelo Oliveira Santos por ter estado sempre ao meu lado, dando-me apoio em um dos momentos mais difíceis da minha vida e nos períodos de desânimo. Por ter chorado comigo muitas vezes. Por ter trabalhado comigo sempre.

Ao meu amigo e colega de trabalho João Francisco pela paciência e compreensão. Por ter disposição em trabalhar sozinho no período em que estive afastada do Biotério.

Aos meus amigos pessoais (Renata e Atílio, Miriam e Rodrigo, Da Irene, Marcia e Edson, Leida e Tardieu, Da Isabel, Valdinéia, Jô e Alexandre, Priscila e Jairo, Regina, Stanley e Heloísa – desculpe se me esqueci de alguém), meus tesouros achados pelo caminho da vida, obrigada pelo apoio, auxílio em tudo e em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas do laboratório (Laísa, Viviane, Vanessa Cardoso, Daniela, Layla, Vanessa Pereira, Lidiane, Ana Laura, Luciana, Silvinha, Claudia, Mara, Michael, Délcio, Marília, Marina, José Reis) por todo apoio e companheirismo no tempo que passamos juntos.

*Aos animais
que sofrem e morrem
para dar melhores condições de vida
a outros animais, os humanos.
Prometo nunca tornar sua utilização na pesquisa
em um ato banal ou trivial.
Meus sinceros agradecimentos.*

RESUMO

A Síndrome do Desconforto Respiratória Aguda (SDRA) e a Lesão Pulmonar Aguda (LPA) permanecem como importantes causas de morbidade e mortalidade em pacientes com sepse. Entender os mecanismos etiopatofisiológicos da SDRA/LPA é essencial para avançar nas modalidades terapêuticas. O uso de glicocorticóides (GC) tem sido proposto para o tratamento da SDRA/LPA, mas com resultados controversos. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos GC nos níveis plasmáticos de corticosterona (CCT), na área imunorreativa para os receptores de GC (GR) no pulmão, nos dados de mecânica respiratória, na morfometria pulmonar, na atividade de mieloperoxidase (MPO) e nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tecido pulmonar de ratos com LPA induzida por CLP (*Cecal Ligation and Puncture*). Foram utilizados 144 ratos Wistar (250-300g) divididos aleatoriamente em grupos Naïve, Sham e CLP ($N = 8/\text{grupo}$). No grupo Naïve, os animais não sofreram qualquer procedimento ou tratamento. No grupo Sham, os ratos tiveram o ceco exposto e foram pré-tratados com salina, uma hora antes da cirurgia. No grupo CLP, os animais tiveram o ceco exposto, ligado e perfurado e foram divididos em três grupos de acordo com os tratamentos prévios realizados, uma hora antes da cirurgia: CLP sal (salina em volume equivalente de 0,9 % NaCl i.p.); CLP met (metirapona 50 mg.kg^{-1} i.p.); CLP dex (dexametasona $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.p.). Após 6 e 24 horas da cirurgia, os animais foram anestesiados, traqueostomizados e acoplados a um ventilador mecânico para avaliação da mecânica respiratória, seguida de remoção dos pulmões para estudos histomorfométricos e da área imunorreativa para GR. Foi realizado um experimento à parte com os mesmos grupos para dosagem de corticosterona (CCT), seguido de remoção dos pulmões para medidas bioquímicas. A met aumentou a viscosidade tecidual (Gtis) e da histeresividade (η) pulmonar, a porcentagem de células inflamatórias e a área de colapso alveolar, e a atividade de MPO, similar ao CLP sal. Todavia, a met reduziu os níveis de CCT e aumentou drasticamente os níveis de H_2O_2 , comparado ao CLP sal, e aumentou o risco de morte dos animais. A dex reduziu os níveis de CCT e preveniu a inflamação e o estresse oxidativo pulmonar. Além disso, preveniu o colapso alveolar, melhorando Gtis e η , comparado ao CLP sal. Os resultados obtidos permitem concluir que: os diferentes níveis plasmáticos de CCT, observados nos animais sépticos, com exceção dos pré-tratados com dex, não foram capazes de prevenir as alterações morfofuncionais e inflamatórias da LPA; embora tenha ocorrido aumento da sensibilidade do GR nos animais pré-tratados com met, não houve proteção contra a instalação da LPA; as anormalidades nos parâmetros de mecânica respiratória encontradas nos

animais pré-tratados com met e sal demonstram que a sepse afetou a função pulmonar; o aumento da atividade de MPO no tecido pulmonar, observado nos animais sépticos, com exceção dos pré-tratados com dex, correlacionou-se com o aumento dos neutrófilos pulmonares; o aumento dos níveis de H₂O₂ no tecido pulmonar, ocorrido pela administração prévia de met, pode ter sido influenciado por níveis basais de CCT.

Palavras-chave: Lesão Pulmonar Aguda. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Glicocorticóides. Receptores de Glicocorticóides. Metirapona. Dexametasona. Sepse.

ABSTRACT

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and the Acute Lung Injury (ALI) remain as important causes of morbidity and mortality in patients with sepsis. Understanding the pathophysiology mechanisms of ARDS/ALI is essential to advance in therapeutic modalities. The use of glucocorticoids (GC) has been proposed for the treatment of ARDS/ALI, but with controversial results. The aim of this study was to evaluate the influence of GC on the parameters: corticosterone (CCT) plasma levels, immunoreactive area to GC receptors (GR) in the lung, respiratory mechanics data, lung morphometry, myeloperoxidase activity (MPO) and hydrogen peroxide levels (H_2O_2) in lung tissue of rats with ALI induced by CLP (Cecal Ligation and Puncture). 144 rats (250-300g) randomly divided into Naïve, Sham and CLP groups ($n = 8$ / group) were used. In Naïve group, the animals did not suffer any procedure or treatment. In Sham group, rats had the cecum exposed and were pretreated with saline solution an hour prior to surgery. In CLP group, animals had the cecum exposed and drilled, and were divided into three groups according to previous treatments performed an hour before surgery: CLP sal (equivalent volume of saline in 0.9% NaCl i.p.); CLP met (metyrapone 50 mg.kg⁻¹ i.p.); CLP dex (dexamethasone 0.5 mg.kg⁻¹ i.p.). The animals were anesthetized, tracheotomized and coupled to a ventilator for respiratory mechanics evaluation, followed by removal of the lungs for histomorphometric analysis and GR immunoreactive area, 6 and 24 hours after surgery. A different experiment was carried out with the same groups for corticosterone (CCT) plasma measurements, followed by removal of the lungs for biochemical measurements. The met increased tissue damping (G_{tis}) and hysteresivity (η), inflammatory cells percentage, alveolar collapse area and MPO activity, similar to CLP sal. However, met reduced CCT levels and increased H_2O_2 levels as compared to the CLP sal, and increased risk of animals' death. The dex reduced CCT levels and prevented inflammation and pulmonary oxidative stress. Besides, it prevented alveolar collapse, improving G_{tis} and η , compared to CLP sal. The results showed that the different levels of plasma CCT, observed in septic animals, with exception of those pre-treated with dex, were not able to prevent the morphological and functional and inflammatory changes of the ALI; although there was an increase in GR sensitivity in met pre-treated animals, there was no protection against the installation of ALI; abnormalities in respiratory mechanics parameters found in animals pretreated with sal and met demonstrate that sepsis affects pulmonary function; increased MPO activity in lung tissue observed in septic animals, with exception of those pre-treated with dex, correlated with the increase in pulmonary neutrophils;

increased H₂O₂ levels in lung tissues occurred in animals pretreated with met and may have been influenced by basal levels of CCT.

Keywords: Acute Lung Injury. Acute Respiratory Distress Syndrome. Glucocorticoids. Glucocorticoid Receptors. Metyrapone. Dexamethasone. Sepsis.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ACTH –	Hormônio adrenocorticotrófico
11-βHSD1 -	Onze beta desidrogenase hidroxisteróide tipo 1
11-βHSD2 -	Onze beta desidrogenase hidroxisteróide tipo 2
BAC -	Barreira alvéolo-capilar
CCT -	Corticosterona
CLP -	Ligadura e perfuração cecal
cmH₂O -	Centímetro de água
CRH -	Hormônio liberador de corticotrofina
DAD -	Dano alveolar difuso
DAMPs -	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DAPI -	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
Dex -	Dexametasona
DMO -	Disfunção múltipla dos órgãos
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN -	Espécies reativas de nitrogênio
ERO -	Espécies reativas de oxigênio
f -	Frequência
FAP -	Fator ativador de plaquetas
GC -	Glicocorticóides
GR -	Receptores de glicocorticóides
GRα -	Receptores de glicocorticóides alfa
GRβ -	Receptores de glicocorticóides beta
Gtis -	Viscância tecidual
H.E. -	Hematoxilina e eosina
H₂O₂ -	Peróxido de hidrogênio
HHA -	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
Htis -	Elastância tecidual do modelo de fase constante
Hsp90 -	<i>Heat shock protein 90</i>
Hz -	Hertz

i.p. -	Intraperitoneal
I_{aw} -	Inertância das vias aéreas
IL-1 -	Interleucina um
IL-1β -	Interleucina um beta
IL-2 -	Interleucina dois
IL-6 -	Interleucina seis
IL-8 -	Interleucina oito
IL-12 -	Interleucina doze
IL-18 -	Interleucina dezoito
ι -	Unidade imaginária
iNOS -	Óxido nítrico sintase induzida
I$\kappa$$\beta$ -	Proteína inibitória kappa beta
LPA -	Lesão Pulmonar Aguda
LPS -	Lipopolissacarídeo
μ -	Mi
μM -	Micromolar
μm² -	Micrômetro quadrado
M -	Molar
Met -	Metirapona
ml.kg⁻¹ -	Mililitro por kilograma
mM -	Milimolar
mM.l⁻¹ -	Milimolar por litro
MN -	Monócitos
MPO -	Mieloperoxidase
mU.g⁻¹ -	Miliunidade por grama
η -	Histeresividade do modelo de fase constante
Naïve -	Grupo que não sofreu tratamento algum (controle)
NaN₃ -	Azoteto de sódio
NF-$\kappa$$\beta$ -	Fator nuclear kappa beta
ng.ml⁻¹ -	Nanograma por mililitro
nM -	Nanomolar
NO -	Óxido nítrico
NOD-like -	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>

PAMP -	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PaO₂/FiO₂ -	Taxa de ventilação perfusão
PBS -	Salina tampão fosfato
PEEP -	Pressão expiratória final positiva
PI3K-AKT-eNOS –	<i>Phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B-endothelial nitric oxide synthase</i>
PRRs -	<i>Pattern-recognition receptors</i>
R_{aw} -	Resistência de via aérea
RGB -	<i>Red green blue</i>
RIG-like -	<i>Retinoic acid-inducible gene</i>
RPM -	Rotações por minuto
Sal -	Solução salina
SDRA -	Síndrome da Disfunção Respiratória Aguda
SEM -	Erro padrão da média
Sham -	Cirurgia fictícia
TBE -	Tribromoetanol
TLC -	<i>Total Lung Capacity</i>
TLRs -	<i>Toll-like receptors</i>
TNF-α -	Fator de necrose tumoral alfa
UI -	Unidade internacional
uM.g⁻¹ -	Micromolar por grama
UTI -	Unidades de Tratamento Intensivo
V/Q -	Taxa de ventilação perfusão
V_t -	Volume corrente
Z(f) -	Impedância em função da frequência
Z_{rs} -	Impedância do Sistema respiratório

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática simplificada da resposta inflamatória aguda na doença crítica.....	23
Figura 2 –	Desenho esquemático mostrando a quebra da barreira alvéolo-capilar, resultando em aumento da permeabilidade à água, proteínas e outros solutos, sendo um marcador clínico e experimental de LPA.....	26
Figura 3 –	Representação esquemática da regulação dos níveis de GC pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).....	30
Figura 4 –	Ilustrações do ventilador mecânico (<i>flexiVent</i>).....	36
Figura 5 –	Representação esquemática da randomização dos grupos experimentais.....	41
Figura 6 –	Modelo experimental de sepse: ligadura e perfuração cecal (CLP).....	42
Figura 7 –	Representação esquemática da primeira etapa do protocolo experimental, mostrando desde a aplicação das drogas até 6 e 24 horas da instalação da sepse.....	43
Figura 8 –	Representação esquemática da segunda etapa do protocolo experimental, mostrando desde a aplicação das drogas até 6 e 24 horas da instalação da sepse.....	43
Figura 9 –	Esquema temporal do protocolo de medidas de mecânicas respiratória.....	46
Figura 10 –	Imagem do retículo com 100 pontos e 50 linhas acoplado a uma das oculares do microscópio para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	48
Figura 11 –	Representação gráfica da porcentagem de mortalidade, após 24 horas da cirurgia, nos grupos estudados.....	51
Figura 12 –	Representação gráfica dos níveis plasmáticos de corticosterona (CCT) em ng.ml^{-1}	52

Figura 13 – Representação gráfica da área imunorreativa de (A) GR total, (B) citoplasmático e (C) nuclear por μm^2 , 24 horas após a cirurgia.....	54
Figura 14 – Fotomicrografia imunofluorescente da área de imunorreatividade para GR em pulmões dos grupos estudados, 24 horas após indução da sepse.	55
Figura 15 – Representação gráfica da (A) viscosidade tecidual (G_{tis}) e (B) histeresividade (η), 24 horas depois da cirurgia.....	57
Figura 16 – Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina, 24 horas após a cirurgia.....	59
Figura 17 – Representação gráfica da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar.....	61
Figura 18 – Representação gráfica dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tecido pulmonar.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros obtidos através da avaliação da mecânica respiratória.....	56
Tabela 2 - Fração de área alveolar normal e colapsada.....	58
Tabela 3 - Porcentagem de neutrófilos (Neut) e de células mononucleares (MN) no tecido pulmonar.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	SDRA/LPA – DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.2	SDRA/LPA – SEPSE COMO FATOR ETIOLÓGICO.....	22
2.3	SDRA/LPA – PATOFISIOLOGIA.....	25
2.3.1	Dano endotelial e epitelial.....	25
2.3.2	Injúria mediada por neutrófilos.....	26
2.3.3	Injúria e inflamação mediada por citocinas.....	27
2.3.4	Injúria mediada por oxidantes.....	28
2.3.5	Estágios patológicos da SDRA/LPA.....	28
2.3.6	Consequências patofisiológicas da SDRA/LPA.....	29
2.4	SDRA/LPA – USO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	29
2.5	SDRA/LPA – INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DESREGULADA E PROGRESSÃO DA SÍNDROME.....	32
2.6	METIRAPONA.....	32
2.7	MODELO ANIMAL DE SEPSE: CLP (Cecal Ligation and Puncture).....	33
2.8	ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	34
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	GERAL.....	38
3.2	ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	40
4.2	ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS.....	40
4.3	PREPARO DOS ANIMAIS.....	41
4.4	DOSAGEM PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA.....	43
4.5	IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA GR.....	44
4.6	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	45
4.7	REMOÇÃO DOS PULMÕES	46
4.8	HISTOLOGIA PULMONAR	47
4.8.1	Procedimento histológico no preparo das lâminas.....	47

4.8.2	Análise morfométrica.....	47
4.9	MEDIDAS BIOQUÍMICAS DO PULMÃO.....	48
4.9.1	Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	48
4.9.2	Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	49
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	PORCENTAGEM DE MORTALIDADE E RISCO DE MORTE.....	51
5.2	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CCT	51
5.3	ÁREA IMUNORREATIVA PARA O GR.....	53
5.4	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	55
5.5	FRAÇÃO DE ÁREA ALVEOLAR NORMAL E COLAPSADA.....	57
5.6	PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO PULMONAR.....	59
5.7	ATIVIDADE DA MPO NO TECIDO PULMONAR.....	60
5.8	NÍVEIS DE H ₂ O ₂ NO TECIDO PULMONAR.....	61
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO.....	87

1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição de casos de pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi feita por Ashbaugh et al. (1967), quando mostraram que a patologia tinha características próprias, podendo ser desencadeada por uma ampla gama de insultos como sepse, trauma e aspiração de conteúdo gástrico. Os primeiros pacientes descritos apresentavam infiltrado pulmonar difuso bilateral e necessitavam de ventilação mecânica (BERNARD, 2005). Após quase 50 anos e mais de 1200 citações desse estudo, a SDRA e a Lesão Pulmonar Aguda (LPA), uma forma mais branda da síndrome, permanecem como importantes causas de morbidade e mortalidade, com altos custos para a saúde, além de representarem um grande desafio terapêutico (LAM; SANTOS, 2008).

A necessidade de tratamentos mais eficientes para a SDRA/LPA tem resultado em um grande número de estudos que visam o melhor entendimento da patofisiologia da síndrome, uma vez que, na SDRA/LPA, a diminuição da inflamação é essencial para restaurar a homeostasia e para a sobrevivência. O maior desafio tem sido a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos no intenso processo inflamatório sistêmico presente na síndrome. Melhorar o entendimento dos mecanismos celulares que iniciam, propagam e restringem a inflamação é essencial para avançar nas modalidades de tratamentos existentes. Com o entendimento mais aprofundado da síndrome, associado aos avanços tecnológicos, os pesquisadores e médicos da área tentam chegar a resultados que viabilizem melhores prognósticos a todos os pacientes. Corroborando com essa perspectiva, o entendimento do papel dos glicocorticóides (GC) na síndrome se torna fundamental para esclarecer a causa da persistência da inflamação pulmonar, e o progresso da SDRA/LPA.

Ainda que saibamos que não se previne a SDRA ou a LPA, esse trabalho buscou enfatizar o aspecto da síndrome na ausência e na presença prévia de inibidor e agonista GC no tocante à intensidade dos parâmetros relacionados à ela. Além disso, estudos com animais são úteis para investigar as mudanças patofisiológicas precoces assim como o desenvolvimento da inflamação sistêmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SDRA/LPA – DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é definida, de acordo com a Conferência de Consenso Européia-Americana, como uma síndrome de insuficiência respiratória de instalação aguda, caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax, compatível com edema pulmonar, hipoxemia grave ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$ mmHg) que pode coexistir com hipertensão pulmonar e presença de um fator de risco para lesão pulmonar (sepse, trauma, pneumonia primária, politransfusão, pancreatite) (BERNARD et al., 1994). A SDRA não deve apresentar sinais clínicos ou ecocardiográficos de insuficiência atrial esquerda (THE ARDS DEFINITION TASK FORCE, 2012). Durante essa mesma Conferência de Consenso, foi criado o termo Lesão Pulmonar Aguda (LPA), cuja definição é idêntica à da SDRA, exceto pelo grau menos acentuado de hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$), com a finalidade de se identificar os pacientes mais precocemente durante a evolução de seu quadro clínico. Assim, todo paciente com SDRA apresenta LPA, porém nem todo paciente com LPA evolui para SDRA (AMATO et al., 2007).

A SDRA/LPA é frequente. Nos EUA, sua incidência foi estimada em 79 casos/100 mil habitantes ao ano, com variações sazonais nítidas, sendo mais frequente no inverno. Também se observou que a incidência é crescente com a idade, chegando a 306 casos/100 mil habitantes/ano, na faixa dos 75 aos 84 anos (RUBENFELD et al., 2005). A taxa de mortalidade tem diminuído nas últimas duas décadas, estimada entre 34% e 60% (RUBENFELD, 2003). Na década de 80 era de aproximadamente 70% (VILLAR; SLUTSKY, 1989). Porém, essas taxas devem ser interpretadas com cuidado, uma vez que a natureza da desordem clínica é um fator determinante. Por exemplo, a mortalidade na SDRA por sepse é maior que por trauma (43 vs 11%) (EISNER et al., 2001). No Brasil, o estudo epidemiológico de Oliveira; Basille Filho (2005), levantou que no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, a incidência de SDRA e LPA foi de 6,3% e 2,3% do total de admissões, respectivamente, com mortalidade de 84% para SDRA e 50% para LPA. Os principais fatores de risco foram pneumonia (37,7%), choque (32,0%), politrauma (24,6%) e sepse (21,1%). Os pacientes que sobrevivem têm permanência prolongada nas unidades de tratamento intensivo (UTI) e apresentam significativas limitações

funcionais, afetando principalmente a atividade muscular, reduzindo a qualidade de vida, persistindo por, pelo menos, um ano após a alta hospitalar (HERRIDGE et al., 2003).

2.2 SDRA/LPA – SEPSE COMO FATOR ETIOLÓGICO

Na sepse, agentes infecciosos afetam os pulmões indiretamente (via compartimento vascular), fazendo com que a doença se desenvolva rapidamente (STEINBERG; HUDSON, 2000).

A sepse é definida como uma reação inflamatória aguda sistêmica em resposta a uma infecção (RANGER-FAUSTO; PITTET; COSTIGAN, 2005). No Brasil, o BASES *Study*, estudo de coorte multicêntrico e observacional realizado em cinco UTI públicas e privadas, identificou uma incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes/dia (SILVA et al., 2004). De forma ainda mais preocupante, o estudo multicêntrico PROGRESS do qual fizeram parte sete UTI nacionais, revelou que as taxas de letalidade nas UTI no Brasil foram maiores (56%) que aquelas de outros países em desenvolvimento (45%) e de países desenvolvidos (30%) (BEALE et al., 2009).

A inflamação é iniciada pelo dano tecidual ou pela presença do microorganismo. Uma variedade de patógenos são reconhecidos de maneira inespecífica através de regiões presentes nos microorganismos, chamadas de PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), ou através de proteínas intracelulares ou mediadores liberados de células mortas, que associadas aos PAMPs são chamadas de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) (BIANCHI, 2007). Os DAMPs são representados por lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas (endotoxinas), ácido lipoteicóico e peptidoglicanos de gram-positivas (exotoxinas), entre outras, que disseminadas a partir do local agredido, ativam de modo sistêmico células de defesa. O LPS e as exotoxinas são liberadas normalmente durante a replicação ou morte bacteriana (OPAL, 2007). Os DAMPs se ligam aos receptores PRRs (*pattern-recognition receptors*) nas células do hospedeiro, tais como neutrófilos e monócitos/macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e epitélio pulmonar e intestinal. Essas células expressam receptores chamados de TLRs (*tool-like receptors*), uma subfamília dos PRRs, os quais são receptores transmembrana (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; BRIGHTBILL et al., 1999; LIEN; INGALLS, 2002). Há também os receptores NOD-like e RIG-like, os quais são PRRs intracelulares que reconhecem a invasão citoplasmática do

patógeno nas células do hospedeiro (MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Durante a sepse, há uma ativação sistêmica da resposta imune devido a liberação de grande quantidade de DAMPs do patógeno invasor e/ou do tecido lesado do hospedeiro, o que leva a uma superestimulação das células imunes. Como resultado, a sepse é acompanhada de um marcado desequilíbrio nas respostas às citocinas, conhecida como tempestade de citocinas (aumento nos níveis plasmáticos em até 100x), a qual converte a resposta que normalmente seria benéfica para combater a infecção em excessiva e danosa (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). O resultado é a síndrome da resposta inflamatória sistêmica que pode culminar com a disfunção múltipla dos órgãos (DMO) e a morte do paciente (PEREIRA Jr et al., 1998) (FIGURA 1).

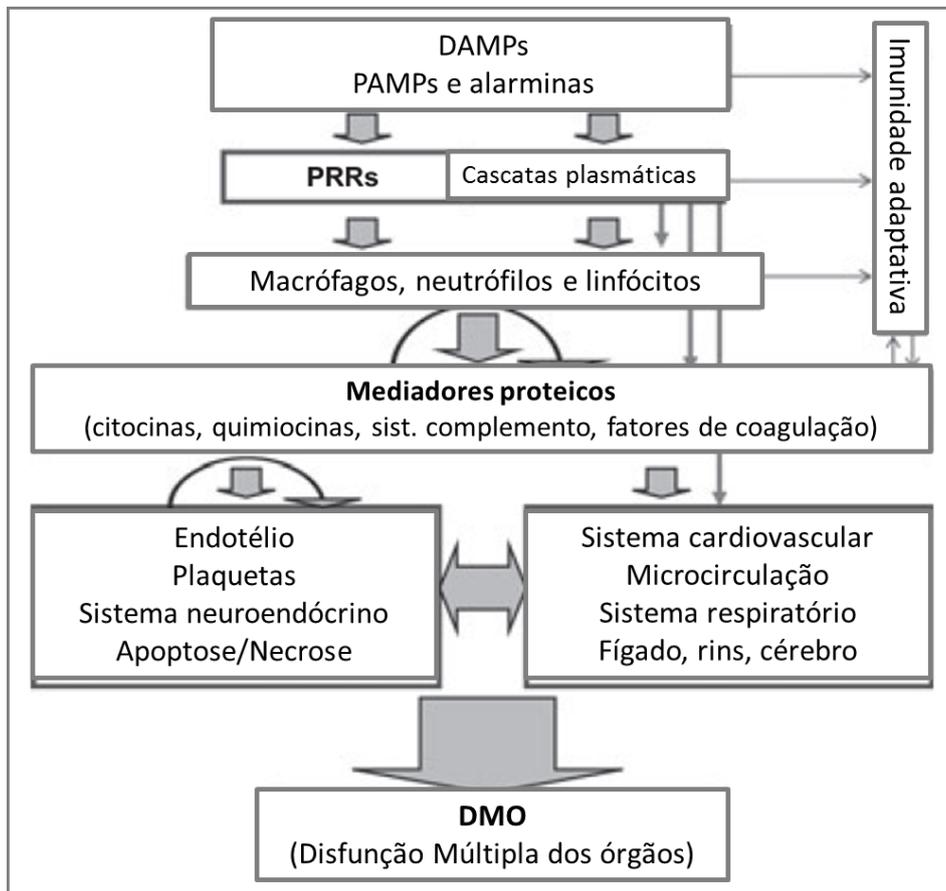


Figura 1 - Representação esquemática simplificada da resposta inflamatória aguda na doença crítica. As setas retas representam mecanismos de ativação e as curvas representam feed-back positivo no mecanismo de ativação.

