
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA
MESTRADO EM PEDIATRIA

**ANÁLISE DA RESPOSTA DE FATOR DE
NECROSE TUMORAL- α E INTERLEUCINA-10
NO LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO DE
RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS
SUBMETIDOS À VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Andréa Lúcia Corso

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina da PUCRS
para obtenção do título de Mestre em
Medicina, concentração em Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones
Co-orientador: Dr. Paulo Márcio C. Pitrez

Porto Alegre, agosto de 2003

MESTRANDA: Andréa Lúcia Corso

ENDEREÇO: Rua Silva Jardim, 757/203 – Porto Alegre/RS

FONE: (51) 3388-3719 / (51) 99768081

E-MAIL: andrea.lucia@terra.com.br

CRM-RS: 22553

ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES

CONFLITO DE INTERESSE: Nenhum

Dedicatória

*A meus pais, Rozendo e Zorlene, pelo apoio e participação
em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus orientadores, Dr. Paulo Márcio Pitrez e Dr. Marcus Jones, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e pelo contínuo apoio, estímulo e orientação que, sem dúvida, foram fundamentais para o sucesso desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Machado Fiori pelos ensinamentos e por ter proporcionado esta continuidade na carreira acadêmica.

Aos pacientes e seus familiares a minha gratidão.

À CAPES, pelo apoio financeiro deste projeto.

À Prof. Dra. Denise Machado Cantarelli pelo constante apoio e pela realização dos testes ELISA.

Ao Prof. Dr. Renato Stein pelo acolhimento e por estar sempre pronto a orientar durante o acompanhamento dos pacientes no Ambulatório de Pneumologia.

À colega e amiga Dra. Luciana Friedrich, que esteve sempre ao meu lado durante todo esse trajeto.

Ao Prof. Dr. Golin pela revisão dos exames radiológicos.

Ao Prof. Dr. Humberto Fiori pela orientação nos conceitos referentes à Neonatologia e leitura da tese.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner pela ajuda na análise dos dados.

Aos residentes em Pneumologia Pediátrica, Drs. Sintia, Leonardo, Anick, Anna Cláudia e Taísa pela amizade, acolhimento e auxílio na realização dos testes de função pulmonar.

Às médicas neonatologistas Dras. Patrícia Leão Bered e Aline Pieruccini pelo apoio durante as coletas das amostras na UTI-Neonatal.

Às enfermeiras, em especial à Tiane, Mery, Dionéia e Marylin, o meu agradecimento pela coleta das amostras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv

PARTE I

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
1.1 Introdução.....	2
1.2 Displasia broncopulmonar.....	2
1.3 Mecanismo inflamatório pulmonar	7
1.4 Citocinas.....	10
1.5 TNF- α	13
1.6 IL-10.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Principal.....	20
3.2 Objetivos Secundários.....	20

4 PACIENTES E MÉTODOS