Fonte: CASTELLHEIM et al., 2009. (adaptado)

Um dos órgãos mais atingidos em um episódio de sepse é o pulmão. A ligação dos DAMPs aos TLRs aciona diferentes vias celulares de sinalização com ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B). A ativação do NF- κ B é rápida e imediata, com sua translocação para o núcleo, onde se liga a regiões de genes alvo para iniciar a transcrição de citocinas inflamatórias, como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), TNF- α , além de quimiocinas e moléculas de adesão, evento considerado crucial no desenvolvimento de sepse e da inflamação pulmonar (COHEN, 2002; ZHANG; GHOSH, 2001; ROSS et al., 2000; KARIN; BEN-NERIAH, 2000; CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000). As citocinas ativam uma coleção de cascatas inflamatórias que inclui o sistema complemento, o sistema de coagulação, fatores de crescimento, neuromediadores, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SEONG; MATZINGER, 2004; KONO; ROCK, 2008).

TNF- α e IL-1 estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, células epiteliais dos pulmões e do intestino, facilitando a migração de leucócito, além de estimular células específicas do fígado, o qual produz proteínas de fase aguda, importantes para a defesa do hospedeiro por aumentar a produção de certas proteínas de coagulação e do sistema complemento (NETEA et al., 2003).

Nesta complexa teia fisiopatogênica, o TNF- α tem um papel relevante, ao estimular os leucócitos e as células endoteliais a liberarem mais citocinas (bem como mais TNF- α) e a aumentar o *turnover* de ácido aracdônico (CURI; HOMEM DE BITTENCOURT JR, 2007). Além disso, a interação entre TNF- α e IL-1, por estimulação recíproca, propicia o desenvolvimento de um estado pró-coagulante através da inibição da trombomodulina, além de promover uma série de alterações hemodinâmicas encontradas na sepse, tais como aumento da permeabilidade vascular, diminuição da resistência vascular periférica e inotropismo negativo.

O aumento da permeabilidade vascular ao nível de capilares alveolares provocados pelos mediadores inflamatórios e a lesão do endotélio causado pela adesão de neutrófilos, levam ao progressivo edema intersticial e dano do epitélio alveolar, o que compromete a hematose e agrava a hipóxia iniciada pela hipoperfusão. Assim, o que determinará a gravidade da lesão pulmonar é a magnitude da lesão da barreira alvéolo/capilar (BAC).

A possibilidade de reparo do epitélio alveolar no estágio inicial é o maior determinante para a recuperação (WIEDEMANN et al., 2006). Tratamentos específicos para auxiliar no reparo da BAC ainda não existem. A maioria das modalidades de tratamento é baseada na diminuição da inflamação pulmonar no sentido de minimizar a lesão inicial (GEISER, 2003).

2.3 SDRA/LPA – PATOFISIOLOGIA

A SDRA/LPA é uma síndrome de etiologia multifatorial caracterizada por lesão morfológica específica chamada de dano alveolar difuso (DAD) (KATZENSTEIN; BLOOR; LEIBOW, 1976). Essa síndrome manifesta-se como uma lesão severa, difusa e não homogênea dos lóbulos pulmonares levando a uma quebra da integridade da BAC e das trocas de gases, alterando a função pulmonar. Todos os componentes anatômicos dos lóbulos pulmonares (epitélio, endotélio e interstício) estão envolvidos, incluindo bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos, assim como artérias e veias (STEINBERG; HUDSON, 2000).

2.3.1 Dano endotelial e epitelial

No pulmão não patológico, dois componentes distintos constituem a chamada BAC: o endotélio microvascular e o epitélio alveolar (WARE; MATTHAY, 2000). Para a normalidade da função pulmonar, são necessários alvéolos com uma permeabilidade seletiva mantida, intimamente associados a capilares adequadamente perfundidos. Porém, os pulmões são particularmente vulneráveis a lesões inflamatórias uma vez que os mediadores, sendo liberados na circulação, atingem os pulmões através do débito cardíaco. Como consequência, os neutrófilos são atraídos e, tornando-se ativados, liberam mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesam direta ou indiretamente o endotélio vascular e o epitélio alveolar, propagando-se assim o processo inflamatório (PARSONS et al., 2005). A injúria e ativação endotelial podem levar a obstrução e destruição do leito vascular pulmonar.

O epitélio alveolar normal é composto predominantemente por células do tipo I que cobrem 90% da superfície alveolar para troca gasosa e são facilmente lesadas. As células cuboides do tipo II tem muitas funções primordiais, incluindo a produção de surfactante e de transporte de íons. Elas cobrem 10% da superfície alveolar e são mais resistentes à lesão (BACHOFEN; WEIBEL, 1982). A barreira epitelial é mais fina que a endotelial. Assim, a perda da integridade epitelial contribui para a formação do edema alveolar (LEWIS; JOBE, 1993). O edema é exacerbado pela disfunção do transporte de fluido no epitélio que ocorre tanto pela perda da integridade da barreira epitelial, quanto pela lesão das células do tipo II. O edema também se exacerba tanto pela disfunção do surfactante quanto pela presença de proteínas e

enzimas proteolíticas no espaço alveolar (BAKER et al., 1999). Citocinas como $TNF-\alpha$, leucócitos e o sistema de coagulação desestabilizam as pontes de ligações das proteínas de junção aderente no endotélio (caderina endotelial - mantém a integridade dos microvasos), e lesam células epiteliais, causando disfunção do transporte de fluido normal no epitélio, induzindo a formação do edema pulmonar (PUGIN et al., 1999; VESTWEBER et al., 2000). Desse modo, as barreiras habitualmente responsáveis por impedir a edema alveolar são perdidas, havendo escape de proteínas do espaço intravascular em direção ao espaço intersticial (WARE; MATTHAY, 2000; WIEDEMANN, 2006). O influxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos altera a integridade do surfactante, com lesão adicional ao tecido pulmonar e colapso alveolar (WARE; MATTHAY, 2000; WIEDEMANN, 2006) (FIGURA 2).

Se a injúria do epitélio é severa e repetida, um reparo epitelial desorganizado e inadequado culmina com fibrose.

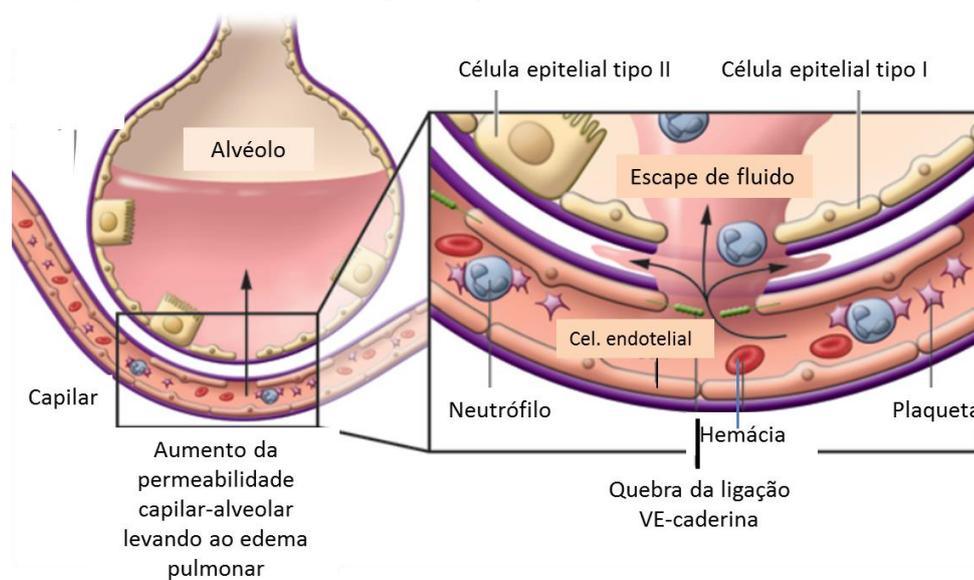


Figura 2 - Desenho esquemático mostrando a quebra da barreira alvéolo-capilar, resultando em aumento da permeabilidade à água, proteínas e outros solutos, sendo um marcador clínico e experimental LPA. O acúmulo intra-alveolar de neutrófilos, outros leucócitos e eritrócitos estão também associados às alterações da função da barreira endotelial e epitelial. $TNF-\alpha$, IL-1, trombina, microorganismos e suas toxinas e fatores gerados por neutrófilos e plaquetas podem desestabilizar e quebrar a função da barreira alveolar, permitindo o aumento da permeabilidade. A quebra da caderina endotelial vascular é o mecanismo central de alteração da função da barreira em modelos experimentais de sepse, uma vez que facilitam a migração transendotelial de leucócitos.

Fonte: MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012. (adaptado)

2.3.2 Injúria mediada pelos neutrófilos

Para causar injúria pulmonar, os neutrófilos devem ficar retidos nos pulmões em contato íntimo com as células endoteliais por meio de moléculas de adesão, e serem ativados para a liberação de produtos injuriosos (GINZBERG et al., 2001). Uma vez ativados, os neutrófilos podem liberar enzimas proteolíticas, como a elastase, que parece degradar as proteínas da junção epitelial, ERO, ERN, citocinas e fatores de crescimento (GINZBERG et al., 2001; MORAES; ZURAWSKA; DOWNEY, 2006). As proteases danificam a matriz extracelular pulmonar e facilitam a migração do neutrófilo do capilar para o espaço alveolar (PITTET et al., 1997). Outro potente produto liberado dos neutrófilos é o fator ativador plaquetário (FAP) e metabólitos do ácido aracdônico, como os leucotrienos (PITTET et al., 1997). A inflamação mediada pelos neutrófilos é normalmente terminada por sua apoptose, com subsequente eliminação do espaço aéreo por fagocitose pelos macrófagos alveolares (MATUTE-BELLO et al., 1997). Em pacientes com SDRA/LPA há evidente quebra do clearance neutrofilico com diminuídos níveis de apoptose (MATUTE-BELLO et al., 1997).

2.3.3 Injúria e inflamação mediada por citocinas

A resposta inflamatória na SDRA/LPA é iniciada, amplificada e modulada por um complexo de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias as quais são produzidas por uma variedade de tipos celulares nos pulmões, incluindo fibroblastos, células epiteliais, e células inflamatórias (GOODMAN et al., 2003).

Seguida da infecção, o aumento das citocinas proinflamatórias ocorre como uma resposta direta e/ou como um marcador seguido de injúria celular. Meduri et al. (1995) encontraram que níveis persistentemente elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α são fortes indicativos de predisposição a mortalidade na SDRA/LPA.

Além disso, macrófagos no tecido fagocitam microorganismos, secretam mais mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandina E2, leucotrienos e FAP, os quais fazem quimiotaxia para leucócitos, e induzem a liberação de óxido nítrico sintase induzida (NOSi) que sintetiza óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina na célula. Sendo o NO um radical livre, ele reage com superóxidos intracelulares formando peroxinitrito que é extremamente tóxico para o microorganismo fagocitado. Essa propriedade é essencial para a defesa do hospedeiro, mas quando a ativação se torna descontrolada, ela contribui para toxicidade também do tecido

adjacente (BONE, 1991; THIJIS et al., 1995; LOWRY, 1993; FONG et al., 1990). Como consequência da agressão pulmonar, da instalação do edema e de microatelectasias, inúmeras alterações patofisiológicas se estabelecem (WARE, MATTHAY, 2000; WIEDEMANN, 2006).

2.3.4 Injúria mediada por oxidantes

ERO e ERN podem ser geradas por macrófagos alveolares ativados e células endoteliais e epiteliais em resposta ao estímulo inflamatório. Eles são responsáveis por muito do dano celular que ocorre na SDRA/LPA (PITTET et al., 1997). A oxidação da membrana celular pode aumentar a permeabilidade da membrana celular. Há um marcado desequilíbrio entre oxidante e antioxidantes em pacientes com SDRA/LPA (CHABOT et al., 1998).

2.3.5 Estágios patológicos da SDRA/LPA

Muito embora o edema pulmonar seja o elemento característico das fases iniciais da síndrome, o padrão da lesão envolve três estádios patológicos distintos, dividido de acordo com o tempo e a evolução clínica da síndrome (BELLINGAN, 2002; ANTONIAZZI et al., 1998):

(1) fase exsudativa ou aguda (1-6 dias) – caracterizada por edema e hemorragia. Há evidências de lesão endotelial e epitelial, edema pulmonar com acúmulo de neutrófilos, macrófagos e hemácias nos alvéolos com formação de membranas hialinas.

(2) fase proliferativa ou subaguda (7-14 dias) – caracterizada por organização e reparo. Há evidência de reparo pela proliferação de células epiteliais do tipo II, além de infiltração de fibroblastos, deposição de colágeno e diminuição do edema.

(3) fase de fibrose ou crônica (após 14 dias). Há remissão do infiltrado neutrofilico, maior presença de macrófagos e e reparo do epitélio alveolar. Ocorre frequentemente fibrose

Essas fases são superponíveis e heterogêneas, uma vez que já ficou demonstrado que a fibrose pode aparecer precocemente, nas primeiras horas da síndrome (MARTIN et al., 1995).

É importante salientar que as três fases histológicas de lesão e reparação não necessariamente ocorrem em todos os pacientes com SDRA. Em alguns indivíduos, o processo inflamatório é autolimitado e a BAC é rapidamente restabelecida. Em outros, o processo é mais

demorado, acabando também por ocorrer recuperação pulmonar (TOMASHEFSKI, 2000; BELLINGAN, 2002).

2.3.6 Consequências patofisiológicas da SDRA/LPA

A lesão pulmonar na SDRA determina numerosas consequências, incluindo profundas alterações nas trocas gasosas, na circulação pulmonar e nas propriedades mecânicas do sistema respiratório.

O edema e o colapso alveolar, mais intensos nas fases precoces da SDRA, são responsáveis pela grave hipoxemia que estes pacientes apresentam. Os alvéolos não ventilados continuam a ser perfundidos, o que determina áreas de baixa relação ventilação-perfusão (baixa V/Q) e shunt pulmonar, com consequente hipoxemia (BELLINGAN, 2002; SOUZA et al., 2003). O aumento do espaço morto fisiológico pode interferir com a eliminação de CO₂; e embora a hipercapnia seja incomum, o volume por minuto necessário para manter uma pressão de CO₂ normal aumenta significativamente (DANTZEKER et al., 1979).

2.4 SDRA/LPA – USO DE GLICOCORTICÓIDES

Entender os mecanismos celulares que iniciam e propagam a inflamação na sepse e na SDRA/LPA é essencial para avançar nas modalidades de tratamento e para desenvolver métodos de monitorização da progressão da síndrome e da resposta à terapia. Na SDRA/LPA, a diminuição da inflamação sistêmica é essencial para restaurar a homeostase, diminuir a disfunção dos órgãos, a morbidade, e melhorar a sobrevivência do paciente (MARIK et al., 2011).

Os glicocorticóides (GC), também conhecidos como corticosteróides ou esteróides, são os mais efetivos tratamentos anti-inflamatórios para muitas doenças, incluindo asma, artrite, doenças auto-imunes, doença pulmonar obstrutiva crônica, além da SDRA e LPA (BARNES; ADCOCK, 2009). A função dos GC é manter a homeostase do organismo, exercendo efeitos desde funções metabólicas às funções anti-inflamatórias (LAMBERTS; BRUINING; DE JONG, 1997; CHROUSOS, 2000; POLITO; ABOAB; ANNANE, 2006).

Os GC naturais são hormônios derivados do colesterol, secretados pela zona fasciculata da glândula adrenal. A síntese e liberação dos GC é feita sobre um ritmo circadiano dinâmico regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (BIDDIE; CONWAY-CAMPBELL; LIGHTMAN, 2012). O principal estímulo fisiológico para a síntese e liberação é a presença do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado pela adenohipófise. A liberação de ACTH, por sua vez, é regulada em parte pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) derivado do hipotálamo e, em parte, pelo nível de GC no sangue. A liberação de CRH é inibida pelos níveis de GC e em menor grau pelo ACTH (FIGURA 3A). Outros estímulos podem promover a liberação de CRH como o calor ou frio, lesões ou inflamações (MEDURI, 2002).

A viabilidade dos GC nos tecidos é regulada pela ligação do GC à albumina sérica e pela expressão local da enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11- β HSD1), a qual converte o cortisol inativo em ativo (CLARK; BELVISI, 2012) (FIGURA 3B).

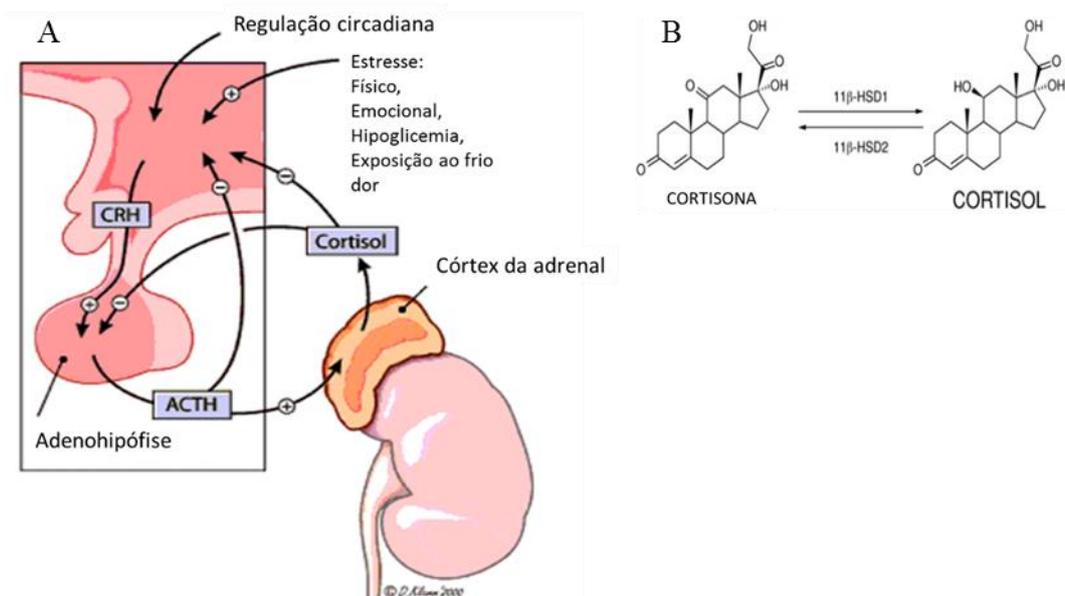


Figura 3 - Representação esquemática da regulação dos níveis de GC pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

(A) A síntese e liberação dos GC endógenos é feita sobre uma regulação circadiana e ultradiana dinâmica pelos núcleos paraventriculares do hipotálamo. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH), secretado pelo hipotálamo, estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na adenohipófise. O ACTH induz a síntese e a liberação de cortisol no córtex da glândula adrenal para a circulação sanguínea.

(B) A forma biologicamente ativa do GC, sob a forma de cortisol (no humano), pode ser convertida em forma inativa (cortisona) pela enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo2 (11- β HSD2). A tipo1 (11- β HSD1) converte a cortisona em cortisol. A homeostase dos níveis de GC é mantida por *feed-back* negativo, suprimindo os níveis de ACTH na adenohipófise e CRH no hipotálamo.

Fonte: KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013. (adaptado)

Os GC sintéticos são drogas que se assemelham aos naturais. O uso clínico dos GC sintéticos data de antes de 1940. Prednisolona/prednisona, dexametasona e budesonida são os GC mais prescritos. Suas diferenças com os naturais são a potência e o clearance metabólico. A dexametasona, por exemplo, não é inativada pela 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11- β HSD2), o que aumenta sua disponibilidade no tecido (WEINSTEIN, 2012).

Ambos GC naturais e sintéticos transduzem suas ações por se ligarem a receptores de glicocorticóides (GR). Os GR apresentam basicamente duas isoformas: GR α e GR β . As isoformas são expressas em aproximadamente todos os tipos de tecidos e a sinalização dos GC é prevalente em vários sistemas orgânicos. Os GR α , uma vez ligados aos GC, exercem efeitos transcricionais. Todavia, os GR β residem constitutivamente no núcleo e agem como inibidor negativo dominante natural da isoforma GR α . Em outras palavras, GR β regula negativamente as ações da isoforma GR α (LEWIS-TUFFIN et al., 2007).

Na ausência do agonista, o GR α reside no citosol ligado às proteínas chaperone, como a proteína do choque térmico 90 (hsp90). Sob a ligação do ligante, o GR α muda sua conformação e transloca-se até o núcleo, onde se liga como dímero na sequência de DNA chamado de elementos responsivos aos GC (GRE), modulando a transcrição dos genes alvo dos GC de maneira positiva (transativação) ou negativa (transrepressão), na dependência do contexto do promotor e da participação de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras (DEJEAN; RICHARD, 2013). A ação dos fatores de transcrição pode ser modulada independentemente de ligação direta ao DNA, através de interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição, como a proteína de ativação 1 (AP-1) e o NF- κ B nas regiões regulatórias de diferentes genes (BARNES, 2010). É sabido que o NF- κ B e o GR α (ativado por GC endógenos e exógenos) tem funções opostas (estimulatória vs inibitória, respectivamente) na regulação da inflamação (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). O complexo GC-GR pode interagir fisicamente com NF- κ B, bloqueando sua atividade transcricional; pode induzir à síntese da proteína I κ B, via interação com GRE em regiões promotoras de genes alvo; pode bloquear a degradação da proteína I κ B, por aumento da síntese de IL-10 (MCKAY; CIDLOWSKI, 1999; DE BOSSCHER; VANDEN BERGHE; HAEGEMAN, 2003). A interação direta entre o GR e NF- κ B é o mais importante efeito anti-inflamatórios dos GC (MCKAY; CIDLOWSKI, 1999). Além disso, os GC induzem e ativam a lipocortina (anexina-1), um peptídeo que interage fisicamente com a fosfolipase A2, inibindo-a e impedindo a formação do ácido araquidônico e consequentemente de seus substratos (DE BOSSCHER; VANDEN BERGHE; HAEGEMAN, 2003).

2.5 SDRA/LPA- INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DESREGULADA E PROGRESSÃO DA SÍNDROME

O uso de GC tem sido proposto para o tratamento de SDRA/LPA por causa de suas propriedades anti-inflamatórias (STEINBERG, 2006; MARIK, 2011; RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Recentes triagens com o uso prolongado de baixas doses de GC mostrou reduzir a morbidade e mortalidade dos pacientes (MEDURI et al., 2007). Mas outros trabalhos ainda mostram resultados controversos (PETER et al., 2008; AGARWALL et al., 2007). Talvez a falha no sucesso do tratamento venha de um entendimento teórico simplificado da síndrome, como sendo meramente um processo inflamatório prolongado e que, até recentemente, tinha como contribuições estratégias ventilatórias com alto volume corrente como parte do tratamento (LEAVER; EVANS, 2007; NIN et al., 2009; THE ARDS NETWORK, 2000). Mecanismos moleculares e dados fisiológicos mostram uma forte associação entre a inflamação sistêmica desregulada e a progressão da SDRA/LPA. Na SDRA, a *down regulation* da inflamação sistêmica mediada por GR é essencial para restaurar a homeostasia, diminuir a morbidade e melhorar a sobrevivência. Pacientes com SDRA não resolvida apresentam uma condição chamada de resistência adquirida ao GC associada a inflamação sistêmica, em que ocorre deficiência da *down regulation* mediada por GC das citocinas inflamatórias, mesmo com elevados níveis de cortisol circulantes (MEDURI et al., 2009). Essa condição leva a injúria tecidual, coagulação intra e extravascular e proliferação de células mesenquimais (fibriproliferação), todas resultando em reparo pulmonar mal adaptado, evoluindo para fibrose e progressão para disfunção de órgãos extrapulmonares (MEDURI et al., 2009). Os altos níveis de citocinas também promovem o crescimento bacteriano e aumenta a susceptibilidade a infecção nosocomial (MEDURI, 2002). A ativação de NF- κ B por citocinas pró-inflamatórias e ativação de GR α também afetam a progressão histológica da SDRA. Assim, medidas celulares têm estabelecido que o aumento na ativação de NF- κ B é um componente patogênico pré-morte na sepse e na SDRA, e que o aumento da atividade de GC-GR α é necessário para a *down-regulation* de NF- κ B (MEDURI et al., 2005).

2.6 METIRAPONA

A metirapona (met), inibidora da enzima 11- β hidroxilase, é um poderoso e seletivo inibidor da síntese de GC em humanos e animais (ROOZENDAL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). Este agente afeta a conversão da deoxicorticosterona, o precursor da corticosterona, no córtex da adrenal do rato, e de 11-deoxicortisol em cortisol, na adrenal humana, prevenindo a síntese e a subsequente liberação de corticosterona (CCT) e cortisol, respectivamente (BREIVIK et al., 2000; HAYNES, 1990). A administração de met resulta na secreção de deoxicortisol, um esteróide relativamente inerte. Uma única administração periférica de met induz, em dose dependente, a inibição da síntese de GC (ROOZENDAL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). Esta substância exerce não somente efeitos sobre a síntese de esteróide na adrenocortical, mas também inibe a enzima 11- β -HSD-1, que degrada o cortisol inativo em ativo no sistema nervoso central (RAVEN; CHECKLEY; TAYLOR, 1995).

A met possui a vantagem de não interferir na síntese e liberação de hormônios adrenomedulares, já que muitos efeitos da CCT são mediados pela influência de catecolaminas circulantes (ROOZENDAL; BOHUS; MCGAUGH, 1996; BORRELL; DE KLOET; BOHUS, 1984).

A met tem sido considerada um método alternativo à adrenalectomia para a inibição da produção de GC sistêmico, uma vez que os animais que sofrem a cirurgia podem eventualmente morrer, não sendo possível estudos a longo prazo (BREIVIK et al., 2000). Inúmeros estudos tem mostrado que o uso da met pode favorecer a expressão de RNAm de TNF- α , além de aumentar a expressão de IL-1 β e IL-18 (YE et al., 2004; AL-ANATI; KATZ; PETZINGER, 2005; LI et al., 2006; MICHEL et al., 2007). A administração de met modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias independente dos níveis plasmáticos de CCT (PERUZZO et al., 2010).

A met foi usada neste trabalho como método alternativo à adrenalectomia, no intuito de se estudar a influência dos GC endógenos na patogênese da injúria pulmonar.

2.7 MODELO ANIMAL DE SEPSE: CLP (*Cecal Ligation and Puncture*)

Tradicionalmente a SDRA tem sido dividida em insulto direto ou pulmonar e indireto ou extra pulmonar, dependendo do fator iniciante (PELOSI; CAIRONE; GATTINONI, 2001, MINAMINO; KOMURO, 2006). O estágio inicial da síndrome tem características distintas dependendo do tipo de insulto. No insulto direto a estrutura primariamente lesada é o epitélio

alveolar. No insulto indireto, a estrutura primariamente lesada é o endotélio vascular. Este último tipo tem sido estudado em modelos animais através da administração intraperitoneal ou intravascular de toxinas ou por modelos de perfuração e ligadura cecal (CLP). Nos humanos, o insulto indireto é causado por sepse, trauma, choque, transfusões, etc (WIEDEMANN et al., 2006).

Modelos animais são importantes porque fornecem uma ponte entre o paciente e a bancada do laboratório. Hipóteses geradas em estudos humanos podem ser testadas diretamente em modelos animais obtendo resultados relevantes (MENEZES et al., 2005).

O CLP também é um modelo de LPA, por reproduzir os mecanismos e consequências da lesão pulmonar em humanos, ainda que seja por um curto intervalo de tempo. É o modelo que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória, com subsequente desenvolvimento de DMO (BROOKS et al., 2007). Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BROOKS et al., 2007). Apesar do CLP estar mais próximo a um quadro clínico e, por isso, ser um modelo mais adequado para o estudo da sepse, há modelos em que bactérias ou LPS da parede bacteriana são administrados i.v. ou i.p. Dados da literatura mostram que a patogênese da sepse se difere da administração de LPS e de um foco infeccioso (peritonite) (BAGBY et al., 1991). A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos é devido à quantidade do estímulo, ao local de indução e à forma de administração (em *bolus* ou liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta de liberação dos mediadores inflamatórios (WALLEY et al., 1996). A partir desses fatos, a utilização do modelo CLP para o estudo da sepse, descrito inicialmente por Wichtermann; Baue; Chaudry (1991), e Baker et al., (1983), apresenta maior relevância para a compreensão da evolução da doença.

A intensidade dos danos causados pela sepse induzida pelo modelo CLP é determinada pelo número de perfurações realizadas e pelo diâmetro da agulha utilizada. Estudos sugerem que a resposta do grupo submetido à sepse letal aparece, primariamente, desenvolvendo maior estresse oxidativo e alta mortalidade, em torno de 90%, em 10 dias; sepse moderada ou subletal apresenta cerca de 40-60% de mortalidade e a branda ou não letal em torno de 0-10% (ANDRADES et al., 2005; KUHLMANN, 1994).

2.8 ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

O tecido pulmonar é um sistema altamente complexo de células, fibras, biomoléculas e fluido que apresenta propriedades elásticas e dissipativas. Tem se tentado prever, através da avaliação da mecânica respiratória, como os componentes das vias aéreas e do tecido pulmonar se comportam. As propriedades mecânicas dos pulmões determinam como a pressão muscular, o fluxo das vias aéreas, e os volumes pulmonares estão relacionadas. Portanto, os dados experimentais requeridos para a construção de modelo de mecânica pulmonar, usualmente consistem de fluxo/volume e pressão (BATES, 2009). Há numerosas doenças que podem dificultar o trabalho realizado pelos pulmões. Essas patologias normalmente envolvem anormalidades mecânicas e exibem graus variados de padrões obstrutivos e restritivos. O que é certo é que as anormalidades na função da mecânica pulmonar acompanham uma grande e importante variedade dessas patologias, como a SDRA secundária à sepse. Assim, a avaliação da mecânica respiratória permite o diagnóstico da lesão, sendo uma importante medida para acompanhar a progressão da doença pulmonar (BATES, 2009).

O *flexiVent* (SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada) é um ventilador mecânico amplamente utilizado para mensuração da mecânica respiratória em pequenos animais (por exemplo: ratos - módulo II) (FIGURA 4A). Este equipamento permite a ventilação mecânica de animais sedados e curarizados, além de atuar na avaliação da mecânica respiratória por permitir que perturbações de volumes pré-estabelecidos sejam aplicadas ao sistema respiratório via traquéia (SCHUESSLER; BATES, 1995; BATES; ALLEN, 2006). O ventilador é controlado por um computador que intercala a ventilação com manobras (perturbações) utilizando volumes controlados para a obtenção de dados precisos e reprodutíveis para avaliação da mecânica respiratória (FIGURA 4B).

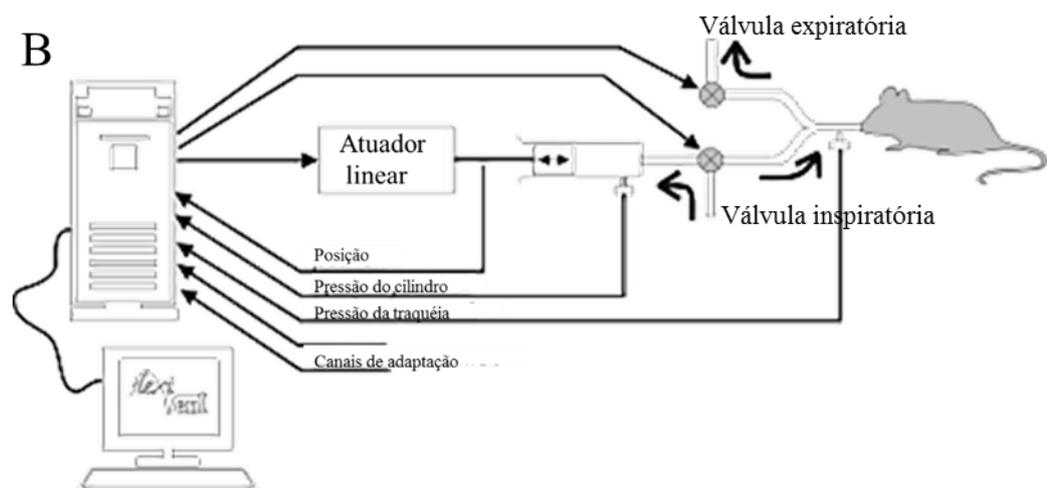


Figura 4 – Ilustrações do ventilador mecânico (*flexiVent*).

(A) Foto mostrando o módulo I utilizado para camundongos e o módulo II para ratos;

(B) Diagrama do ventilador mecânico acoplado ao computador usado para manobras e coleta dos dados de mecânica respiratória.

Fonte: (A) <http://www.scireq.com/products/flexivent/> (adaptado)

(B) <http://www.med.unc.edu/geneticsdept/kollerlab/researchinterests.htm>. (adaptado)

A técnica de oscilações forçadas (perturbações) foi originalmente descrita por Dubois; Lanphier; Marshall, (1956). Esta técnica consiste da aplicação de um fluxo/volume conhecido nos pulmões através da traquéia, medindo-se a pressão resultante gerada na traquéia e relacionando os dois sinais para uma estimativa da impedância do sistema respiratório, assumindo que este apresenta um comportamento linear (MORIYA; MORAES; BATES, 2003; MICHAELSON; GRASSMAN; PETERS, 1975). De uma maneira simplista, a impedância do sistema respiratório tem origem, principalmente, nas forças resistivas, elásticas e inertivas que

se opõem aos movimentos inspiratórios e expiratórios e é dada pela relação entre a perturbação de volume aplicada na traquéia e a pressão medida no mesmo local (CAMPOS et al., 2012). O fluxo utilizado para excitar o sistema respiratório é de ar ambiente ou de uma outra mistura gasosa conhecida.

Para a análise da impedância ($Z(f)$), o sistema utiliza o modelo de fase constante (GOMES et al., 2000):

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G_{tis} - i \cdot H_{tis}}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

$$\alpha = 2/\pi \cdot \arctan(H_{tis}/G_{tis})$$

Onde R_{aw} é a resistência das vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas devido a massa de gás na via aérea central, sendo desprezível para frequências menores que 20 Hz. O G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares e H_{tis} a energia acumulada nestes tecidos. Os dois últimos parâmetros funcionariam de modo análogo a molas e amortecedores do tecido pulmonar. G_{tis} é comumente chamada de viscosidade tecidual e representa o componente dissipativo dos tecidos. H_{tis} é aproximadamente relacionada à elasticidade tecidual e reflete a conservação de energia nos tecidos pulmonares. Ainda, i é a unidade imaginária e f a frequência em Hz. A histeresividade (η) é definida como a razão de G_{tis}/H_{tis} (BATES, 2009).

Os parâmetros de mecânica, estimados pelo modelo de fase constante, foram resistência da via aérea (R_{aw}), viscosidade do tecido (G_{tis}), elasticidade do tecido (H_{tis}) e histeresividade (η).

3 OBJETIVOS

Há extensos trabalhos que utilizam GC como parte do tratamento da sepse, tanto em humanos quanto em animais, e seus resultados parecem bastantes controversos. A participação dos GC no âmbito da inflamação pulmonar na sepse também precisa ser mais profundamente investigada. Desta forma, é necessário saber se as alterações pulmonares inflamatórias na sepse se relacionam com a presença ou ausência de GC para talvez elucidar melhor o benefício deste agente farmacológico no âmbito da síndrome no quadro infeccioso generalizado.

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar e avaliar a influência dos GC na Lesão Pulmonar Aguda de ratos submetidos à sepse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tendo como hipótese de que o pré-tratamento com inibidor de GC intensificaria a disfunção respiratória na sepse, objetivamos:

- a) dosar os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC;
- b) quantificar e avaliar a área imunorreativa para receptores de GC nos pulmões de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC;
- c) analisar os dados de mecânica respiratória de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC;
- d) avaliar a morfometria do pulmão de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC;

- e) determinar a atividade da mieloperoxidase do homogeneizado de pulmão de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC.
- f) determinar os níveis de peróxido de hidrogênio do homogeneizado de pulmão de ratos induzidos ou não à sepse e pré-tratados ou não com inibidores e agonista de GC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O material e métodos utilizados para a realização desse trabalho são descritos abaixo.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados cento e quarenta e quatro ratos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 250 e 300g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram acondicionados e tiveram livre acesso à ração e água em todo período do experimento, e os cuidados necessários no Laboratório de Fisiologia da UNIFAL-MG.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UNIFAL-MG sob o protocolo de número 341/11 e foram conduzidos de acordo com a declaração de Helsinki para o bem estar de animais de experimentação.

4.2 ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS

Primeiramente os animais foram randomizados em 3 grupos principais: Naïve, Sham e CLP. No grupo Naïve ($N = 8$), os animais não sofreram qualquer procedimento ou pré-tratamento. No grupo Sham ($N = 8$), os ratos tiveram somente o ceco exposto sem perfuração e foram pré-tratados com salina i.p., uma hora antes da cirurgia. No grupo CLP, os animais tiveram o ceco exposto, ligado e perfurado e foram divididos em três grupos de acordo com os pré-tratamentos realizados uma hora antes da cirurgia: CLP sal ($N = 8$; salina em volume equivalente de 0,9 % NaCl i.p.); CLP met ($N = 8$; metirapona 50 mg.kg⁻¹ i.p., Sigma, St Louis, EUA), (ALEXANDER, B. N.; FEWELL, J. E., 2011); CLP dex ($N = 8$; dexametasona 0.5 mg.kg⁻¹ i.p., Merck, Sharp & Dohme, Brasil) (FIGURA 5). Os grupos foram reorganizados para serem ventilados mecanicamente 6 e 24 horas após a cirurgia.

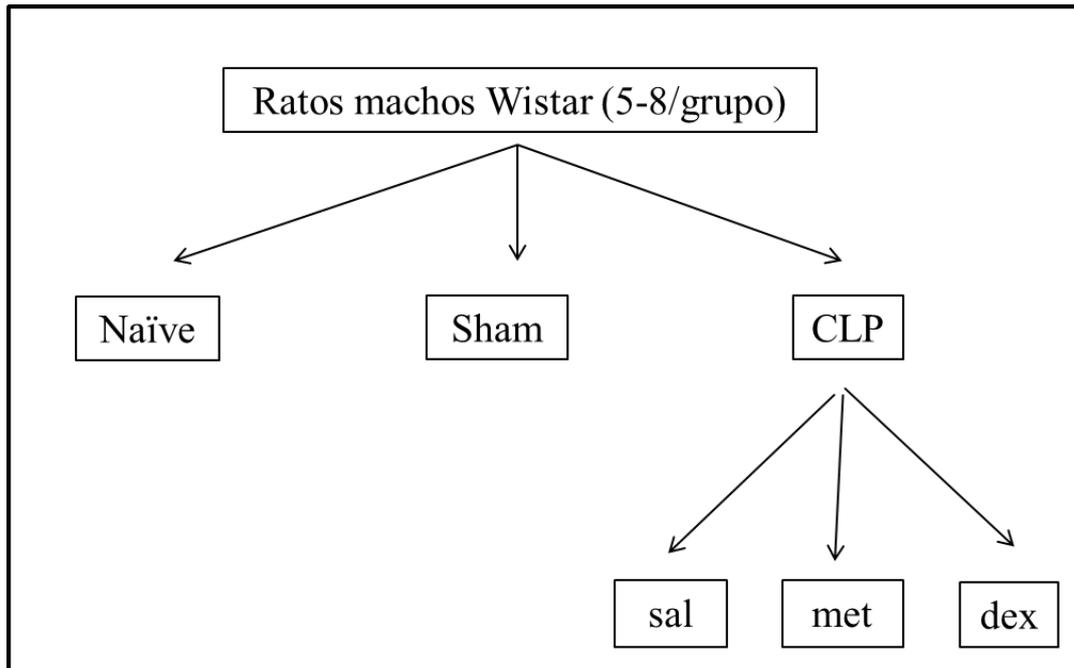


Figura 5 - Representação esquemática da randomização dos grupos experimentais: Naïve = controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal = salina; met = metirapona e dex = dexametasona.

Fonte: Da autora.

4.3 PREPARO DOS ANIMAIS

Para o procedimento de CLP, os animais foram anestesiados com TBE (tribromoetanol) 250 mg.kg^{-1} i.p. e tricotomizados na região abdominal. Foi realizada a laparotomia com uma incisão longitudinal, infra-umbilical de 1 cm. O ceco foi exteriorizado e semi-ocluído utilizando uma cânula de plástico como guia e realizada uma ligadura com fio de seda a 4 mm da válvula íliocecal (FIGURA 6). Foi perfurado por 10 vezes com agulha 19-G e delicadamente pressionado para extravasamento do conteúdo fecal. O ceco foi reposicionado e a cavidade abdominal suturada em dois planos. Nos animais do grupo Sham, o ceco foi somente exteriorizado e em seguida retornado ao abdômen e a cavidade abdominal suturada.

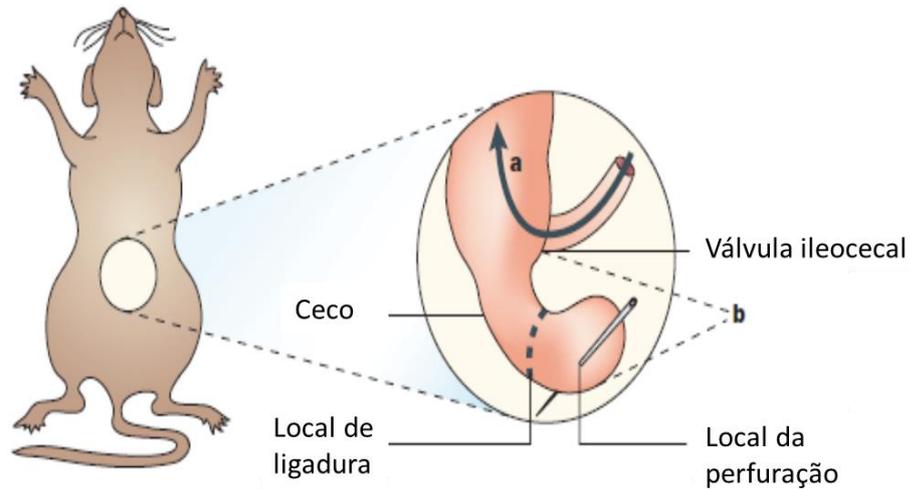


Figura 6 - Modelo experimental de sepse: perfuração e ligadura cecal (CLP). O ceco (no detalhe) é exposto por laparotomia.
 a) representa a junção entre o intestino delgado e o grosso (ceco);
 b) representa a porção do ceco em que sofre as perfurações;
 c) porção em que é parcialmente ligada (sem que haja obstrução).
 Fonte: BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005. (adaptado)

Após a cirurgia, os animais receberam solução salina ($100 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$) para expansão volêmica. Os animais foram mantidos aquecidos até a recuperação completa da anestesia e monitorados por 6 e 24 horas até o começo dos procedimentos experimentais. Os experimentos sofreram duas etapas: a primeira etapa envolveu a coleta de dados da mecânica respiratória e de tecido pulmonar para procedimentos histológicos ($N = 5-8$ por grupo) (FIGURA 7) e a segunda etapa envolveu a coleta de sangue para dosagem plasmática de CCT e de tecido pulmonar para as medidas bioquímicas ($N = 8$ por grupo) (FIGURA 8).

Primeira etapa

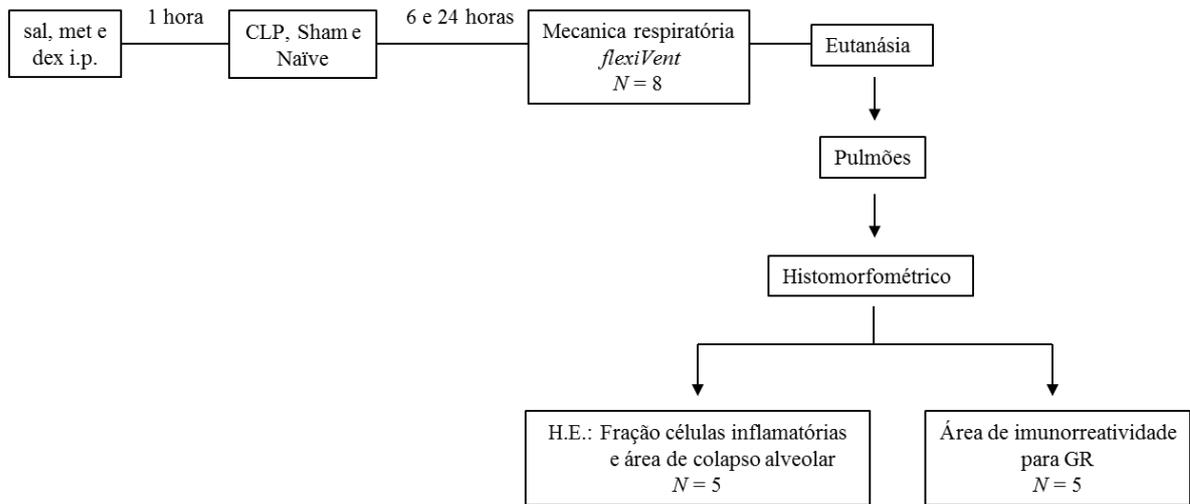


Figura 7 - Representação esquemática da primeira etapa do protocolo experimental, mostrando desde a aplicação das drogas até 6 e 24 horas da instalação da sepse. Sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona; CLP: perfuração e ligadura cecal; Sham: controle cirúrgico; H.E.: hematoxilina e eosina; GR: receptor de glicocorticóide.

Fonte: Da autora.

Segunda etapa

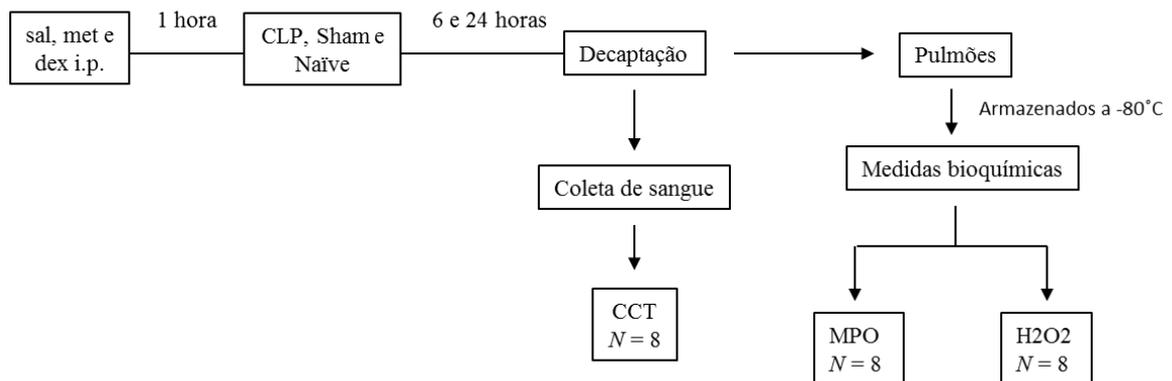


Figura 8 - Representação esquemática da segunda etapa do protocolo experimental, mostrando desde a aplicação das drogas até 6 e 24 horas da instalação da sepse. Sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona; CLP: perfuração e ligadura cecal; Sham: controle cirúrgico; CCT: corticosterona; MPO: mieloperoxidase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

Fonte: Da autora.

4.4 DOSAGEM PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA (CCT)

Para as dosagens plasmáticas de CCT, os animais foram decapitados e o sangue coletado em tubos Eppendorf contendo 20 µl de EDTA a 0,05 M. O sangue foi imediatamente centrifugado (2000 rpm, 4°C, 15 min.) para a separação do plasma e o plasma congelado. As dosagens de CCT foram realizadas utilizando-se a técnica de radioimunoensaio específica (ELIAS et al., 1997). Para tal, em 25µl de plasma foi acrescentado 1ml de etanol. Após agitação, incubação por 30 min e centrifugação (2500 rpm, 20 min, 4°C), as amostras foram liofilizadas e mantidas a -20°C até o momento das dosagens hormonais. No momento do ensaio as amostras foram ressuspensas com 2500µl de tampão do ensaio da corticosterona. Para o ensaio foi utilizado o hormônio marcado com trítio (3H-corticosterona) usando anticorpo padrão e específico (Sigma St Louis, MO, EUA). A especificidade do anticorpo foi testada através de reatividade cruzada com o cortisol (1%), 17-OH-progesterona (1%) e sulfato de dehidroepiandrosterona (12%). A separação das frações livre e ligada foi realizada com a utilização da solução de carvão-dextrana 0,5/0,05%. Resultados foram expressos em ng.ml⁻¹.

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA GR

Cortes de 4 µm de espessura de pulmão em parafina foram obtidos em micrótomo diretamente sobre lâminas tratadas com poli-L-lisina (1:8) e submetidos inicialmente ao processo de recuperação antigênica com tampão citrato (ácido cítrico 10 nM, Tween 20 0,05%, pH 6) por 30 minutos a 65°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro normal de cavalo 10% em PBS (0,01M, contendo Triton 0,1% e NaN₃ 0,04%) por 2 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas (3x) “gentilmente” com PBS (0,01M) e incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-GR (rabbit, 1:1000, Santa Cruz, EUA) em câmara úmida. Após esse período, as lâminas foram novamente lavadas (3x) em PBS (0,01M) e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente Cy3 donkey α-rabbit (1:250, Jackson Immunoresearch, EUA) por um período de 2 horas. Após a incubação, as lâminas foram lavadas (3x) com PBS (0,01M) e contracoradas com o marcador nuclear DAPI (stock 15 mM, 1:12500) por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas, secas em temperatura ambiente e fixadas a lamínulas com meio de montagem para posterior visualização em microscópio. A quantificação do sinal imunofluorescente foi realizada em 5 áreas pulmonares de cada animal, selecionadas aleatoriamente, utilizando a objetiva de 40x de um microscópio óptico de fluorescência (*Eclipse 80i Nikon Corporation, Japão*) com câmera acoplada. Foram quantificadas, em µm², a área

total de imunorreatividade para GR, a área de imunorreatividade nuclear para GR (dada pela sobreposição da marcação para o receptor e a marcação com DAPI) e a área de imunorreatividade citoplasmática para GR (dada pela subtração da fração nuclear da área total de marcação). Para tanto, foi utilizado um software de processamento de imagem (*Image J, NIH, EUA*) com limiares RGB fixos para todos os grupos experimentais. A quantificação média de cerca de 5 animais por grupo foi utilizada para compor a amostra experimental.

4.6 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Para a medida da mecânica respiratória em 6 e 24 horas após a indução da sepse, os animais foram pré-anestesiados com xilazina 8 mg.kg⁻¹ i.p. (Anasedan, Ceva, Brasil) anestesiados com pentobarbital 40 mg.kg⁻¹ i.p. (Nembutal, OAK, EUA) e receberam analgésico Cloridrato de tramadol 30 mg.kg⁻¹ i.p. (Tramal, Grumenthal, Brasil). Após instalação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma pequena placa aquecedora (Heat Pad, Insight, Brasil) mantida a 37° C, sob foco cirúrgico.

Primeiramente foi realizada a traqueostomia para a inserção de uma cânula de metal (14G), fixada na traquéia do animal por meio de fios de algodão, a qual foi conectada ao ventilador. Os animais foram ventilados com volume corrente (Vt) de 6 ml.kg⁻¹, frequência respiratória de 120 min⁻¹ e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3,0 cmH₂O. Optou-se pelo Vt de 6 ml.kg⁻¹ por ser um volume considerado protetor ou não causador de LPA. Após iniciada a ventilação, os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (1,0 mg.kg⁻¹, i.p.). A impedância do sistema respiratório (Zrs) foi medida aplicando técnicas de oscilações forçadas. Assim, após 5 minutos da administração de pancurônio, o ventilador promoveu duas manobras de recrutamento alveolar, chamadas de *total lung capacity* (TLC), com intervalo de 30 segundos entre elas. Depois dos recrutamentos, o ventilador realizou duas manobras de oscilação forçada de duração de 8 s. cada e componentes de frequência entre 0 e 20 Hz, denominadas a partir de agora como Prime-8, no intuito de se obter os parâmetros de mecânica respiratória, tais como: resistência das vias aéreas (R_{aw}), viscosidade tecidual (G_{tis}), elasticidade tecidual (H_{tis}) e histeresividade (η).

Os experimentos foram conduzidos com a parede do tórax preservada. Ao final do experimento, a traquéia foi clampeada no final da expiração para posterior remoção dos pulmões.

O protocolo experimental da ventilação mecânica teve a duração de dez minutos para cada animal (FIGURA 9). Os animais permaneceram no ventilador por um pouco mais de tempo, até que fosse realizada a exsanguinação e consequente morte do animal. A ventilação mecânica durante o protocolo experimental foi interrompida somente em intervalos de tempos determinados para aplicar as perturbações e assim obter os valores dos parâmetros desejados.

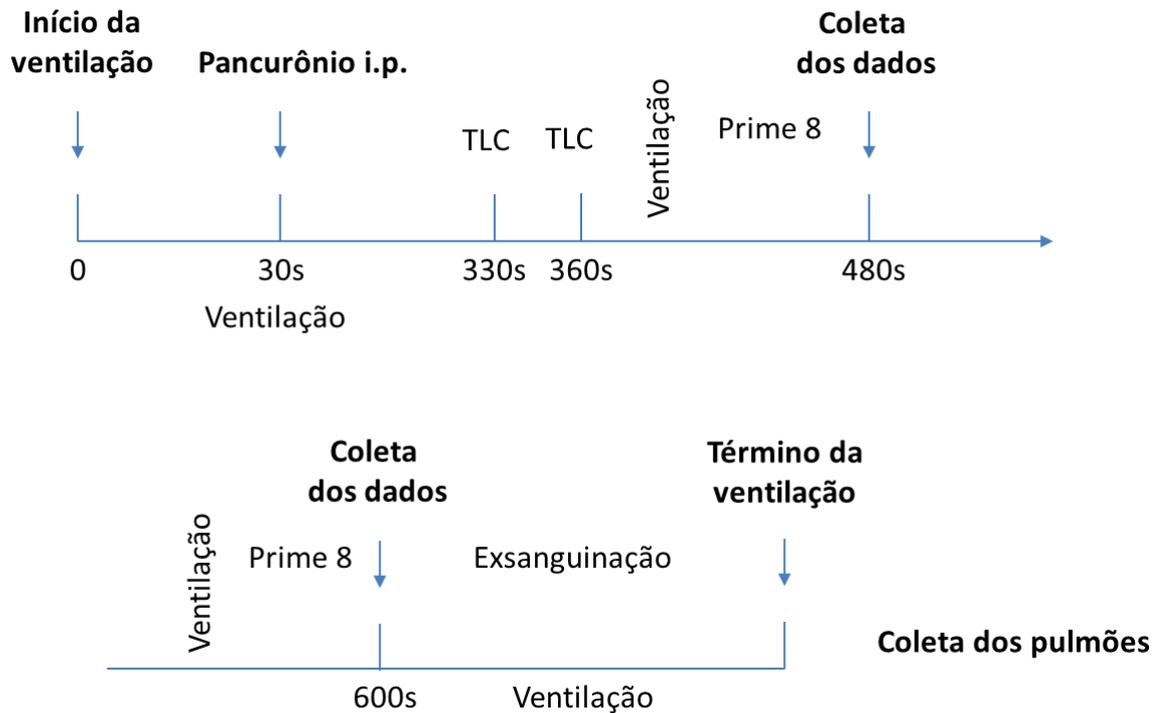


Figura 9 - Esquema temporal do protocolo de medidas de mecânicas respiratória. TLC: complacência pulmonar total; Prime-8: manobras de recrutamento; s: segundos.

Fonte: Da autora.

4.7 REMOÇÃO DOS PULMÕES

Imediatamente após a avaliação da mecânica respiratória, mas antes de interromper a ventilação, o abdome do animal foi aberto cirurgicamente para a administração de heparina (1000 UI) na veia cava. Após cerca de 1 minuto, a veia cava e artéria aorta abdominal foram seccionadas no intuito de permitir hemorragia maciça para levar o animal à morte. Em seguida, a traquéia foi clampeada no final da expiração mecânica com fio de algodão. Os pulmões foram removidos em bloco a partir da dissecação das estruturas do pescoço, mantendo a traquéia

ocluída e removendo o coração e pulmão das demais estruturas aderidas à parede do tórax posterior. Com as estruturas exteriorizadas, foi separado o esôfago da traquéia e o coração dos pulmões. Os pulmões foram ocluídos pelas vias aéreas de maior calibre com fio de algodão para manter a capacidade residual final e foram destinados à análise histológica.

4.8 HISTOLOGIA PULMONAR

4.8.1 Procedimento histológico no preparo das lâminas

Os pulmões foram fixados e mantidos em paraformaldeído 10 % (pH 7,4 e 0,1M) por 7 dias. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através da imersão em solução com concentração crescente de etanol. Depois da desidratação, o material foi incluído em parafina. Foram feitos cortes de 4 μ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H.E.).

4.8.2 Análise morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares corados com hematoxilina e eosina foram analisadas por microscopia óptica (Eclipse 80i Nikon Corporation, Japão) de acordo com seus aspectos quantitativos. A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (WEIBEL, 1990).

Em um aumento de 200x, utilizando-se uma ocular contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio de luz convencional (Eclipse 80i Nikon Corporation, Japão) (FIGURA 10), foram analisados, em leitura cega (o pesquisador não sabia de que grupo se tratava a lâmina a ser analisada), 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina e quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais e colapsados. Foram somadas as áreas de alvéolos normais e de alvéolos colapsados separadamente. Essa soma foi dividida pela área total de cada parâmetro avaliado e o número de cada área foi multiplicado por 100, obtendo a porcentagem de áreas de alvéolos

normais e colapsados. O mesmo foi feito para as células inflamatórias. As frações de neutrófilos e de células mononucleares (MN) no tecido pulmonar foram avaliadas no aumento de 1000 x. Os pontos que insidiam nas células foram contados, divididos pela celularidade total (neut + MN), divididos pelo número de tecido total e multiplicado por 100, obtendo assim a porcentagem de neutrófilos e MN.

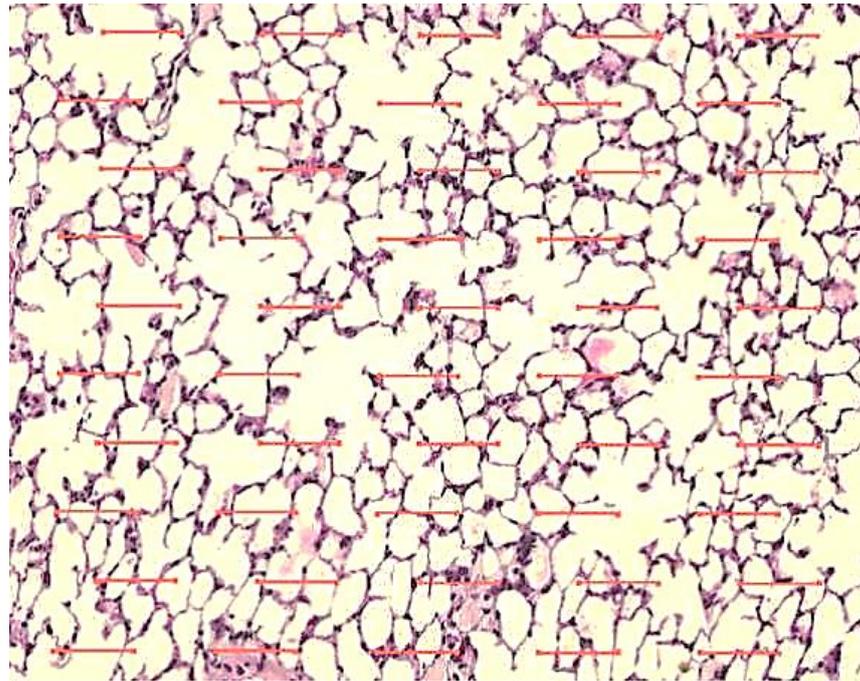


Figura 10 - Imagem do retículo com 100 pontos e 50 linhas acoplado a uma das oculares do microscópio para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Fonte: Da autora.

4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO PULMÃO

4.9.1 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Para análise bioquímica do processo inflamatório nos pulmões, foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase. Antes da realização do ensaio, retirou-se um fragmento dos pulmões pesando entre 310 e 360 mg de cada amostra armazenada a -80°C . Os fragmentos foram triturados um a um com lâmina de bisturi, em placa de Petri sobre gelo com

a adição de solução tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0). A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 30 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso com tampão fosfato de potássio contendo 5 % de brometo de hexadeciltrimetil amônio (Sigma, St Louis, EUA). A suspensão sofreu 3 ciclos de congelamento (congelado em gelo seco e descongelado em temperatura ambiente). No último descongelamento, a suspensão foi sonificada (amplitude de 20-30%) por 40 s em gelo. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4°C, e os sobrenadantes utilizados para o ensaio de MPO, em duplicatas. Foi utilizado um kit de ensaios Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen, EUA) para determinar a atividade de MPO dos homogenatos, conforme instruções do fabricante. A absorbância de cada amostra foi medida utilizando um leitor de microplaca equipado para excitação de 560 nm (Synergy H1, hybrid reader, Biotek, EUA). Para o cálculo da atividade da MPO a média das absorbâncias das duplicatas foram subtraídas do branco, corrigidas pelo R da curva, multiplicadas pelo fator de diluição e divididas pelo peso do fragmento do pulmão. Os resultados foram expressos em $\text{mU}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.9.2 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para analisar o estresse oxidativo pulmonar, foi determinado os níveis de H_2O_2 no tecido pulmonar. As amostras dos pulmões pesando entre 190 e 230 mg foram triturados um a um com lamina de bisturi, em placa de Petri sobre gelo com a adição de 140 mM/l de NaCl, 10 mM/l de tampão fosfato de potássio e 5 mM/l de dextrose (pH 7,0). O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante usado para o ensaio de H_2O_2 . Foi utilizado um kit de ensaios Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen, EUA) para determinar a medida de H_2O_2 dos homogenatos, conforme instruções do fabricante. A absorbância de cada amostra foi medida utilizando um leitor de microplaca equipado para excitação de 560 nm (Synergy H1, hybrid reader, Biotek, EUA). Para o cálculo da medida de H_2O_2 a média das absorbâncias das duplicatas foram subtraídas do branco, corrigidas pelo R da curva, multiplicadas pelo fator de diluição e divididas pelo peso do fragmento do pulmão. Os resultados foram expressos em μM de $\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}$.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise estatística foi realizada através da utilização de um software comercial (GraphPad Prism version 5.0, San Diego, CA, EUA), exceto para a análise do risco de morte. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM), e a significância estatística foi assegurada por métodos paramétricos utilizando análise de variância de uma via (one-way) seguida de teste Tukey (ANOVA).

Para a análise do risco de morte foi realizado o teste de modelo de regressão logística (binomial), função *glm* do software (Statistical Computing System R 3.0.2).

Para cada análise, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos após a realização do protocolo experimental proposto por esse trabalho são descritos abaixo.

5.1 PORCENTAGEM DE MORTALIDADE E RISCO DE MORTE

Em 6 horas após a instalação da sepse não houve morte em nenhum dos animais estudados. Depois de 24 horas da cirurgia, a porcentagem de mortalidade variou de acordo com a droga previamente administrada (FIGURA 11), sendo de 0 % nos grupos Naïve e Sham, 13 % no CLP dex, 38 % no CLP sal e 75 % no CLP met. O grupo CLP met teve nove vezes maior risco de morte quando comparado ao Naïve e ao Sham. O risco de morte do grupo CLP dex é o mesmo que dos grupos Naïve e Sham.

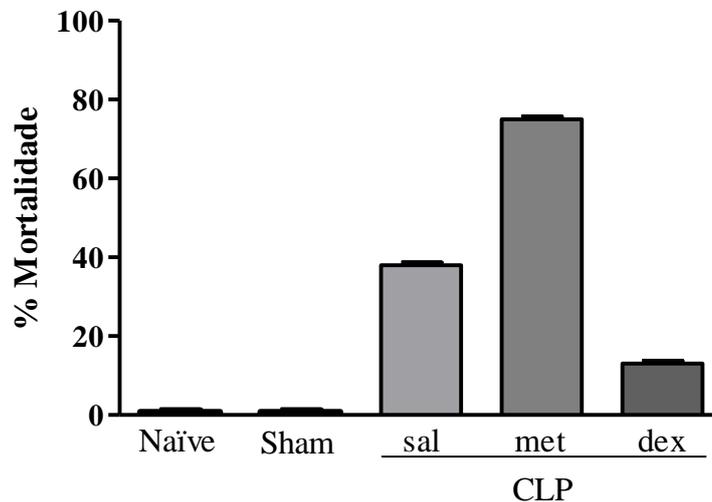


Figura 11 – Representação gráfica da porcentagem de mortalidade, após 24 horas da cirurgia, nos grupos estudados. $N = 8$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CCT

Os resultados dos níveis de CCT, em 6 e 24 horas, estão mostrados na Figura 12 A e B, respectivamente. O grupo CLP sal apresentou aumento significativo, em quase 2,5 vezes, nos níveis plasmáticos de CCT em 6 ($F_{4,30} = 9,84$) e 24 horas ($F_{4,28} = 6,06$), em comparação aos grupos Naïve ($P < 0,001$) e Sham ($P < 0,01$). Os grupos CLP met e CLP dex apresentaram níveis plasmáticos de CCT significativamente menores que o CLP sal ($P < 0,05$; $P < 0,001$, respectivamente) em 6 horas. Depois de 24 horas, os níveis de CCT exibiram o mesmo perfil, exceto no grupo CLP met, o qual mostrou valores similares aos grupos Naïve e Sham.

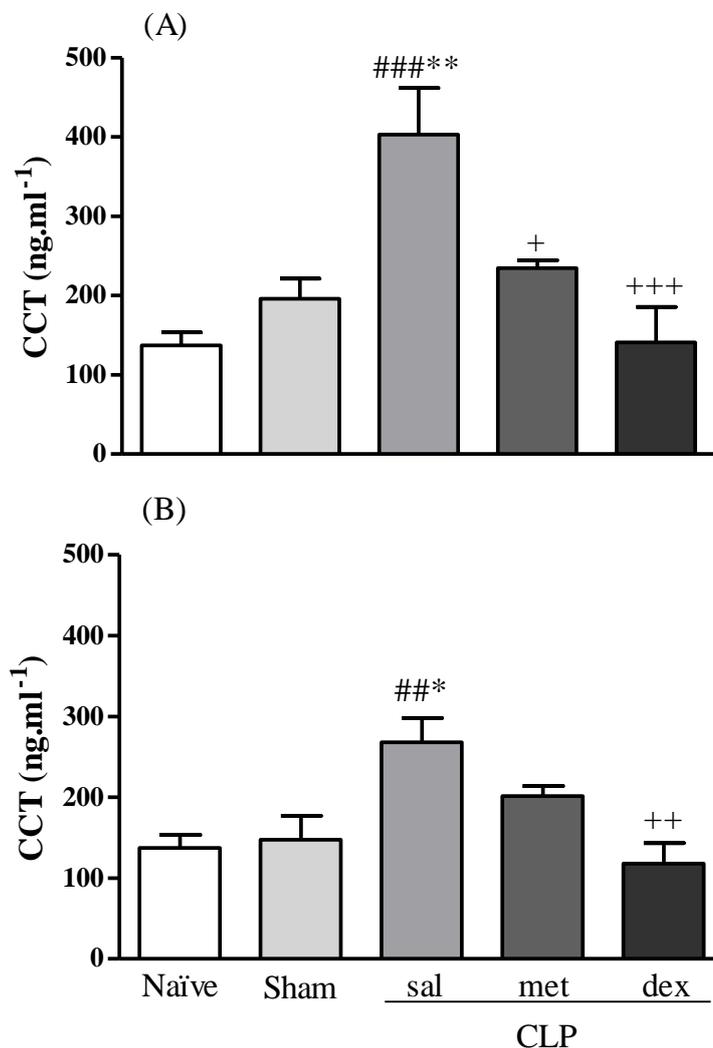


Figura 12 – Representação gráfica dos níveis plasmáticos de corticosterona (CCT) em $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os valores são expressos em média \pm SEM. (A) em 6 e (B) 24 horas após a cirurgia. ### $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham; + $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$ e +++ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP sal. $N = 8$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.3 ÁREA IMUNORREATIVA PARA O GR

A imunorreatividade para o receptor de GC no tecido pulmonar não foi avaliada nos grupos após 6 horas de cirurgia. O resultado da área imunorreativa para os receptores de GC, em 24 horas, pode ser observada nas Figuras 13 e 14. O grupo CLP met apresentou estatisticamente menor área imunorreativa para o GR total ($F_{(4,17)} = 6,43$) e citoplasmático ($F_{(4,17)} = 6,91$) em comparação a todos os outros grupos ($P < 0,05$; $P < 0,01$ para Sham). Em contra partida, o mesmo grupo apresentou significativo aumento na área imunorreativa para o GR nuclear ($F_{(4,15)} = 20,55$), também em comparação a todos os outros grupos ($P < 0,001$; $P < 0,01$ para CLP dex). O grupo CLP dex apresentou aumento significativo de imunorreatividade dos GR nuclear em comparação ao grupo Sham ($P < 0,05$).

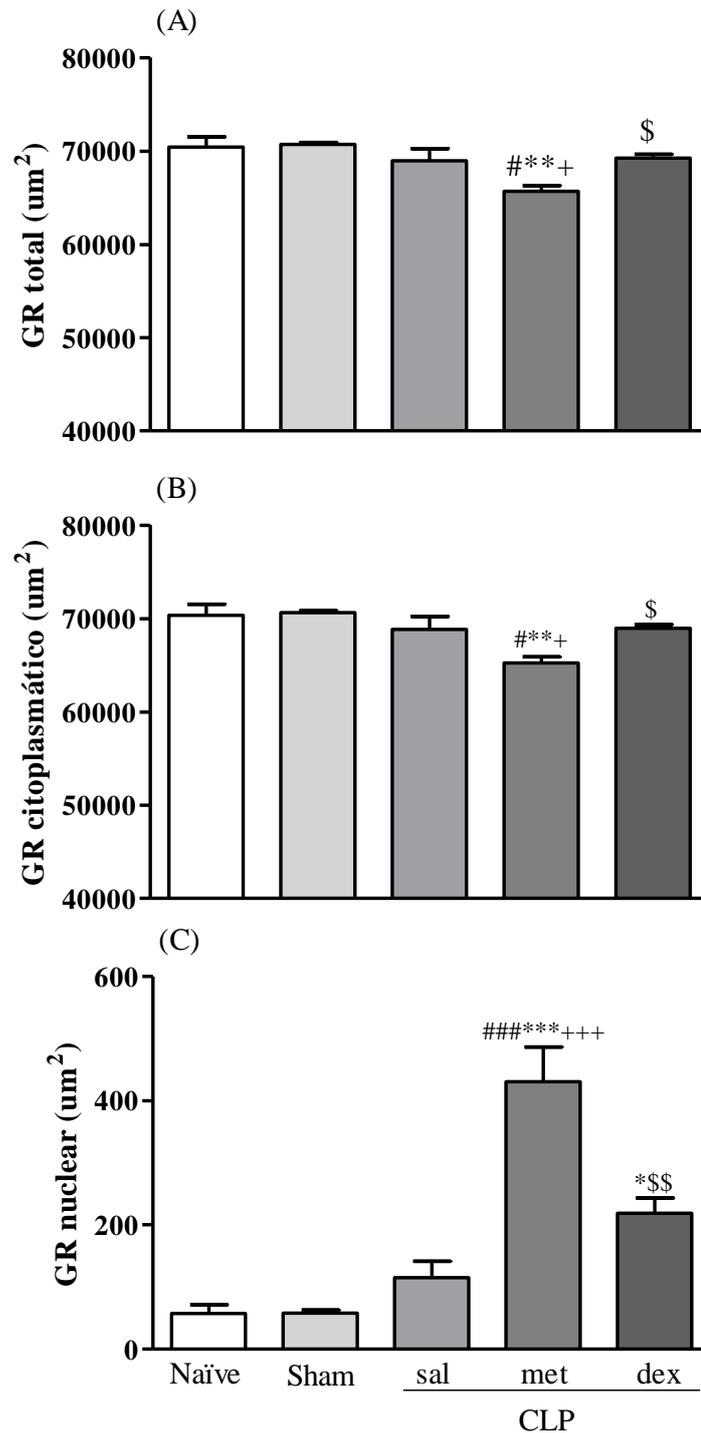


Figura 13 – Representação gráfica da área imunorreativa de (A) GR total, (B) citoplasmático e (C) nuclear por μm^2 no tecido pulmonar. Os valores são expressos em média \pm SEM. 24 horas após a cirurgia. [#] $P < 0,05$ e ^{###} $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; ^{*} $P < 0,05$; ^{**} $P < 0,01$ e ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham; ⁺ $P < 0,05$ e ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP sal e ^{\$} $P < 0,05$ e ^{\$\$\$} $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP met. $N = 5$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

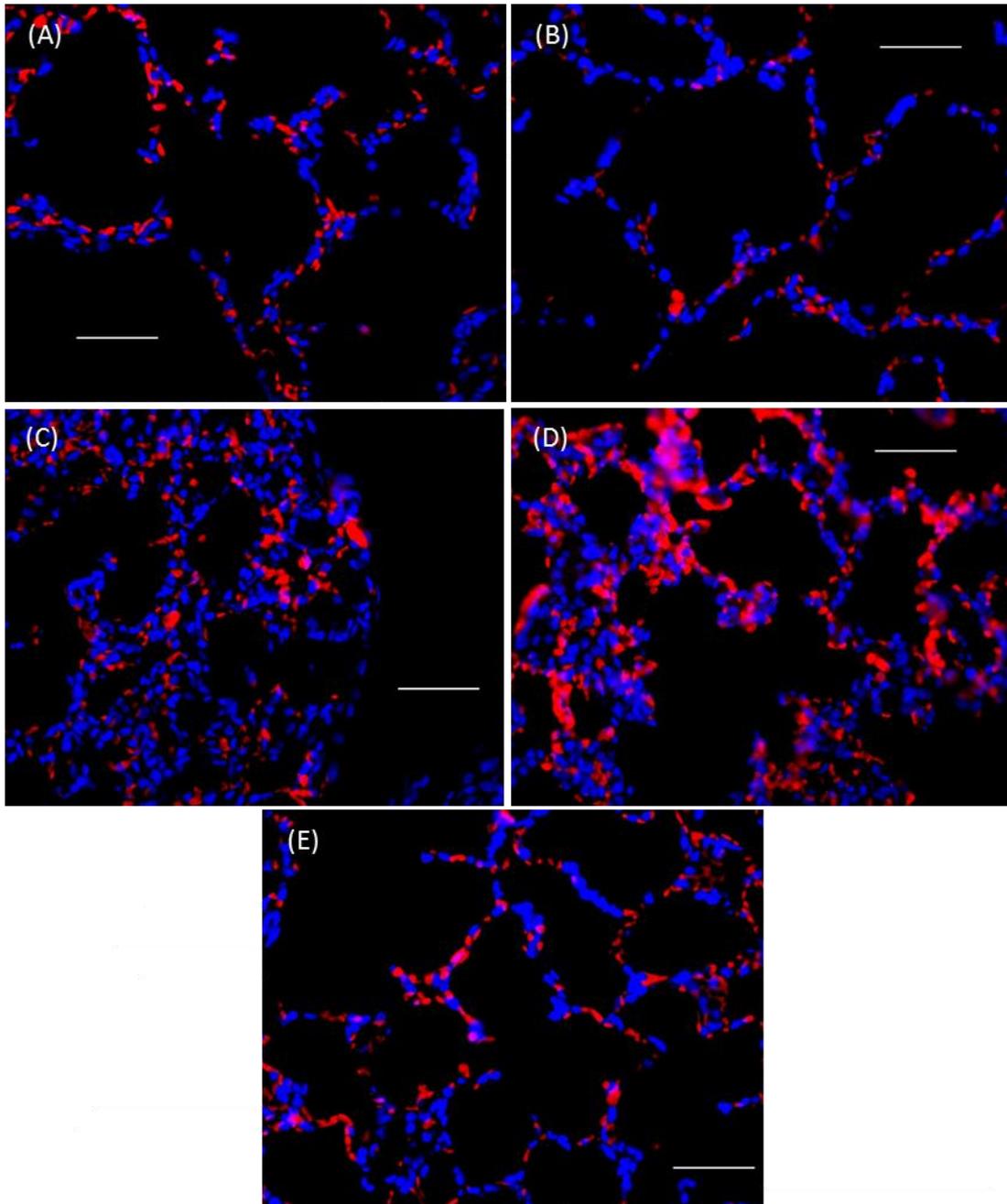


Figura 14 – Fotomicrografia imunofluorescente da área de imunorreatividade para GR em pulmões dos grupos estudados, 24 horas após indução da sepse. Imunorreatividade total (1:1000, em vermelho), citoplasmática e nuclear do GR; Contra-coloração nuclear com DAPI (1:12500, em azul), Grupos (A) Naïve, (B) Sham, (C) CLP sal, (D) CLP met e (E) CLP dex. Escala: 50 μ m. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.4 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os resultados da mecânica respiratória em 6 horas, assim como de R_{aw} e de $Htis$ em 24 horas, não foram significativamente diferentes do Naïve ou do Sham (TABELA 1). Os valores de $Gtis$ ($F_{4,27} = 15,69$) e η ($F_{4,27} = 4,93$), em 24 horas são mostrados também na Figura 15 A e B, respectivamente. Os grupos CLP sal e CLP met mostraram aumento significativo em $Gtis$ quando comparados ao Naïve ($P < 0,001$) e ao CLP dex ($P < 0,01$; $P < 0,001$, respectivamente). Os valores de $Gtis$ do grupo CLP met foi significativamente diferente do Sham ($P < 0,01$). Os valores de η do CLP sal e do CLP met foram significativamente diferentes do Sham ($P < 0,05$).

Tabela 1 - Parâmetros obtidos através da avaliação da mecânica respiratória. Resistência das vias aéreas (R_{aw}), viscosidade tecidual ($Gtis$), elastância do tecido ($Htis$) e histeresividade (η). Valores de média \pm SEM. 6 e 24 horas após a cirurgia. # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham; ++ $P < 0,01$ comparado ao grupo CLP sal; \$\$\$ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP met. $N = 8$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

	Raw ($\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{s}$)	Gtis ($\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Htis ($\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{ml}^{-1}$)	η ($\eta = G\cdot H^{-1}$)
6 horas				
Naïve	0,043 \pm 0,003	0,620 \pm 0,020	3,404 \pm 0,163	0,173 \pm 0,009
Sham	0,047 \pm 0,004	0,629 \pm 0,024	3,342 \pm 0,192	0,192 \pm 0,005
CLP sal	0,040 \pm 0,003	0,545 \pm 0,031	2,819 \pm 0,253	0,178 \pm 0,007
CLP met	0,038 \pm 0,001	0,589 \pm 0,025	3,169 \pm 0,099	0,186 \pm 0,006
CLP dex	0,040 \pm 0,001	0,607 \pm 0,023	3,146 \pm 0,127	0,193 \pm 0,005
24 horas				
Naïve	0,043 \pm 0,003	0,620 \pm 0,020	3,404 \pm 0,163	0,173 \pm 0,009
Sham	0,043 \pm 0,005	0,705 \pm 0,017	3,502 \pm 0,080	0,170 \pm 0,011
CLP sal	0,048 \pm 0,006	0,799 \pm 0,015###	2,736 \pm 0,068	0,217 \pm 0,008**
CLP met	0,035 \pm 0,002	0,847 \pm 0,033####	3,233 \pm 0,146	0,214 \pm 0,010*
CLP dex	0,047 \pm 0,006	0,656 \pm 0,020++\$\$\$	3,666 \pm 0,127	0,212 \pm 0,010

Fonte: Da autora.

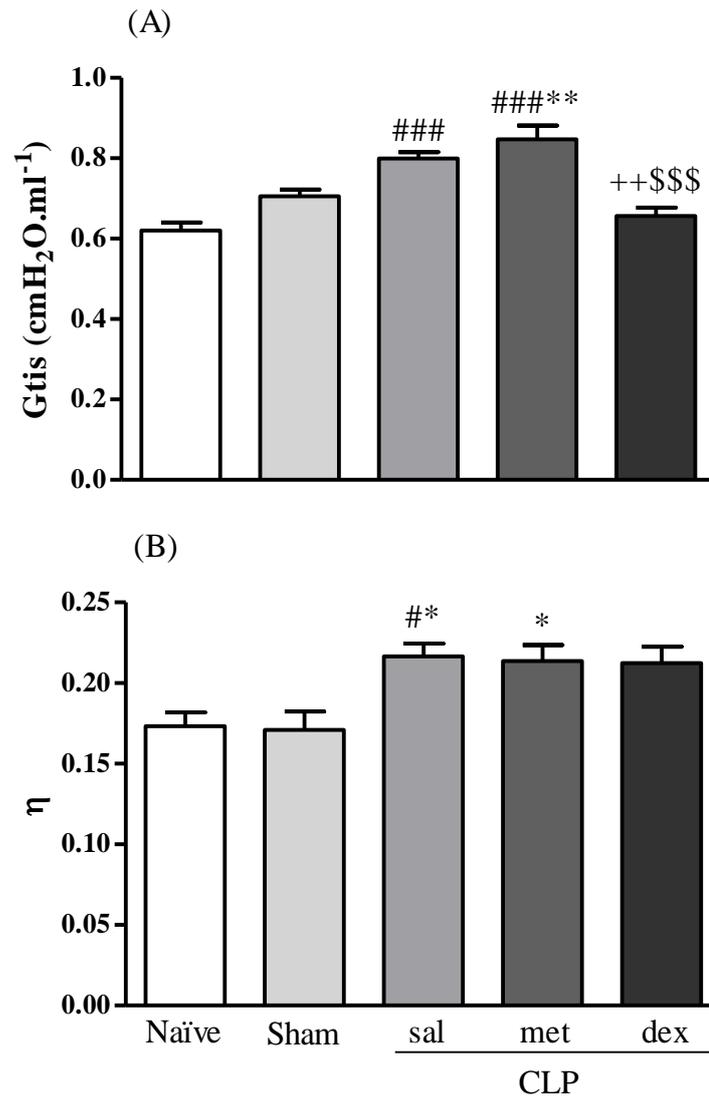


Figura 15 – Representação gráfica da (A) viscosidade tecidual (Gtis) e (B) histeresividade (η). Valores expressos em média \pm SEM. 24 horas depois da cirurgia. $^*P < 0,05$ e $^{###}P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; $^*P < 0,05$ e $^{**}P < 0,01$ comparado ao grupo Sham; $^{++}P < 0,01$ comparado ao grupo CLP sal e $^{$$$}P < 0,001$ comparado ao grupo CLP met. $N = 5-7$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.5 FRAÇÃO DE ÁREA ALVEOLAR NORMAL E COLAPSADA

As frações das áreas alveolares normais e colapsadas em 6 e 24 horas após a cirurgia, assim como as fotomicrografias do parênquima pulmonar, em 24 horas, estão mostradas na

Tabela 2 e Figura 16, respectivamente. Após 6 horas da indução da sepse, houve uma pequena, porém significativa redução nas frações de alvéolos normais ($F_{4,24} = 5,54$) nos grupos CLP sal, comparado ao Naïve ($P < 0,05$) e CLP met comparado ao Naïve ($P < 0,01$). Quanto a área de alvéolos colapsados não houve diferença estatística entre os grupos. Em 24 horas, os grupos CLP sal e CLP met foram caracterizados por uma significativa redução nas frações das áreas de alvéolos normais ($F_{4,24} = 159,1$) e aumento de área de alvéolos colapsados ($F_{4,24} = 166,1$), comparados ao Naïve ($P < 0,001$) e ao Sham ($P < 0,001$). O grupo CLP dex mostrou aumento da área de alvéolos normais e diminuição da área de alvéolos colapsados, comparados ao CLP sal ($P < 0,01$) e CLP met ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Fração de área alveolar normal e colapsada. Todos os valores foram avaliados em 10 campos randomizados e não coincidentes por rato. Valores expressos em média \pm SEM. 6 e 24 horas após a cirurgia. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham; ++ $P < 0,01$ comparado ao grupo CLP sal; $^{\$}P < 0,05$ e $^{\$\$}P < 0,01$ comparado ao grupo CLP met. $N = 5$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Grupos	6 horas		24 horas	
	Área alveolar normal (%)	Área alveolar colapsada (%)	Área alveolar normal (%)	Área alveolar colapsada (%)
Naïve	95,40 \pm 0,52	4,61 \pm 0,52	95,40 \pm 0,52	4,61 \pm 0,52
Sham	92,91 \pm 0,95	6,92 \pm 0,99	93,57 \pm 0,72	5,10 \pm 0,50
CLP sal	90,80 \pm 0,90 [#]	6,82 \pm 0,70	68,69 \pm 4,00 ^{#####}	28,97 \pm 3,77 ^{#####}
CLP met	89,97 \pm 1,39 ^{##}	5,62 \pm 1,49	73,47 \pm 1,97 ^{#####}	24,48 \pm 1,37 ^{#####}
CLP dex	91,93 \pm 0,77	6,99 \pm 1,49	86,25 \pm 4,30 ^{++$^{\\$}$}	12,68 \pm 4,11 ^{++$^{\\$}$}

Fonte: Da autora.

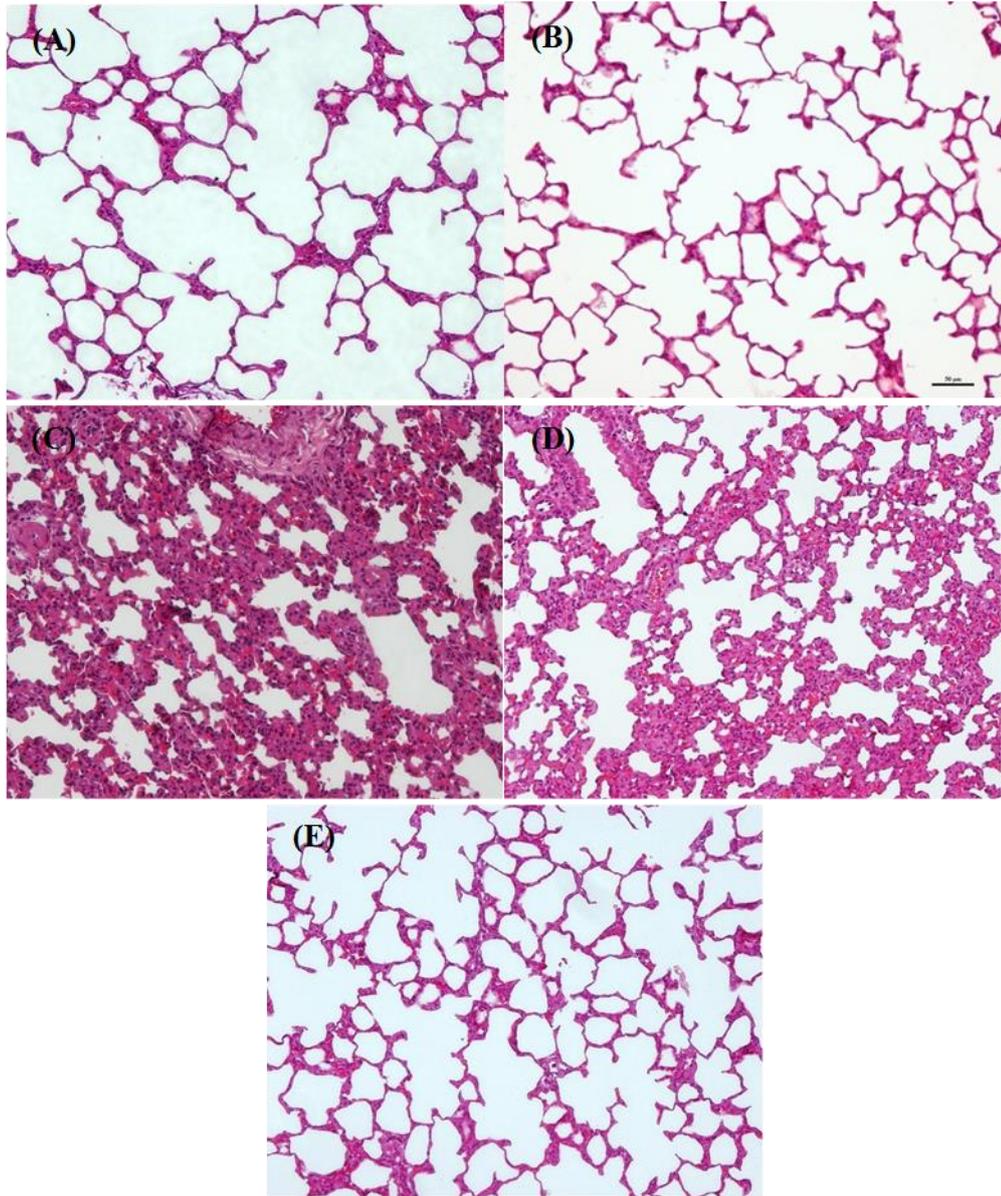


Figura 16 - Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina, 24 horas após a cirurgia. Magnificação original: 200x. (A e B), Grupos Naïve e Sham, respectivamente, mostrando parênquima normal. (C e D), Grupos CLP sal e CLP met, respectivamente, mostrando características de dano alveolar difuso e inflamação aguda, representada por congestão, acúmulo neutrofílico e espessamento da parede alveolar. (E), Grupo CLP dex, mostrando prevenção do dano alveolar difuso. $N = 5$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.6 PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO PULMONAR

A porcentagem de células neutrofílicas (Neut) e mononucleares (MN) no tecido pulmonar, em 6 e 24 horas após a cirurgia estão mostradas na Tabela 3. O grupo CLP sal mostrou aumento da porcentagem de MN ($F_{(4,20)} = 12,37$) em 6 horas, comparado ao Naïve ($P < 0,001$) e ao Sham ($P < 0,001$), e de Neut ($F_{4,20} = 11,88$) e MN ($F_{4,20} = 13,71$) em 24 horas, comparado ao Naïve ($P < 0,01$; $P < 0,001$, respectivamente) e ao Sham ($P < 0,001$). O grupo CLP met mostrou aumento da porcentagem de Neut e MN em 24 horas comparados ao Naïve ($P < 0,05$; $P < 0,001$, respectivamente) e Sham ($P < 0,01$; $P < 0,001$, respectivamente). O CLP dex mostrou significativa diminuição das frações de Neut e MN quando comparados ao CLP sal ($P < 0,01$) e CLP met ($P < 0,01$; $P < 0,05$, respectivamente).

Tabela 3- Porcentagem de neutrófilos (Neut) e de células mononucleares (MN) no tecido pulmonar. Todos os valores foram avaliados em 10 campos randomizados e não coincidentes por rato. Valores expressos em média \pm SEM. 6 e 24 horas após a cirurgia. $^{\#}P < 0,05$, $^{\#\#}P < 0,01$ e $^{\#\#\#}P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; $^{**}P < 0,01$ e $^{***}P < 0,001$ comparado ao grupo Sham; $^{++}P < 0,01$ e $^{+++}P < 0,001$ comparado ao grupo CLP sal; $^{\$}P < 0,05$ e $^{\$\$}P < 0,01$ comparado ao grupo CLP met. $N = 5$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Grupos	6 horas		24 horas	
	Neut (%)	MN (%)	Neut (%)	MN (%)
Naïve	1,63 \pm 0,21	0,73 \pm 0,08	1,63 \pm 0,21	0,73 \pm 0,08
Sham	1,54 \pm 0,25	0,92 \pm 0,18	1,12 \pm 0,15	0,77 \pm 0,19
CLP sal	1,73 \pm 0,20	2,15 \pm 0,27 $^{\#\#\#\#}$	4,81 \pm 0,99 $^{\#\#\#\#}$	2,40 \pm 0,27 $^{\#\#\#\#}$
CLP met	2,24 \pm 0,30	0,63 \pm 0,05 $^{+++}$	4,23 \pm 0,26 **	2,63 \pm 0,35 $^{\#\#\#\#}$
CLP dex	0,72 \pm 0,24 $^{\$\$}$	0,77 \pm 0,22 $^{+++}$	1,28 \pm 0,42 $^{+\$\$}$	1,39 \pm 0,23 $^{\$}$

Fonte: Da autora.

5.7 ATIVIDADE DA MPO NO TECIDO PULMONAR

A atividade de MPO, um marcador de inflamação, em 6 e 24 horas é mostrada na Figura 17 A e B, respectivamente. A atividade de MPO, em 6 horas após a cirurgia, não apresentou diferença estatística entre os grupos. No entanto, em 24 horas, a atividade ($F_{4,27} = 15,50$) aumentou significativamente nos grupos CLP sal e CLP met, em comparação ao Naïve ($P < 0,001$) e Sham ($P < 0,001$). Já o grupo CLP dex mostrou valores de MPO similar aos grupos Naïve e Sham, mas demonstrou redução da atividade em comparação aos grupos CLP sal ($P < 0,001$) e CLP met ($P < 0,01$).

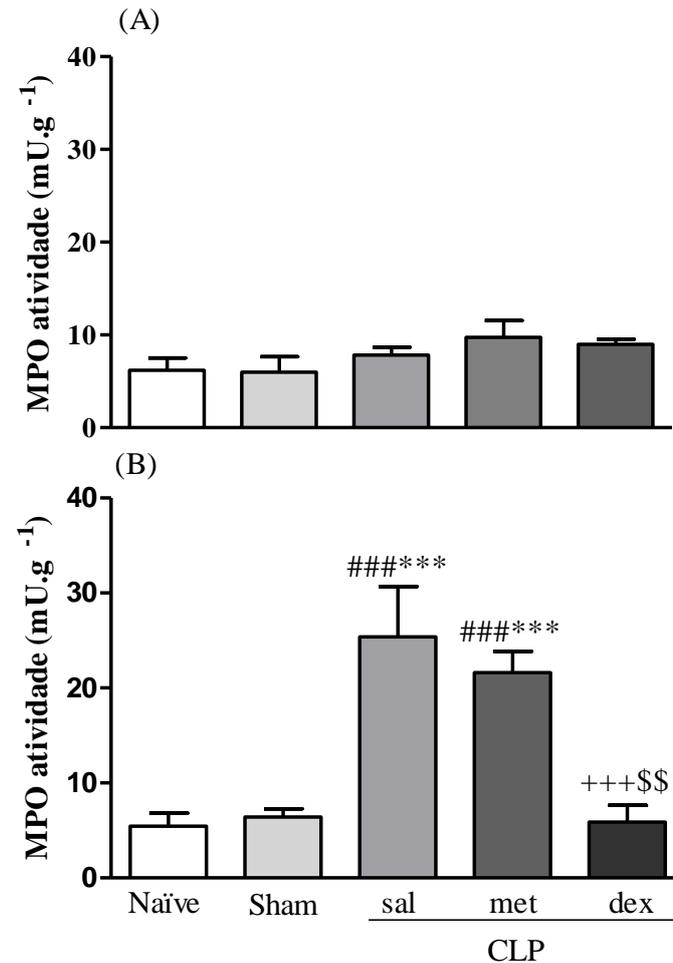


Figura 17 – Representação gráfica da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar. Os valores são expressos em média \pm SEM. (A) 6 e (B) 24 horas após a cirurgia. ^{###} $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham; ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP sal e ^{\$\$} $P < 0,01$ comparado ao grupo CLP met. $N = 8$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

5.8 NÍVEIS DE H₂O₂ NO TECIDO PULMONAR

Os níveis de H₂O₂, um indicador de estresse oxidativo, em 6 e 24 horas são mostrados na Figura 18 A e B, respectivamente. Em 6 horas após a cirurgia não houve diferença estatística entre os grupos. Em 24 horas, os níveis de H₂O₂ ($F_{4,27} = 55,42$) foram elevados no CLP sal e CLP met, comparado ao Naïve ($P < 0,01$; $P < 0,001$, respectivamente) e ao Sham ($P < 0,001$). O grupo CLP met apresentou valores de H₂O₂ maiores significativamente que todos os outros

grupos ($P < 0,001$). Os valores de H_2O_2 do CLP dex foram similares ao Naïve e ao Sham, evidenciando uma redução significativa dos níveis quando comparação ao CLP sal ($P < 0,05$) e CLP met ($P < 0,001$).

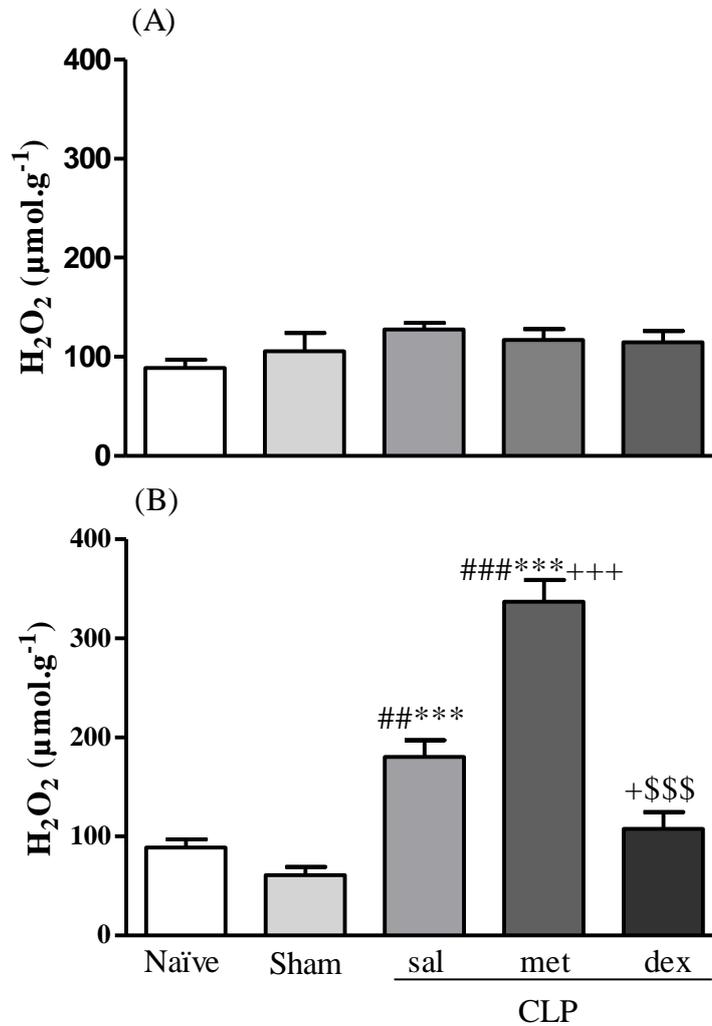


Figura 18 - Representação gráfica dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tecido pulmonar. Os valores são expressos em média \pm SEM. (A) 6 e (B) 24 horas após a cirurgia. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo Naïve; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham; + $P < 0,05$ e +++ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP sal e \$\$\$ $P < 0,001$ comparado ao grupo CLP met. $N = 8$. Naïve: controle; Sham: controle cirúrgico; CLP: perfuração e ligadura cecal; sal: salina; met: metirapona; dex: dexametasona.

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os parâmetros avaliados nos animais em 6 horas após a indução da sepse não demonstraram características patofisiológicas da LPA. O aumento nos níveis de CCT observado no grupo CLP sal, neste período, foi uma resposta decorrente da instalação da sepse. Após 24 horas, observamos no grupo CLP sal aumento da inflamação pulmonar e maior área de colapso alveolar, acompanhado de disfunção da mecânica respiratória, refletindo a LPA, quando comparados ao Naïve e ao Sham. Esses dados também foram observados no grupo CLP met. Todavia, a dose prévia do inibidor de GC (met) reduziu os níveis de CCT e aumentou drasticamente o estresse oxidativo pulmonar. Quando observamos os ratos submetidos à sepse que receberam única dose prévia de agonista de GC (dex), em 24 horas, observou-se redução nos níveis de CCT e houve um efeito benéfico de proteção pulmonar, da inflamação e do estresse oxidativo pulmonar. Além disso, houve prevenção do colapso alveolar e melhora nos parâmetros de mecânica respiratória, comparado ao CLP sal.

Há muitas controvérsias a respeito da proteção pulmonar mediada pelos níveis de GC endógenos na LPA, uma vez que os GC endógenos não são sempre efetivos em suprimir a inflamação sistêmica, devido ao grau de cortisolemia ser frequentemente correlacionado com a severidade da síndrome e a taxa de mortalidade (MEDURI et al., 2005; LIU et al., 1993; ANNANE et al., 2000; MESOTEN; VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2008; THOMPSON, 2010). No presente estudo, os ratos do grupo CLP sal, comparado aos grupos Naïve e ao Sham, em 6 e 24 horas, mostraram exacerbada atividade da adrenal pelo aumento dos níveis de CCT, estando associado ao aumento da inflamação pulmonar em 24 horas após a instalação da sepse. Durante a inflamação sistêmica o TNF- α e IL-1 β estimula o eixo HHA para limitar a resposta inflamatória. A ativação do eixo HHA é um importante componente da resposta anti-inflamatória compensatória na doença crítica, uma vez que os GC exercem seus efeitos por se ligarem a GR e modularem negativamente a taxa de transcrição do NF- κ B que, e consequentemente diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (NEWTON, 2000). Contudo, altos níveis de cortisol são geralmente vistos em pacientes que não sobrevivem à doença (SANDBERG et al., 1956). O cortisol secretado rapidamente penetra às células e exerce seus efeitos anti-inflamatórios por ativar GR α (MEDURI et al., 2005). Nosso estudo porém demonstrou que não houve alteração significativa na imunorreatividade total do GR no tecido pulmonar dos ratos CLP sal, em 24 horas, considerando-se tanto as frações citoplasmática como nuclear do receptor, em relação aos grupos Naïve e Sham. Contudo, o trabalho de Liu e

colaboradores (1993), em modelo de LPA induzida por LPS em ovelhas, mostrou que a afinidade máxima de ligação ao GR se relacionou de maneira inversa aos níveis circulantes de cortisol e à atividade da PLA2, os quais se encontram aumentados até 6 horas após a administração de LPS. Desta forma, esses achados indicam que a redução das ações do cortisol causada pela diminuição da capacidade de sua ligação ao GR pode acelerar a resposta patológica na LPA. Embora não tenhamos avaliado a dinâmica de ligação do GR pulmonar em nosso estudo, não podemos excluir a possibilidade de que tenha ocorrido uma diminuição da sensibilidade do GR à CCT sem que houvesse mudanças detectáveis na imunorreatividade total ao receptor. A diminuição da sensibilidade ou o mecanismo de resistência do GR aos GC advém de diversos fatores moduladores, tais como a concentração do hormônio livre, a potência relativa do hormônio, a habilidade da célula em receber e traduzir o sinal hormonal e a densidade intracelular de GR, que é um dos principais determinantes da responsividade aos GC. Os principais moduladores são os próprios GC, que promovem uma redução na concentração de GR, conhecido como processo de *down-regulation* homólogo (DONG et al., 1988). Este processo diminui a sensibilidade, oferecendo proteção parcial aos efeitos excessivos dos GC (BELLINGHAM; SAR; CIDLOWSKI, 1992). Além disso, o estudo *in vitro* de Almawi et al. (1991) mostrou que as citocinas podem induzir, em dose dependente, resistência aos GC por reduzir tanto a afinidade de ligação ao GR α quanto de elementos responsivos aos GC. Na sepse e na SDRA, o efeito do cortisol no tecido alvo pode ser quebrado, pelo menos em parte, como resultado da diminuição da atividade mediada pelo GR, levando a não inibição do NF- κ B nas células imunes, ocorrendo uma disfunção da regulação da inflamação sistêmica (MEDURI et al., 2005). Em nosso trabalho, a falha dos altos níveis de CCT em suprimir a inflamação no CLP sal também é demonstrada pelo aumento da porcentagem de células inflamatórias, da atividade de MPO e do estresse oxidativo no tecido pulmonar, com consequente aumento da área de colapso alveolar e disfunção da mecânica respiratória, comparados aos Sham e Naïve. Como a resistência aos GC é mais frequente em pacientes com inflamação sustentada, não fica claro em nosso estudo se o GR está insensível ao CCT endógeno ou se a capacidade anti-inflamatória dos GC endógenos é de baixa potência para uma exacerbada inflamação e estresse oxidativo pulmonar na SDRA induzida por CLP.

Em contrapartida aos mecanismos discutidos acima, a deficiência no eixo HHA pode também permitir um desequilíbrio ou uma contínua inflamação, além da instabilidade cardiovascular, da perda da integridade vascular e a possibilidade de inflamação persistente das vias aéreas, levando a uma exuberante resposta fibroproliferativa nos pulmões injuriados (MACLAREN; JUNG, 2002). Assim, a reduzida produção de cortisol e a entrega reduzida do

cortisol aos tecidos, além da resistência tecidual ao cortisol podem todos permitir uma desbalanceada inflamação sistêmica. Na SDRA a contínua inflamação é manifestada por persistência de neutrófilos e citocinas no espaço aéreo em associação com pobre prognóstico (STEINBERG et al., 1998). No presente estudo, os animais dos grupos CLP met e CLP dex tiveram níveis basais de CCT em 6 e 24 horas, mostrando que as doses utilizadas de met e dex foram eficientes em bloquear a síntese e o eixo HHA, respectivamente naqueles animais. Mas, neste âmbito, a met aumentou significativamente a mortalidade dos animais, comparado ao Naive, com risco de morte nove vezes maior e exacerbou a inflamação pulmonar. A prévia administração de met, por sua vez, aumentou a imunorreatividade nuclear do GR, fatos associados a uma não prevenção do processo inflamatório tecidual. Por analogia ao mecanismo proposto por Liu e colaboradores (1993), podemos especular que os níveis baixos de CCT circulante nos animais tratados com met podem ter favorecido um aumento da sensibilidade ao GR e, conseqüentemente, um aumento de sua translocação para o núcleo. De fato, foi demonstrado que a administração de met conjuntamente com mifepristona, em um modelo de trauma, aumenta a imunorreatividade nuclear do GR após 24 horas em neurônios, sem melhoria nos parâmetros funcionais estudados (TAHERA et al., 2006). Além disso, foi descrito que as citocinas liberadas durante estados inflamatórios são capazes de aumentar a expressão de GR β (LEUNG et al., 1997). Assim, acreditamos que os baixos níveis circulantes de CCT e a conseqüente redução da oferta de CCT aos tecidos, nos animais tratados com met, possam ter inibido a ação anti-inflamatória do GC endógeno na LPA, e ainda podem ter favorecido a piora do prognóstico e o aumento do risco de morte. Também não descartamos a possibilidade de ativação de GR β no tecido pulmonar desses animais. O mecanismo dominante negativo do GR β é induzido pela formação de heterodímeros GR α /GR β , incapazes de se ligarem aos co-ativadores, ao mesmo tempo em que reduzem a formação do homodímero GR α /GR α , causando assim uma resposta atenuada de GR α (DE CASTRO et al., 1996). Estudos que utilizaram a transfecção celular indicam a necessidade de um excesso de GR β , em concentrações cinco a dez vezes superiores ao GR α , para exercer uma completa inibição da transcrição (OAKLEY et al., 1997).

Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ser um indicador da inflamação pulmonar, uma vez que esta condição é usualmente caracterizada por extensiva infiltração de neutrófilos, e a ativação neutrofílica representa uma importante fonte de ERO (REPINE; BAST; LANKHRST, 1997). O estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese da doença pulmonar, não só por promover insultos diretos, como também por envolver mecanismos moleculares que controlam a inflamação pulmonar, como a inativação de anti-proteases, injúria

do epitélio alveolar e aumento do gene de expressão de mediadores pró-inflamatórios (SELBY et al., 1991). Por exemplo, o H₂O₂ pode induzir a ativação de NF-κβ (SCHMIDT et al., 1995). Estes processos podem resultar em diminuição das unidades funcionais pulmonares vista na SDRA e podem contribuir para a severidade da LPA (OZDULGER et al., 2003). Sendo um inibidor da enzima final da via de síntese de CCT, como já descrito, a administração previa de met diminuiu os níveis plasmáticos de CCT e também aumentou drasticamente o estresse oxidativo pulmonar, como demonstrado pelos altos níveis de H₂O₂, comparado ao CLP sal, em 24 horas após a indução da sepse (SOSENKO; LEWIS; FRANK, 1986; ROOZENDAL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). Nossos resultados mostram que a diminuição do sistema antioxidante promovido pela met pode ter sido influenciado pelos níveis basais de GC endógenos, uma vez que, no trabalho de Sosenko et al. (1986), ratos recém-nascidos que receberam met apresentam níveis basais de CCT associado ao retardo no desenvolvimento do sistema surfactante, demonstrado pela diminuição dos componentes do surfactante e do sistema antioxidante, por meio da diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase no tecido pulmonar, mostrando que o desenvolvimento desses sistemas é dependente dos níveis de GC endógenos.

Os ratos do grupo CLP met também mostraram aumento da atividade de MPO e da porcentagem de células neutrofílicas no pulmão, similar aos do CLP sal, em 24 horas após a indução da sepse. O trabalho de Cuzzocrea et al. (2001) mostra aumento da atividade de MPO pelo acúmulo neutrofílico pulmonar após injeção pleural de carragenina. Fato também associado ao aumento da peroxidação lipídica. Xiao et al. (2012) também observaram aumento da atividade de MPO nos pulmões de ratos após exposição ao CLP. A neutrofilia é a chave de desordens pulmonares como a SDRA (WEILAND et al., 1986). A MPO oriunda dos neutrófilos correlaciona-se com a inflamação pulmonar e com o grau de disfunção pulmonar (AARON et al., 2001). A MPO tem sido descrita como uma proteína com propriedades pró-inflamatórias, independentes de sua atividade enzimática (LAU et al., 2005). O trabalho de Haegens et al. (2009) sugere que a MPO, além de ter um papel importante no desenvolvimento da neutrofilia, contribui para a produção de citocinas que podem governar o processo inflamatório pulmonar.

Foi demonstrado que, em modelo de inflamação em ratos, a administração da met, na presença de inflamação, foi capaz de aumentar os níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IL-6, independente dos níveis plasmáticos de CCT, sugerindo que este efeito pode ser próprio da met e não por bloqueio dos GC endógenos (PERUZZO et al., 2010). Assim, em nosso estudo, como o processo inflamatório pulmonar no grupo CLP met foi similar ao CLP sal, com diferenças nos níveis de CCT entre os grupos, mas

levando em conta que nos dois grupos não havia uma ação adequada de GC endógenos, podemos dizer que o aumento da atividade de MPO e das células inflamatórias no pulmão podem ter sido influenciadas negativamente pela falta dos efeitos anti-inflamatórios dos GC endógenos.

Conhecimentos prévios mostram que animais com LPA apresentam mudanças na mecânica respiratória, incluindo aumento de R_{aw} . Todavia, em nosso estudo, essa mudança não foi observada nos grupos sépticos estudados, em concordância com o trabalho de Castiello e colaboradores (1994), no qual a administração de 80% da dose letal de endotoxina em ratos não promoveu alterações na R_{aw} . Contrariamente, Campos e colaboradores (2012) verificaram aumento de R_{aw} em ratos sépticos induzidos por CLP, mas ventilados com V_t de 8 ml.kg^{-1} , maior que o do presente trabalho e, com permanência prolongada no ventilador mecânico (de 30 minutos à 2 horas). Gomes e colaboradores (2000), reportam que a R_{aw} pode ser constante em animais com pulmões saudáveis ou levemente constrictos.

É importante ressaltar, que em nosso estudo, utilizamos V_t de 6 ml.kg^{-1} , considerado um V_t protetor. Tem-se mostrado que altos V_t podem exacerbar alterações estruturais e funcionais do pulmão, além de poder liberar mediadores inflamatórios que translocam-se para a circulação sistêmica, aumentam a permeabilidade epitelial, contribuindo para a ocorrência de DMO em pacientes com SDRA/LPA (TREMBLAY et al., 1997; SLUTSKY; TREMBLAY, 1998). Esta hipótese foi fortalecida pelo estudo The Ards Network (2000), o qual demonstram que baixos V_t protegem os pulmões do excessivo estiramento, resultando em melhora de muitos parâmetros clínicos do paciente com SDRA/LPA.

Rocco e colaboradores (2001) descrevem que as mudanças no comportamento mecânico ocorrem mesmo quando o parênquima pulmonar está levemente anormal (com membranas alveolares espessas e aumento da celularidade), sugerindo que a disfunção da mecânica tem papel importante na patofisiologia da LPA. A taxa de G_{tis}/H_{tis} , a qual é conhecida por η , tem sido mostrada aumentada nas heterogeneidades regionais desenvolvidas no pulmão (BATES, ALLEN, 2006). O aumento de η pode indicar deteriorização pulmonar difusa (BATES, ALLEN, 2006). Em um estudo de Dixon; De Smet; Bersten (2009) no qual administrou LPS intratraqueal em ratos, ao analisar os parâmetros de mecânica respiratória, verificou aumento de G_{tis} em cerca de 25% e aumento de η em comparação ao controle, também sem mudanças em R_{aw} . Essas alterações foram acompanhadas da disfunção do surfactante e da deteriorização na oxigenação do animal. Alterações em G_{tis} e η também foram observadas nos nossos animais dos grupos CLP met e CLP sal. O aumento em G_{tis} para os grupos CLP sal e CLP met foram cerca de 30% e 40%, respectivamente, em relação ao Naïve. Esses achados foram atribuídos às

alterações histológicas pulmonares, já que esses animais exibiram maior área de colapso alveolar. Esses dados confirmam que há alterações na mecânica respiratória quando na LPA e que a mecânica pulmonar foi significativamente afetada pela sepse. Nossos achados também sugerem que, os GC endógenos na LPA induzida por CLP podem ter papel importante na proteção pulmonar durante a sepse, neste protocolo de 24 horas, uma vez que, embora os níveis de GC endógenos encontrados nos grupos CLP sal e CLP met fossem diferentes para alterações similares da mecânica respiratória, os dois grupos não demonstraram uma adequada ação anti-inflamatória dos GC endógenos. Corroborando com nossos resultados, o trabalho de Middelveld e colaboradores (1999), em modelo de infusão de LPS em suínos, mostrou que após 4 horas de infusão, a administração prévia de met promoveu piora da mecânica respiratória, visto pelas alterações na complacência, sugerindo que o cortisol endógeno tem um papel importante na proteção do pulmão durante o choque séptico e que, se a resposta ao cortisol endógeno é prevenida, os efeitos da endotoxina na mecânica pulmonar podem ser mais severas.

Intervenções terapêuticas tem sido procuradas para melhorar e/ou prevenir a injúria pulmonar observada em pacientes com SDRA/LPA, com o objetivo de aumentar a sobrevivência. O uso de GC exógeno é uma terapia farmacológica que tem demonstrado diminuir a mortalidade em pacientes com SDRA/LPA, independente de sua causa (MARIK et al., 2011). A dexametasona foi o GC escolhido, em nosso trabalho, devido sua potência e a longa ação, e devido seu grande efeito anti-inflamatório e menor efeito mineralocorticoide. Em comparação com a hidrocortisona, a dex não causa mudanças na reabsorção de sódio e não interfere com o balanço de água, evitando a ocorrência de hipervolemia e distúrbios do sódio que poderia interferir na ocorrência de edema pulmonar (SCHIMMER; PARKER, 1996). Além disso, a dose escolhida é considerada baixa, já que inúmeros trabalhos utilizam até 5 mg.kg^{-1} como sendo baixa dose de dex em animais (XINMIN et al., 2006; WANG et al., 2008; LI; WHITEMAN; MOORE, 2009). Inúmeros estudos mostram que baixas doses de GC reduzem mediadores inflamatórios e a necessidade de ventilação mecânica na SDRA/LPA (ANNANE, 2007; ROCCO et al., 2003; MEDURI et al., 2007). Altas doses de GC estão associados a efeitos adversos como imunodepressão e alta mortalidade (KEH; GOODMAN; SPRUNG, 2004).

Assim, se a secreção inadequada de CCT falha em suprimir a inflamação, a administração hormonal poderia promover uma função anti-inflamatória dos GC, por diminuir a produção de citocinas, a atividade do eixo HHA mediada pelas citocinas e a disfunção dos órgãos também mediada pelas citocinas (MEDURI, 1999). A habilidade da ativação do GR pelo GC e de promover diminuição da inflamação sistêmica e restaurar a homeostase do tecido pode ser significativamente melhorada pelos GC exógenos (MEDURI, 2002). Em nosso estudo,

a administração prévia de dex não modificou significativamente a imunorreatividade total e citoplasmática ao GR, porém aumentou sua fração nuclear em comparação ao grupo Sham, associada a melhora da inflamação pulmonar. De fato, Wang e colaboradores (2008) demonstraram que, em tecido pulmonar de ratos, a administração de baixas doses de dex na LPA induzida por LPS promoveu redução da inflamação e da fibrose, além de aumentar a expressão do RNA mensageiro para GR e aumentar a translocação da proteína madura para o núcleo. Acredita-se que este efeito seja intermediado pela ativação predominante de GR α pela dex, com a consequente inibição da cascata inflamatória e da via mediada pelo NF- κ B, uma vez que estes animais apresentaram melhora nos parâmetros funcionais investigados. Também foi descrito por Meduri e colaboradores (2009) que a terapia de baixas doses de GC pode promover *down regulation* da transcrição das citocinas inflamatórias a nível celular por *down regulation* da transcrição de NF- κ B mediada pelo aumento da ativação de GR α .

Os efeitos da administração de dex são repetidamente demonstrados. Estudos com pacientes com SDRA/LPA demonstram que baixas doses de dex reduzem os mediadores inflamatórios e a necessidade de ventilação mecânica (ANNANE, 2007; MEDURI et al., 2007). Outros estudos utilizando modelos animais de LPA mostram que os GC administrados simultaneamente ou previamente ao insulto experimental, diminuem a morbidade a mortalidade (FERNANDES; ZIN WAN; ROCCO, 2005). De fato, no presente estudo, os animais que receberam prévias doses de dex apresentaram efeitos benéficos quanto a prevenção da inflamação, vistos pela redução da porcentagem de células inflamatórias e da atividade de MPO no tecido pulmonar. Em concordância está o trabalho de Xinmin e colaboradores (2006), no qual utilizando um modelo de LPA induzida por instilação intratraqueal de água do mar, em coelhos previamente tratados com dex, verificou que a dex marcadamente inibiu a infiltração de neutrófilos e consequentemente pôde inibir a atividade de MPO no tecido pulmonar. Além disso, os autores reportam que a dex pode ter inibido a ativação de macrófagos alveolares. Sun e colaboradores (2009) também observou que a previa administração de dex evitou o aumento da atividade de MPO e o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar, quando trabalhou com modelo de LPA causado isquemia-reperfusão em ratos. O trabalho de Wang (2008), no qual administrou baixas doses de dex por três dias em ratos com LPA induzido por LPS também verificou diminuição da inflamação e da fibrose pulmonar. Seus achados foram acreditados ocorrer pelo efeito da dex em inibir a fosforilação e a degradação proteolítica de I κ B, prevenindo a liberação e a translocação nuclear de NF- κ B, não ocorrendo a produção de citocinas inflamatórias, evitando dano e preservando as células do epitélio alveolar.

A prevenção do colapso alveolar e dos parâmetros fisiológicos da mecânica respiratória visto no presente estudo, nos animais CLP dex, também foram observados no estudo de Rocco e colaboradores (2003), no qual baixas doses de GC administradas em ratos, na fase precoce de LPA, induzida por paraquat, promoveu inalteração dos parâmetros de mecânica em um parênquima pulmonar levemente alterado, por suas propriedades anti-inflamatórias (bloqueio de NF- κ β e a expressão de genes pro-inflamatórios e a transcrição de muitas citocinas relevantes na SDRA/LPA) e minimizou as propriedades visco-elásticas na lesão severa, uma vez que os GC agem no processo de remodelamento, reduzindo o depósito de fibras de colágeno. Além disso, o trabalho de Nin et al. (2009) mostra que ratos sépticos induzidos por CLP e ventilados com alto Vt demonstraram prevenção das mudanças ventilatórias e cardiovasculares promovidas pela administração de dex.

A prévia administração de dex, em nosso estudo, mostrou uma significativa diminuição da mortalidade, devido a prevenção da inflamação e das conseqüentes lesões promovidas pela sepse no tecido pulmonar. O estudo de Cicarelli e colaboradores (2006 e 2007), no qual tratou pacientes com SDRA/LPA na fase exsudativa com baixas doses de dex observou melhora na taxa de PaO₂/FiO₂ e maior sobrevida. Sugere-se que essa melhora seja devido às ações anti-inflamatórias da dex em promover maior integridade da barreira epitelial em relação a resolução do edema e assim promover maior sobrevivência dos pacientes.

7 CONCLUSÃO

O pré-tratamento com o inibidor (met) e com o agonista (dex) de GC, em 24 horas, alteraram os níveis plasmáticos de CCT, a imunorreatividade para GR e os parâmetros morfofuncionais, inflamatórios e oxidativos pulmonares avaliados no presente estudo, podendo concluir-se que:

- a) os níveis plasmáticos elevados de CCT, observados nos animais sépticos, e os níveis basais, observados nos animais tratados previamente com met, não foram capazes de prevenir as alterações morfofuncionais e inflamatórias da LPA. No entanto, os resultados não descartam a influência dos GC endógenos no desenvolvimento da síndrome;
- b) os animais sépticos, com níveis plasmáticos elevados de CCT, apresentaram resistência do GR. Os animais sépticos, com níveis plasmáticos basais de CCT, tratados previamente com met, apresentaram aumento da sensibilidade do GR. Porém, sem proteção contra a LPA devido a reduzida oferta de CCT aos tecidos alvos ou pela ativação de GR β . Os animais sépticos, com níveis basais de CCT, tratados previamente com dex, tiveram prevenção da LPA, sugerindo maior atuação do GC exógeno em GR α . Esses resultados sugerem que a imunorreatividade do GR no tecido pulmonar foi influenciada pelos níveis plasmáticos de CCT na condição de sepse;
- c) o aumento em Gtis e η observado nos animais sépticos, com exceção dos tratados previamente com dex, mostra que a função pulmonar foi afetada pela condição de sepse como consequência das alterações morfológicas e estruturais do pulmão;
- d) o aumento da porcentagem de células inflamatórias pulmonares e o aumento da fração de área alveolar colapsada observados nos animais sépticos, com exceção dos tratados previamente com dex, mostram que a sepse foi capaz de aumentar o influxo de células inflamatórias no pulmão e, como consequência, promover colapso alveolar, induzindo LPA. A dex, por suas propriedades anti-inflamatórias, foi capaz de prevenir a migração neutrofílica e o consequente dano alveolar;
- e) o aumento da atividade de MPO no tecido pulmonar, observado nos animais sépticos, com exceção dos tratados previamente com dex, correlacionou-se com o aumento dos neutrófilos pulmonares promovido pela sepse, indicando inflamação pulmonar, favorecendo a instalação da LPA;

- f) o aumento dos níveis de H₂O₂ no tecido pulmonar, ocorrido pela administração prévia de met, pode ter sido influenciado por níveis basais de CCT, por inibição do sistema antioxidante ou por efeito oxidativo direto da met. A administração prévia de dex preveniu o aumento dos níveis de H₂O₂ pulmonar possivelmente por inibição da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular pulmonar, prevenindo a migração neutrofílica.

Parte desse trabalho resultou da publicação de um artigo científico em revista internacional indexada, em anexo.

INCERPI, E. K, OLIVEIRA, L. M, PEREIRA, E. M, SONCINI, R. Inhibition of endogenous glucocorticoid synthesis aggravates lung injury triggered by septic shock in rats. **Int J Exp Pathol**, 2015. doi: 10.1111/iep.12113.

REFERÊNCIAS

- AARON, S. D. et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 163, p. 349–355, 2001.
- AGARWAL, R. et al. Do glucocorticoids decrease mortality in acute respiratory distress syndrome? A meta-analysis. **Respirology**, v. 12, p. 585-590, 2007.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006. Review.
- AL-ANATI, L.; KATZ, N.; PETZINGER, E. Interference of arachidonic acid and its metabolites with TNF-alpha release by ochratoxin. A front rat liver. **Toxicology**, v. 208, p. 335–346, 2005.
- ALEXANDER, B. N.; FEWELL, J. E. Metyrapone restores the febrile response to Escherichia coli LPS in pregnant rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, p. 1588-1595, 2011.
- ALMAWI, W. Y. et al. Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6 and IFN-gamma. **J Immunol**, v. 146, p. 3523-3527, 1991.
- AMATO, M. B. P. et al. Ventilação mecânica na Lesão Pulmonar Aguda (LPA)/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). **J. bras. Pneumol**, v. 33, p. 119-127, 2007.
- ANDRADES, M. et al. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. **J Surg Res**, v.125, p.68-72, 2005.
- ANNANE, D. et al. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. **JAMA**, v. 283, p. 1038–1045, 2000.
- ANNANE, D. Glucocorticoids for ARDS: Just Do It! **Chest**, v. 131, p. 945-946, 2007.
- ANTONIAZZI, P. et al. Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 493-506, 1998.

- ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, p. 319-323, 1967.
- BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med**, v. 3, p. 35–56, 1982.
- BAGBY, G. J. et al. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. **J Infect Dis**, v. 163, p. 83-88, 1991.
- BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, p. 331- 335, 1983.
- BAKER, C. S. et al. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. **Lancet**, v. 353, p.1232–1237, 1999.
- BARNES, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 120, p. 76-85, 2010.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet**, v. 373, p. 1905-1917, 2009.
- BATES, J. H. T. **Lung mechanics: An inverse modeling approach**. New York: Cambridge University Press, 2009.p. 238.
- BATES, J. H.; ALLEN, G. B. The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. **Ann Biomed Eng**, v. 3, p. 384-392, 2006.
- BEALE, R. et al. Advisory Board. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, p. 222-232, 2009.
- BELLINGAN, G. J. The pulmonary physician in critical care: the pathogenesis of ALI/ARDS. **Thorax**, v. 57, p. 540-546, 2002. Review.
- BELLINGHAM, D. L; SAR, M.; CIDLOWSKI, J. A. Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. **Mol Endocrinol**, v. 6, p.2090-2102, 1992.
- BERNARD, G. R. Acute distress syndrome: a historical perspective. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, p. 798-806, 2005.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 149, p. 818-824, 1994.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, v. 81, p. 1-5, 2007. Review.

BIDDIE, S. C; CONWAY-CAMPBELL, B. L; LIGHTMAN, S. L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. **Rheumatology**, v. 51, p. 403-412, 2012. Review.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v. 115, p. 457-469, 1991.

BORRELL, J.; DE KLOET, E. R.; BOHUS, B. Corticosterone decreases the efficacy of adrenaline to affect passive avoidance retention of adrenalectomized rats. **Life Sci**, v. 34, p. 99-104, 1984.

BREIVIK, T. et al. Differential susceptibility to periodontitis in genetically selected Wistar rat lines that differ in their behavioral and endocrinological response to stressor. **Behav Genet**, v. 30, p.123-130, 2000.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p.732-736, 1999.

BROOKS, H. F. et al. Cecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. **Metab Brain Dis**, v. 22, p.353-373, 2007.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 854-865, 2005. Review.

CAMPOS, R. et al. N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, p. 640-650, 2012.

CASTELLHEIM, A. et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scand J Immunol**, v. 69, p. 479-491, 2009.

CASTIELLO, A. et al. Depletion of surfactant tubular myelin with pulmonary dysfunction in a rat model for acute endotoxemia. **Shock**, v. 2, p. 427-432, 1994.

CHABOT, F. et al. Reactive oxygen species in acute lung injury. **Eur Respir J**, v.11, p. 745–757, 1998.

CHRISTMAN, J. W.; SADIKOT, R. T.; BLACKWELL, T. S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. **Chest**, v. 117, p. 1482–1487, 2000.

CHROUSOS, G. P. The HPA axis and the stress response. **Endocr Res**, v. 26, p. 513-514, 2000.

CICARELLI, D. D.; VIEIRA, J. E.; BENSEÑOR, F. E. Early dexamethasone treatment for septic shock patients: a prospective randomized clinical trial. **Sao Paulo Med. J**, v. 125, p. 237-241, 2007.

CICARELLI, D. D.; BENSEÑOR, F. E.; VIEIRA, J. E. Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response. **Sao Paulo Med. J**, v. 124, p. 90-95, 2006.

CLARK, A. R.; BELVISI, M. G. Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. **Pharmacol Ther**, v. 134, p. 54-67, 2012. Review.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891, 2002.

CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT JR, P. I. Metabolismo do ácido araquidônico na sepse. In: SILVA, F. P.; VELASCO, I. T. **Sepse**. Manole; 2007. p. 214-242.

CUZZOCREA S. et al. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. **FASEB J**, v. 15, p. 1187-1200, 2001.

DANTZKER, D. R. et al. Ventilation-perfusion distributions in adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 120, p. 1039, 1979.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. Interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-*k*B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocr Rev**, v. 24, p. 488-522, 2003.

DE CASTRO, M. et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. **Mol Med**, v. 2, p. 597-607, 1996.

DEJEAN, C.; RICHARD, D. Mechanisms of action of glucocorticoids. **Rev Med Interne**, v. 34, p. 264-268, 2013

DIXON, D. L.; DE SMET, H. R.; BERSTEN, A. D. Lung mechanics are both dose and tidal volume dependent in LPS-induced lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 167, p. 333-340, 2009.

DONG, Y. et al. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. **Mol Endocrinol**, v. 2, p. 1256-1264, 1988.

DUBOIS, A. B., LANPHIER, E. H., MARSHALL, R. Resistance to breathing in normal subjects during simulated dives. **J Appl Physiol**, v. 9, p. 5-10, 1956.

EISNER, M. D. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Network: Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p. 231–236, 2001.

ELIAS, et al. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 1243–1247, 1997.

FERNANDES, A. B. S.; ZIN WAM; ROCCO, P. R. M. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 147-159, 2005.

FONG, Y. et al. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. **Surg Gynecol Obstet**, v. 170, p. 363-378, 1990.

GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translation approach. **Swiss Med Wkly**, v. 22, p. 586-590, 2003.

GINZBERG, H. H. et al. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, p. 705–717, 2001.

GOMES, R. F. et al. Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J. Appl. Physiol**, v. 89, p. 908-916, 2000.

GOODMAN, R. et al. Cytokine mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, p. 523–535, 2003.

HAEGENS A. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *J Immunol*, v. 182, p. 7990-7996, 2009.

HAYNES JR, R. Adrenocorticotrophic hormone: adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: GILLMAN, A.; RALL, T.; TAYLOR, P. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8 ed. Pergamon Press, New York, 1990. p. 1431–1462.

HERRIDGE, M. S. et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 348, p. 683-693, 2003.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, p. 518-530, 2013. Review.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 621–663, 2000.

KATZENSTEIN, A. L.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock, and related factors. **Am J Pathol**, v. 85, p. 209-228, 1976. Review.

KEH, D.; GOODMAN, S.; SPRUNG, C. L. Corticosteroid therapy in patients with severe sepsis and sepsis shock. **Semin. Respir. Crit. Care Med**, v. 25, p.713–719, 2004.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 279–289, 2008.

KUHLMANN, M. K. New Experimental Model of Acute Renal Failure and Sepsis in Rats. **J Parenter Enteral Nutr**, v.18, p. 477-485, 1994.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 102, p. 431– 436, 2005.

LAM, E.; SANTOS, C. C. Advances in molecular acute lung injury/acute respiratory distress syndrome and ventilator induced-lung injury: the role of genomics, proteomics, bioinformatics and translation biology. **Current Opinion in Critical Care**, v. 14, p. 3-10, 2008.

LAMBERTS, S. W.; BRUINING, H. A.; DE JONG, F. H. Corticosteroid therapy in severe illness. **N. Engl. J. Med**, v. 337, p. 1285–1292, 1997.

LEAVER, S. K, EVANS, T. W. Acute respiratory distress syndrome. **B.M.J.** v. 335, p. 389-394, 2007.

LEUNG, D. Y. et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. **J Exp Med**, v. 186, p. 1567–1574, 1997.

LEWIS, J. F.; JOBE, A. H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, p. 218-233, 1993. Review.

LEWIS-TUFFIN, L. J. et al. Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. **Mol Cell Biol**, v. 27, p. 2266-2282, 2007.

LIEN, E.; INGALLS, R. R. Toll-like receptors. **Crit Care Med**, v. 30, p. 1-11, 2002.

LI, L.; WHITEMAN, M.; MOORE, P. K. Dexamethasone inhibits lipopolysaccharide-induced hydrogen sulphide biosynthesis in intact cells and in an animal model of endotoxic shock. **J Cell Mol Med**, v. 13, p. 2684-2692, 2009.

LI, X. et al. A novel role for IL-18 in corticosterone-mediated intestinal damage in a two-hit rodent model of alcohol intoxication and injury. **J Leuko Biol**, v. 80, p. 367–375, 2006.

LIU, L. Y. et al. Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A2 in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion. **Am Rev Respir Dis**, v. 148, p. 878-881, 1993.

LOWRY, S. F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. **Arch surg**, v. 128, p. 1235-1241, 1993.

MACLAREN, R.; JUNG, R. Stress-dose corticosteroid therapy for sepsis and acute lung injury or acute respiratory distress syndrome in critically ill patients. **Pharmacotherapy**, v. 22, p. 1140-1156, 2002.

MARIK, P. E. et al. Glucocorticoid treatment in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Clin**, v. 27, p. 589-607, 2011. Review.

MARTIN, C. et al. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adults respiratory distress syndrome. A study in mechanical ventilation patients. **Chest**, v. 107, p. 196-200, 1995.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest**, v. 122, p. 2731-2740, 2012.

MATUTE-BELLO, G. et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, p. 1969–1977, 1997.

MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocr Rev**, v. 20, p. 435-459, 1999.

MEDURI, G. U. et al. Methylprednisolone infusion in early severe ARDS. **Chest**, v. 131, p. 954–963, 2007.

MEDURI, G. U. An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis: disease pathophysiology and the design of treatment investigation. **Sepsis**, v. 3, p. 21–38, 1999.

MEDURI, G. U. Clinical review: a paradigm shift: the bidirectional effect of inflammation on bacterial growth. Clinical implications for patients with acute respiratory distress syndrome. **Crit Care**, v. 6, p. 24-29, 2002.

MEDURI, G. U. et al. Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy. **Chest**, v. 136, p. 1631-1643, 2009.

MEDURI, G. U. et al. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. **Chest**, v. 108, p. 1303–1314, 1995.

MEDURI, G. U. et al. Nuclear factor-kappaB and glucocorticoid receptor alpha mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation induced target tissue resistance to glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 12, p. 321-338, 2005.

MENEZES, S. L. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **J Appl Physiology**, v. 98, p. 1777-1783, 2005.

MESOTTEN, D.; VANHOREBEEK, I.; VAN DEN BERGHE, G. The altered adrenal axis and treatment with glucocorticoids during critical illness. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab**, v. 4, p. 496-505, 2008.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, p. 39-44, 2006. Review.

MICHAELSON, E. D.; GRASSMAN, E. D.; PETERS, W. R. Pulmonary mechanics by spectral analysis of forced random noise. **J Clin Invest**, v. 56, p. 1210-1230, 1975.

MICHEL, V. et al. Effect of glucocorticoid depletion on heat-induced HSP-70, Il-1beta and TNF-alpha gene expression. **Brain Res**, v. 1164, p. 63-71, 2007.

MIDDELVELD, R. J. et al. Effect of cortisol-synthesis inhibition on endotoxin-induced porcine acute lung injury, shock, and nitric oxide production. **Shock**, v. 12, p. 382-390, 1999.

MINAMINO, T.; KOMURO, I. Regeneration of the endothelium as a novel therapeutic strategy for acute lung injury. **J Clin Invest**, v. 116, p. 2316-2319, 2006.

MORAES, T. J.; ZURAWSKA, J. H.; DOWNEY, G. P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 21-27, 2006.

MORIYA, H. T.; MORAES, J. C.; BATES, J. H. Nonlinear and frequency-dependent mechanical behavior of the mouse respiratory system. **Ann Biomed Eng**, v. 31, p. 318-326, 2003.

NETEA, M. G. et al. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends Immunol**, v. 24, p. 254-258, 2003. Review.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, v. 55, p. 603-613, 2000.

NIN, N. et al: High-tidal volume ventilation aggravates sepsis-induced multiorgan dysfunction in a dexamethasone-inhibitable manner. **Shock**, v. 31, p. 429-434, 2009.

OAKLEY, R. H. et al. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. **Endocrinology**, v. 138, p. 5028-5038, 1997.

OLIVEIRA, R. H.; BASILLE FILHO, A. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. **J Bras Pneumol**, v. 32, p. 35-42, 2006.

OPAL, S. M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. **Int J Med Microbiol**, v. 297, p. 365-377, 2007. Review.

OZDULGER, A. et al. The protective effect of n-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. **Shock**, v. 19, p. 366-372, 2003.

PARSONS, P. E. et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. **Crit Care Med**, v. 33, p. 1-6, 2005.

PELOSI, P.; CAIRONI, P.; GATTINONI, L. Pulmonary and extrapulmonary forms of acute respiratory distress syndrome. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 22, p. 259-268, 2001.

PEREIRA JR, G. et al. A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 349-362, 1998.

PERUZZO, D. C. et al. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. **Cytokine**, v. 52, p. 184-189, 2010.

PETER, J. et al. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: Meta-analysis. **B.M.J**, v. 336, p. 1006–1009, 2008.

PITTET, J. F. et al. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, p. 1187–1205, 1997.

POLITO, A.; ABOAB, J.; ANNANE, D. Adrenal insufficiency in sepsis. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 18, p. 86-94, 2006.

PUGIN, J. et al. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, v. 27, p. 304-312, 1999.

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 273, p.117-123, 1995.

RAVEN, P. W.; CHECKLEY, S. A.; TAYLOR, N. F. Extra-adrenal effects of metyrapone include inhibition of the 11-oxoreductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a model for 11-HSD I deficiency. **Clin. Endocrinol**, v. 43, p. 637–644, 1995.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHRST, I. The oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Resp. Crit. Care Med**, v. 156, p. 341–357, 1997.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Anti-inflammatory action of glucocorticoids. new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1711-1723, 2005.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 776-787, 2008.

ROCCO, P. R. et al. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 168, p. 677-684, 2003.

ROCCO, P. R. et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p. 1067-1071, 2001.

ROOZENDAL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J. L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, p. 681–693, 1996.

ROSS, S. D. et al. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor- κ B. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 528–536, 2000.

RUBENFELD, G. D. Epidemiology of acute lung injury. **Crit Care Med**, v. 31, p. 276-284, 2003.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1685-1693, 2005.

SANDBERG, A. A. et al. Metabolism of adrenal steroids in dying patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 16, p. 1001-1016, 1956.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In:

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.) **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9 ed. St Louis: McGraw-Hill; 1996. cap. 59, p. 1459-85.

SCHMIDT, K. N. et al. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. **Chem. Biol**, v. 2, p. 13-22, 1995.

SCHUESSLER, T. F., BATES, J. H. A computer-controlled research ventilator for small animals: design and evaluation. **IEEE Trans Biomed Eng**, v. 42, p. 860-866, 1995.

SELBY, C. et al. Neutrophil retention in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am. Rev. Resp. Dis**, v. 143, p. 1359-1364, 1991.

SEONG, S. Y.; MATZINGER P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 469-478, 2004.

SILVA, E. et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). **Crit Care**, v. 8, p. R251-260, 2004.

SLUTSKY, A. S.; TREMBLAY, L. N. Multiple system organ failure: is mechanical ventilation a contributing factor? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, p. 1721-1725, 1998.

SOSENKO, I. R.; LEWIS, P. L.; FRANK, L. Metyrapone delays surfactant and antioxidant enzyme maturation in developing rat lung. **Pediatr. Res**, v. 20, p. 672-675, 1986.

SOUZA, A. B. et al. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. **J. Pneumologia**, v. 29, p. 235-245, 2003.

STEINBERG, K. P. et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 354, p. 1671-1684, 2006.

STEINBERG, K. P. et al. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome: prognostic indicators. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 150, p. 113-122, 1998.

STEINBERG, K. P.; HUDSON, L. D. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. The clinical syndrome. **Clin Chest Med**, v. 21, p. 401-417, 2000.

SUN, J. et al. Effects of curcumin or dexamethasone on lung ischaemia-reperfusion injury in rats. **Eur Respir J**, v. 33, p. 398-404, 2009.

TAHERA, Y. et al. NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma. **J Neurosci Res**, v. 83, p. 1066-1076, 2006.

THE ARDS DEFINITION TASK FORCE. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. **JAMA**, v. 307, p. 2526–2533, 2012.

THE ARDS NETWORK. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1301–1308, 2000.

THIJS, L. G. et al. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive care med**, v. 21, p. 258-263, 1995.

THOMPSON, B. T. Corticosteroids for ARDS. **Minerva Anesthesiol**, v. 76, p. 441-447, 2010. Review.

TOMASHEFSKI JR, J. F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Chest Med**, v. 21, p. 435-466, 2000.

TREMBLAY, L. et al. Injurious ventilator increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest**, v. 99, p. 944–952, 1997.

VESTWEBER, D. et al. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. **Trends Cell Biol**, v. 19, p. 8–15, 2000.

VILLAR, J.; SLUTSKY, A. S. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 140, p. 814– 816, 1989.

WALLEY, K. R. et al. Balanced Of Inflammatory Cytokines Related To Severity And Mortality Of Murine Sepsis. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4733-4738, 1996.

WANG, X. Q. et al. Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. **Respirology**, v. 13, p. 772-780, 2008.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1334–1349, 2000.

WEIBEL, E. R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gill, J. **Models of lung disease: microscopy and structural methods**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 199-247.

WEILAND, J. E. et al. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome: clinical and pathophysiological significance. *Am. Rev. Respir. Dis*, v. 133, p. 218–225, 1986.

WEINSTEIN, R. S. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. **Endocrine**, v. 42, p. 183-190, 2012.

WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Immunology**, v.146, p. 3478-3482, 1991.

WIEDEMANN, H. P. et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. **N Engl J Med**, v. 354, p. 2564-2575, 2006.

XIAO X. et al. Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats. *J Surg Res*, v. 176, p. 31-39, 2012.

XINMIN, D. et al. Dexamethasone treatment attenuates early seawater instillation-induced acute lung injury in rabbits. **Pharmacol Res Apr**, v. 53, p. 372-379, 2006.

YE, X. et al. IL-1 b stimulates alveolar fluid absorption in fetal guinea pig lungs via the hypothalamuspituitary-adrenal gland axis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, p. 756–766, 2004.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J Clin Invest**, v. 107, p. 13-19, 2001.

ANEXO



Inhibition of endogenous glucocorticoid synthesis aggravates lung injury triggered by septic shock in rats

Erika K. Incerpi*, Luiz M. Oliveira[†], Elisângela M. Pereira[‡] and Roseli Soncini*

*Department of Physiological Sciences, UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, [†]Department of Pharmacology, USP, São Paulo, Brazil and [‡]Department of Clinical and Toxicological Analysis, UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

doi: 10.1111/iep.12113

Received for publication: 21
September 2014

Accepted for publication: 1 December
2014

Correspondence:

Roseli Soncini
Institute of Biomedical Sciences
Federal University of Alfenas-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
37130-000 – Alfenas – MG
Brazil
Tel.: +55 35 3299 1405
Fax: +55 35 3299 1063
E-mail: roseli.soncini@gmail.com

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effects of previous administration of metyrapone (met) on the acute lung injury (ALI) induced by caecal ligation and puncture (CLP) and to explore met's relationship with endogenous glucocorticoids (GCs) as measured by inflammatory, oxidative and functional parameters. One hundred and thirty-five Wistar rats were divided into three main groups: Control (Naïve), Sham and CLP. The animals received pretreatment one hour before surgery. The Naïve group did not undergo any procedure or pretreatment. The Sham group only had the caecum exposed and was pretreated with saline. The CLP group was divided into three pretreatments: metyrapone (CLP met 50 mg/kg i.p.), dexamethasone (CLP dex 0.5 mg/kg i.p.) or saline (CLP sal equivalent volume of 0.9% NaCl). Analyses were performed after 6 and 24 h of sepsis. Previous administration of met significantly increased inflammatory cells, as well as myeloperoxidase (MPO) activity in the lung tissue and alveolar collapsed area, with consequent impairment of respiratory mechanics being observed compared to Sham and Naïve; CLP sal exhibited similar results to those of met. The met reduced corticosterone (CCT) levels and dramatically increased hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in the lung tissue compared to CLP sal. Our results suggest that previous administration of met may have contributed to increased pulmonary oxidative stress and increased mortality by mechanisms dependent of endogenous GC.

Keywords

acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, glucocorticoids, metyrapone, sepsis

Acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) are defined as a syndrome of acute respiratory insufficiency. The ARDS is considered a more severe manifestation of the disease with a more severe degree of hypoxaemia (Murray *et al.* 1988; Bernard *et al.* 1994). ALI/ARDS is an inflammation syndrome associated with a collection of clinical, radiological and physiological abnormalities (Bernard *et al.* 1994) characterized by rapid-onset respiratory failure following a variety of direct (pulmonary) and indirect (extrapulmonary) insults to the parenchyma or vasculature of the lungs respectively (Raghavendran & Napolitano 2011). Alveolar epithelium and pulmonary capillary endothelium are destroyed by activated neutrophils and macrophages, which release inflammatory mediators, such as cytokine tumour necrosis factor (TNF- α),

interleukins (ILs) and oxygen metabolites (Puneet *et al.* 2005). Sepsis is one of the primary risk factors for ALI/ARDS (Hudson *et al.* 1995). Patients with sepsis-induced ALI had greater illness severity and organ dysfunction (Sevransky *et al.* 2009). Despite extensive investigation over many years, the impact of ARDS is still a problem for the public and healthcare administrations. Glucocorticoids (GC) have been proposed as a treatment for ALI/ARDS (Annane 2007; Meduri *et al.* 2008) because of their anti-inflammatory properties (Rhen & Cidlowski 2005; Marik *et al.* 2011). However, the results have been controversial (Mesotten *et al.* 2008; Peter *et al.* 2008).

Metyrapone (met), an 11-beta steroid hydroxylation inhibitor, is a powerful and selective inhibitor of GC synthesis in animals and humans (Rooszendal *et al.* 1996). This

agent affects the conversion of deoxycorticosterone, the corticosterone (CCT) precursor, in the rat adrenal cortex and prevents the synthesis and subsequent release of CCT, which is the predominant GC in the bloodstream (Breivik *et al.* 2000). There is concern that a reduction in tissue-generated cortisol by met might decrease feedback to the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, resulting in an upregulation of cortisol production (Maric & Adzic 2013). The effects of met on surfactant, oxidative stress (Sosenko *et al.* 1986) and pro-inflammatory cytokines (Peruzzo *et al.* 2010) have been analysed. Current studies have indicated the potential of met to block deleterious effects on the lung (Baitharu *et al.* 2012; Paek *et al.* 2014) through neuroprotective action (Baitharu *et al.* 2012).

Met has not been studied in an animal model of sepsis, such as caecal ligation and puncture (CLP), to document the effects on the lung injury that is known to be part of the systemic sepsis. Met was used to demonstrate the effects of endogenous GC in the pathogenesis of lung injury. Therefore, we examined the consequences of ALI and investigated previous doses of the GC synthesis inhibitor (met) on the interaction between CCT levels, inflammation (cells and MPO activity), oxidative stress (H_2O_2 levels), alveolar morphology and lung function in a relevant model of sepsis.

Materials and methods

Animals

One hundred and thirty-five adult male rats (Wistar, 250 ± 50 g) were housed in a 12-h daylight cycle and fed with standard chow and water *ad libitum* in the animal care facility of the Laboratory of Physiology, Federal University of Alfenas. The experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki for the welfare of experimental animals, and the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas approved the experimental methods (protocol number 341/11).

Experimental outline

First, rats were randomized into three main groups: CLP, Sham and Control (Naïve). One hour before CLP surgery, the CLP group was divided into subgroups, which received metyrapone (CLP met, 50 mg/kg, i.p.; Sigma, St Louis, MO, USA), dexamethasone (CLP dex; 0.5 mg/kg, i.p.; Merck, Sharp & Dohme, Brazil) or an equivalent volume of saline intraperitoneally (CLP sal; 0.9% NaCl). The Naïve group did not undergo surgery or receive any drugs. The Sham group received an equivalent volume of saline intraperitoneally (Sham; 0.9% NaCl). To prepare for surgical procedures, animals were anesthetized with tribromoethanol (TBE) 250 mg/kg. A laparotomy was performed (1 cm longitudinal incision, lower abdomen), and the caecum was exteriorized and ligated just distally to the ileocaecal valve to avoid any intestinal obstruction and subsequently punctured with a 19-gauge needle. A small amount of the bowel contents

were then extruded through the puncture site. The caecum was subsequently replaced into the peritoneal cavity, and the incision was closed with surgical staples. In Sham animals, the caecum was only exteriorized before being returned and closing the abdomen. Fluid resuscitation was with sterile saline (100 mg/kg i.p.). Animals were recovered from anaesthesia in a warm environment and were monitored for 6 or 24 h until the beginning of experimental procedures, which were as follows: blood and tissues samples for biochemical measures ($N = 8$ per group), respiratory mechanical and tissue samples for histological procedures ($N = 5-7$ per group).

Corticosterone

Early-morning baseline samples of blood for hormone measurements were collected in Eppendorf tubes containing 20 μ l of 0.05 M EDTA. Blood was immediately placed on ice and centrifuged, and the plasma was collected. The CCT level was performed by radioimmunoassay using a standard and specific antibody (Sigma). Before performing the radioimmunoassay, plasma samples were placed into individual tubes, and ethanol was added. The tubes were centrifuged for 15 min at 259 g under refrigeration (4°C), and the supernatants were subsequently transferred to other tubes for lyophilization. Dry material was stored at -20°C until the completion of radioimmunoassay. The results are expressed in ng/ml.

Myeloperoxidase (MPO) activity

Lung samples weighing between 310 and 360 mg were homogenized in buffer containing 50 mM potassium phosphate (pH 6.0). The mixture was centrifuged at 12,000 g for 30 min, and the resulting pellet was resuspended in phosphate buffer containing 5% wt/vol hexadecyltrimethyl ammonium bromide (Sigma). The suspension was subjected to three cycles of freezing and further disrupted by sonication for 40 s. The sample was then centrifuged at 7,200 g for 5 min at 4°C, and the supernatants were used for the MPO assay. The Amplex Red peroxidase assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used to determine MPO activity in the lung homogenates according to the manufacturer's instructions. The absorbance of each sample was measured using a microplate reader equipped for excitation in the range of 560 nm (Synergy H1, hybrid reader; BioTek; Winooski, VT, USA). The results from lungs are expressed in mU/g.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) measurement

Lung samples weighing between 190 and 230 mg were homogenized in 140 mM/l NaCl, 10 mM/l potassium phosphate buffer and 5 mM/l dextrose (pH 7.0). The mixture was centrifuged at 580 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was used for the H_2O_2 assay. The Amplex Red peroxide assay kit (Molecular Probes, Invitrogen) was used to determine H_2O_2 measured in the lung homogenates

according to the manufacturer's instructions. The absorbance of each sample was measured using a microplate reader equipped for excitation in the range of 560 nm (Synergy H1, hybrid reader; Biotek). The results from lungs are expressed in $\mu\text{M/g}$.

Respiratory mechanical

Rats (6 or 24 h after CLP, Sham surgery or Naïve) were anesthetized (xylazine 8 mg/kg, pentobarbital 40 mg/kg) and received an analgesic (Tramal 30 mg/kg i.p.); next, a tracheotomy tube was inserted, and ventilation was started (tidal volume 6 ml/kg; positive end-expiratory pressure, 3.0 cm H_2O ; respiratory rate 110/min) with a computer-controlled ventilator (SCIREQ, Flexivent, Montreal, QC, Canada). The animals were paralysed with pancuronium bromide (0.5 ml/kg, i.p.) and kept warm using a heating pad. The respiratory system input impedance (Z_{rs}) was measured by applying 3 s oscillatory volume perturbations to the tracheal cannula that was connected to the airway opening. By fitting the constant phase model to the obtained data, the mechanical parameters airway resistance (R_{aw}), tissue damping (Gtis), tissue elastance (Htis) and hysteresivity (η) were estimated. This technique was specially designed to measure the input Z_{rs} of small animals (Gomes *et al.* 2000) and has been described in detail previously (Hantos *et al.* 1992; Peták *et al.* 1997). The experiments were conducted with the chest wall preserved.

Histology

After mechanical ventilation, the trachea was clamped at the end of expiration, heparin (1000 UI) was intravenously injected into the vena cava, the aorta was cut (leading to a massive haemorrhage and killing the animals quickly), and the right lung was fixed in 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Slides were cut to 4 μm thickness and stained with haematoxylin–eosin. The lung morphology was analysed in ten random areas in non-coincident microscopic fields with an integrating eyepiece on a coherent system made up of a 100 point grid consisting of 50 lines of known length and coupled to a conventional light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The volume fractions of the collapsed and normal pulmonary areas were determined using the point-counting technique (Weibel & Gomez 1962) at a magnification of 200 \times . Neutrophils, mononuclear cells (MN) and lung tissue were evaluated at 1000 \times magnification. Points falling on neutrophil and MN cells were counted and divided by the total number of points falling on tissue area in each microscopic field.

Statistical analysis

All data, except for mortality percentage, are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was assessed by parametric methods using one-way

analysis of variance followed by Tukey test (ANOVA) in GraphPad Prism (version 5.0; San Diego, CA, USA). The analysis of mortality percentage was assessed by analysis and adjustment of logistic regression models (binomial) using the *glm* function of Statistical Computing System R 3.0.2 software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). For each analysis, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Corticosterone plasma levels at 6 ($F_{4,30} = 9.84$) and 24 h ($F_{4,28} = 6.06$) (Figure 1a and b respectively) show a significantly elevated, nearly 2.5-fold increase in the CLP sal group in comparison with the Naïve ($P < 0.001$) and Sham ($P < 0.01$) groups. CLP met and CLP dex groups are different from CLP sal ($P < 0.05$; $P < 0.001$ respectively) at 6 h. After 24 h, the CCT levels exhibited the same profile, except for the CLP met group, which exhibited similar values to the Naïve and Sham groups.

The biochemical measurements of lung tissue at 6 h in the CLP groups were not significantly different from the Naïve and Sham groups (data not shown). The values observed at 24 h (Figure 2a,b) for MPO activity ($F_{4,27} = 15.50$), a marker of inflammation, in the CLP sal and CLP met groups showed a significant increase compared to the Naïve ($P < 0.001$) and Sham ($P < 0.001$) groups. The MPO values

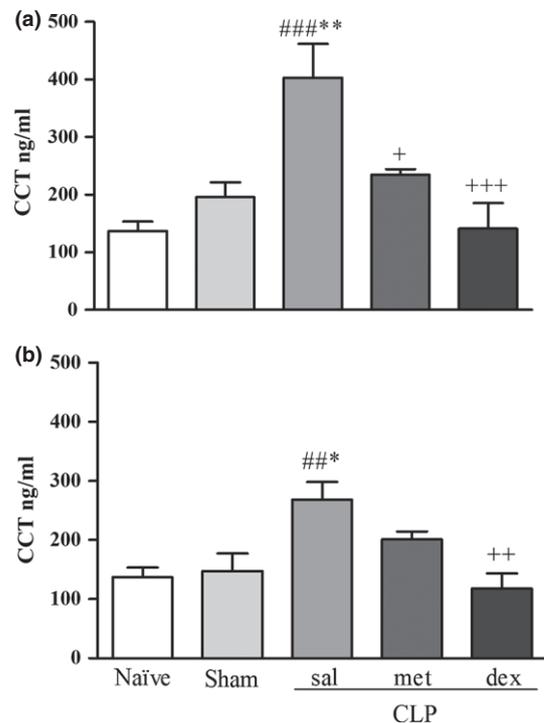


Figure 1 Plasma levels of corticosterone (CCT) (a) 6 and (b) 24 h after surgery. Values are mean \pm SEM. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared to Naïve group; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to Sham group; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ compared to CLP sal group. $N = 8$.

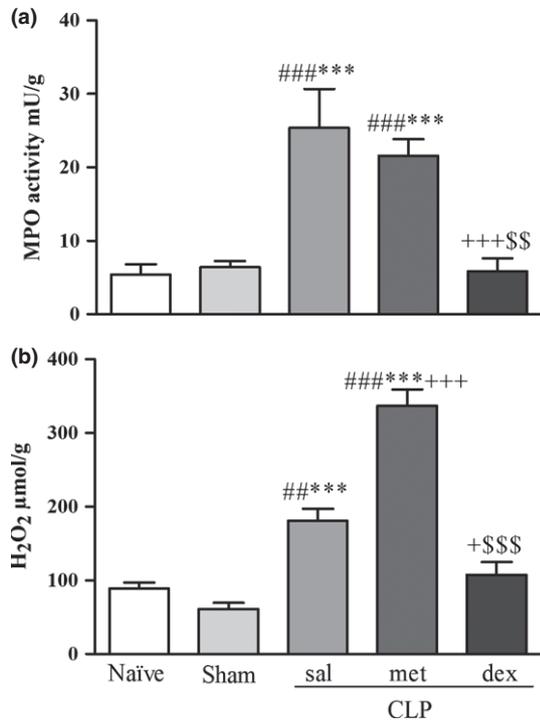


Figure 2 (a) Myeloperoxidase (MPO) activity and (b) hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in lung tissue 24 h after surgery. Values are mean \pm SEM. ^{##} $P < 0.01$ and ^{###} $P < 0.001$ compared to Naïve group; ^{***} $P < 0.001$ compared to Sham group; ^{*} $P < 0.05$ and ⁺⁺⁺ $P < 0.001$ compared to CLP sal group; and ^{\$\$} $P < 0.01$ and ^{\$\$\$} $P < 0.001$ compared to CLP met group. $N = 8$.

of the CLP dex group were similar to the Naïve and Sham groups demonstrating a reduced activity in comparison with the CLP sal ($P < 0.001$) and CLP met ($P < 0.01$) groups. The H₂O₂ levels ($F_{4,27} = 55.42$), an oxidative stress indicator, were elevated in the CLP sal and CLP met groups compared to the Naïve ($P < 0.01$; $P < 0.001$ respectively) and Sham ($P < 0.001$) groups. The H₂O₂ values for the CLP met group were higher than all the other groups ($P < 0.001$). The H₂O₂ values of the CLP dex group were similar to the Naïve and Sham groups exhibiting a reduced level in comparison with the CLP sal ($P < 0.05$) and CLP met ($P < 0.001$) groups.

All respiratory mechanical results at 6 h, as well as R_{aw} and H_{tis} results at 24 h, were not significantly different from the Naïve or Sham groups (data not shown). The G_{tis} ($F_{4,27} = 15.69$) and η ($F_{4,27} = 4.93$) values at 24 h are shown in Figure 3a and b respectively. The CLP sal and CLP met groups showed significantly increased G_{tis} compared to Naïve ($P < 0.001$) and dex groups ($P < 0.01$; $P < 0.001$ respectively). The G_{tis} values of the CLP met group were significantly different from the Sham group ($P < 0.01$). The η values of the CLP sal and CLP met groups were significantly different from the Sham group ($P < 0.05$).

The CLP sal and CLP met groups were characterized by a significant reduction in fractions of alveolar normal area

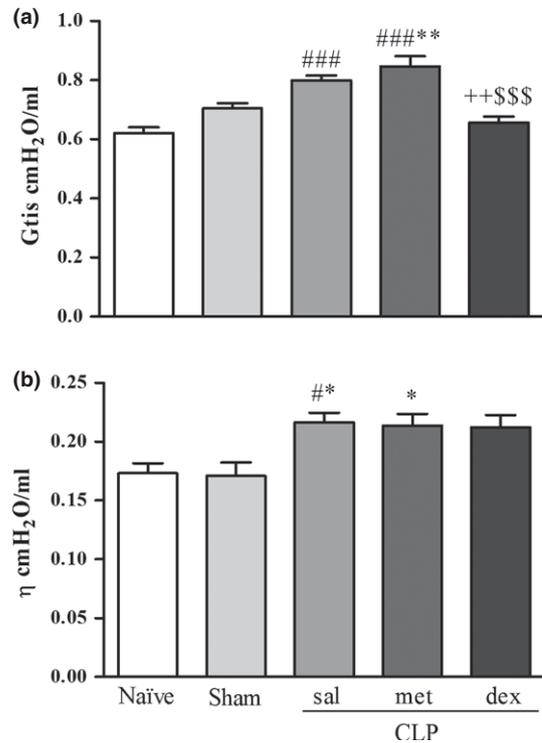


Figure 3 (a) Tissue damping (G_{tis}) and (b) hysteresivity (η) 24 h after surgery. Values are mean \pm SEM. [#] $P < 0.05$ and ^{###} $P < 0.001$ compared to Naïve group; ^{*} $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ compared to Sham group; ⁺⁺ $P < 0.01$ compared to CLP sal group; and ^{\$\$\$} $P < 0.001$ compared to CLP met group. $N = 5-7$.

($F_{4,24} = 159.1$) and increased alveolar collapsed area ($F_{4,24} = 166.1$) compared to Naïve ($P < 0.001$) and Sham ($P < 0.001$) groups (Table 1). CLP dex showed increased alveolar normal area and decreased alveolar collapsed area compared to the CLP sal ($P < 0.01$) and CLP met groups ($P < 0.05$). The CLP sal group showed an increased percentage of Neut ($F_{4,20} = 11.88$) and MN ($F_{4,20} = 13.71$) cells at 24 h compared to the Naïve ($P < 0.01$; $P < 0.001$ respectively) and Sham groups ($P < 0.001$). The CLP met group showed an increased percentage of Neut and MN cells at 24 h compared to the Naïve ($P < 0.05$; $P < 0.001$ respectively) and Sham groups ($P < 0.01$; $P < 0.001$ respectively). The CLP dex group showed a significant decrease in Neut and MN fractions compared to the CLP sal ($P < 0.01$) and CLP met groups ($P < 0.01$; $P < 0.05$ respectively).

After 24 h of CLP-induced sepsis, the mortality percentage varied according to the previously administered drug. The results were the following: 0% Naïve and Sham, 13% CLP dex, 38% CLP sal and 75% CLP met. As observed, the CLP met group mortality percentage was significantly different from the Naïve, Sham, CLP sal and CLP dex groups. The death risk of the CLP met group was nine times greater compared to the Naïve group.

Table 1 Morphometric parameters at 24 h

	Normal Alveoli (%)	Collapsed Alveoli (%)	Neut [†] (%)	MN [‡] (%)
Naïve	95.40 ± 0.52	4.61 ± 0.52	1.63 ± 0.21	0.73 ± 0.08
Sham	93.57 ± 0.72	5.10 ± 0.50	1.12 ± 0.15	0.77 ± 0.19
CLP sal	68.69 ± 4.00 ^{#####}	28.97 ± 3.77 ^{#####}	4.81 ± 0.99 ^{###***}	2.40 ± 0.27 ^{###***}
CLP met	73.47 ± 1.97 ^{#####}	24.48 ± 1.37 ^{#####}	4.23 ± 0.26 ^{###***}	2.63 ± 0.35 ^{#####}
CLP dex	86.25 ± 4.30 ^{++\$}	12.68 ± 4.11 ^{++\$}	1.28 ± 0.42 ^{++\$}	1.39 ± 0.23 ^{\$}

Normal alveoli, collapsed alveoli, neutrophils[†] and mononuclear[‡] cells percentage. Values are mean ± SEM. All values were computed in 10 random, non-coincident fields per rat. [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 and ^{###}*P* < 0.001 compared to Naïve group; ^{**}*P* < 0.01 and ^{***}*P* < 0.001 compared to Sham group; ⁺⁺*P* < 0.01 compared to CLP sal group; ^{\$}*P* < 0.05 and ^{\$\$}*P* < 0.01 compared to CLP met group; *N* = 5.

Discussion

In the present study, using a previous dose of the GC antagonist met, we observed increased pulmonary inflammation and a higher alveolar collapsed area with consequent impairment in respiratory mechanics, similar to the CLP sal group. However, met reduced CCT levels with drastically increased pulmonary oxidative stress compared to the CLP sal group. When we observed rats submitted to sepsis that had received a previous single low dose of GC agonist (dex) at 24 h (demonstrating a short-time effect), a beneficial effect on lung protection was demonstrated with a reduction in CCT levels, lung inflammation and oxidative stress. Moreover, the alveolar collapsed area decreased and the physiological parameters of respiratory mechanics were improved compared to the CLP sal group.

There are many controversies regarding lung protection mediated by plasma levels of endogenous GC in sepsis-induced ALI because endogenous GCs are not always effective in suppressing systemic inflammation (Liu *et al.* 1993; Meduri *et al.* 2005), even though the degree of cortisolaemia frequently correlates with severity of illness and mortality rates (Annane *et al.* 2000; Mesotten *et al.* 2008; Thompson 2010). In the present study, rats from the CLP sal group were compared to Naïve and Sham groups until 24 h and showed exacerbated adrenal activity as evidenced by increased CCT levels, which were associated with an increase in lung inflammation. This finding suggests a failure in suppressing inflammation, which could be due to inadequacy and/or tissue resistance to concentrations and durations of endogenous GC elevations (Meduri *et al.* 2002). This result suggests an endogenous GC hypofunction caused by reduced GC receptor-binding capacity in the lung, which may accelerate the pathological response of ALI (Liu *et al.* 1993). In this study, failure of high levels of CCT to suppress inflammation increased the percentage of inflammatory cells, the MPO activity and oxidative stress, with a consequent increased alveolar collapsed area and impairment of respiratory mechanics in CLP sal animals compared to Sham and Naïve animals.

Therapeutic interventions have been sought to improve and/or prevent lung injuries observed in patients with ALI/ARDS with the aim of enhancing survival. In the present study, the animals from the CLP met and CLP dex groups

had basal levels of CCT at 6 and 24 h, showing that the met and dex doses were efficient to block synthesis and the HPA axis, respectively, in those animals. However, met significantly increased the mortality compared to Naïve animals as evidenced by a ninefold greater death risk.

Met is an inhibitor of the final enzyme in the pathway for CCT synthesis (Sosenko *et al.* 1986; Roozendaal *et al.* 1996). In the present study, met administration decreased CCT levels and drastically increased pulmonary oxidative stress, as demonstrated by increased H₂O₂ levels compared to the CLP sal group. This result showed that the decreased lung anti-oxidative capacity by met is dependent on endogenous GC levels. These findings conform to another study that demonstrated that met promoted a decrease in antioxidant enzymes, as well as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in rat lung with low GC levels, and affected the rates of rat survival, suggesting that effect could be attributable to met (Sosenko *et al.* 1986).

The CLP met rats showed increased MPO activity and a greater percentage of neutrophil cells in the lung, similar to the animals of CLP sal group. MPO from neutrophils correlates with lung inflammation and the degree of pulmonary dysfunction (Aaron *et al.* 2001). It was demonstrated that in inflammatory disease, met increased expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL1- β and IL-6, regardless of its effect on plasma CCT levels (Peruzzo *et al.* 2010). In the present study, the inflammatory process in the CLP met group was similar to the CLP sal group, but there were differences in the levels of CCT; thus, we can say that the increase of MPO and inflammatory cells in the lung is independent of the levels of endogenous GC.

The ratio of Gtis/Htis, which is known as η , has been shown to increase in association with regional heterogeneities developed throughout the lung (Rocco *et al.* 2001; Bates & Allen 2006), suggesting that parenchymal mechanical dysfunction plays an important role in the pathophysiology of ALI. Increase in η could indicate the diffused character of pulmonary deterioration (Bates & Allen 2006). Alterations in Gtis and η were also observed in our CLP met and CLP sal animals. These findings were due to histological alterations because these animals exhibited a higher alveolar collapsed area. This study showed that pulmonary mechanics were significantly affected by sepsis and that these effects were not enhanced by met pretreatment in rats. This finding

suggests that endogenous GC in CLP-induced ALI models does not play an important role in protecting the lung during sepsis. In contrast, in a porcine model for endotoxin-induced ALI, met worsened respiratory function by blocking endogenous cortisol, resulting in greatly enhanced endotoxin-induced ALI and shock (Middelveld *et al.* 1999).

If inadequate secretion of CCT fails to suppress inflammation, hormonal administration should promote GC anti-inflammatory function by decreasing the production of inflammatory cytokines, cytokine-driven HPA axis activity and cytokine-driven organ dysfunction (Meduri 1999). The effects of dex are repeatedly demonstrated, and the results of the present study are in agreement with the literature regarding the prevention of lung inflammation (Meduri *et al.* 2002; Wang *et al.* 2008), oxidative stress and MPO activity (Sun *et al.* 2009), decreased alveolar collapsed area and improvement in the physiological parameters of respiratory mechanics (Meduri *et al.* 2002; Rocco *et al.* 2003) with a consequent increase in survival (Cicarelli *et al.* 2006, 2007).

In conclusion, previously administered metyrapone did not prevent lung inflammation and did not improve the morphology and lung function in CLP-induced ALI/ARDS rats after 24 h of sepsis. Moreover, met administered before injury drastically increased pulmonary oxidative stress and increased mortality by mechanisms dependent on endogenous GC. Therefore, met pretreatment in ALI/ARDS should be performed with caution. Thus, we suggest further studies on the effects of met in different models of critical illness which involve disorders in endogenous GC levels.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding source

This work was supported by FAPEMIG process # APQ-02534/10 and APQ-01887/13.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Estela Regina de Oliveira for her expert assistance, Ms. Marina de Fátima Venâncio for providing technical assistance and Dr. Luiz Alberto Beijo for statistical assistance.

References

Aaron S.D., Angel J.B., Lunau M. *et al.* (2001) Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 349–355.

Annane D. (2007) Glucocorticoids for ARDS: Just Do It!. *Chest* **131**, 945–946.

Annane D., Sebille V., Troche G., Raphael J.C., Gajdos P., Bellissant E. (2000) A 3-level prognostic classification in septic shock

based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA* **283**, 1038–1045.

Baitharu I., Deep S.N., Jain V. *et al.* (2012) Corticosterone synthesis inhibitor metyrapone ameliorates chronic hypobaric hypoxia induced memory impairment in rat. *Behav. Brain Res.* **228**, 53–65.

Bates J.H. & Allen G.B. (2006) The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 384–392.

Bernard G.R., Artigas A., Brigham K.L. *et al.* (1994) Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee (Review). *J. Crit. Care* **9**, 72–81.

Breivik T., Sluyter F., Holf M., Cools A. (2000) Differential susceptibility to periodontitis in genetically selected Wistar rat lines that differ in their behavioral and endocrinological response to stressor. *Behav. Genet.* **30**, 123–130.

Cicarelli D.D., Benseñor F.E., Vieira J.E. (2006) Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response. *Sao Paulo Med J* **124**, 90–95.

Cicarelli D.D., Vieira J.E., Benseñor F.E. (2007) Early dexamethasone treatment for septic shock patients: a prospective randomized clinical trial. *Sao Paulo Med J* **125**, 237–241.

Gomes R.F., Shen X., Ramchandani R., Tepper R.S., Bates J.H. (2000) Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J. Appl. Physiol.* **89**, 908–916.

Hantos Z., Daroczy B., Suki B., Nagy S., Fredberg J.J. (1992) Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol.* **72**, 168–178.

Hudson L.D., Milberg J.A., Anardi D., Maunder R.J. (1995) Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 293–301.

Liu L.Y., Sun B., Tian Y., Lu B.Z., Wang J. (1993) Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A2 in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 878–881.

Maric N.P. & Adzic M. (2013) Pharmacological modulation of HPA axis in depression - new avenues for potential therapeutic benefits. *Psychiatr. Danub.* **25**, 299–305.

Marik P.E., Meduri G.U., Rocco P.R., Annane D. (2011) Glucocorticoid treatment in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Clin.* **27**, 589–607.

Meduri G.U. (1999) An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis: disease pathophysiology and the design of treatment investigation. *Sepsis* **3**, 21–38.

Meduri G.U., Tolley E.A., Chrousos G.P., Stentz F. (2002) Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 983–991. Erratum in: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; **188**: 1477.

Meduri G.U., Muthiah M.P., Carratu P., Eltorkey M., Chrousos G.P. (2005) Nuclear factor-kappaB- and glucocorticoid receptor alpha-mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glucocorticoids. *NeuroImmunoModulation* **12**, 321–338.

Meduri G.U., Marik P.E., Chrousos G.P. *et al.* (2008) Steroid treatment in ARDS: a critical appraisal of the ARDS network trial and the recent literature. *Intensive Care Med.* **34**, 61–69.

- Mesotten D., Vanhorebeek I., Van den Berghe G. (2008) The altered adrenal axis and treatment with glucocorticoids during critical illness. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 496–505.
- Middelveld R.J., Wanecek M., Bergman D., Weitzberg E., Alving K. (1999) Effect of cortisol-synthesis inhibition on endotoxin-induced porcine acute lung injury, shock, and nitric oxide production. *Shock* **12**, 382–390.
- Murray J.F., Matthay M.A., Luce J.M., Flick M.R. (1988) An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 720–723.
- Paek D.S., Sakurai R., Saraswat A. *et al.* (2014) Metyrapone alleviates deleterious effects of maternal food restriction on lung development and growth of rat offspring. *Reprod. Sci.* **xx**, 1–16, Pii: 1933719114537712. Epub ahead of print.
- Peruzzo D.C., Benatti B.B., Andersen M.L., Tufik S., Casati M.Z., Nociti F.H. Jr (2010) Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. *Cytokine* **52**, 184–189.
- Peták F., Hayden M.J., Hantos Z., Sly P.D. (1997) Volume dependence of respiratory impedance in infants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1172–1177.
- Peter J., John P., Graham P., Moran J.L., George I.A., Bersten A. (2008) Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ* **336**, 1006–1009.
- Puneet P., Mochhala S., Bhatia M. (2005) Chemokines in acute respiratory distress syndrome (Review). *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, 3–15.
- Raghavendran K. & Napolitano L.M. (2011) Definition of ALI/ARDS. *Crit. Care Clin.* **27**, 429–437.
- Rhen T. & Cidlowski J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1711–1723.
- Rocco P.R., Negri E.M., Kurtz P.M. *et al.* (2001) Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1067–1071.
- Rocco P.R., Souza A.B., Faffe D.S. *et al.* (2003) Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 677–684.
- Roozental B., Bohus B., McGaugh J.L. (1996) Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology* **21**, 681–693.
- Sevransky J.E., Martin G.S., Shanholtz C. *et al.* (2009) Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. *Crit. Care* **13**, R150.
- Sosenko I.R., Lewis P.L., Frank L. (1986) Metyrapone delays surfactant and antioxidant enzyme maturation in developing rat lung. *Pediatr. Res.* **20**, 672–675.
- Sun J., Yang D., Li S., Xu Z., Wang X., Bai C. (2009) Effects of curcumin or dexamethasone on lung ischaemia-reperfusion injury in rats. *Eur. Respir. J.* **33**, 398–404.
- Thompson B.T. (2010) Corticosteroids for ARDS (Review). *Minerva Anesthesiol.* **76**, 441–447.
- Wang X.Q., Zhou X., Zhou Y., Rong L., Gao L., Xu W. (2008) Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology* **13**, 772–780.
- Weibel E.R. & Gomez D.M. (1962) A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.* **17**, 343–348.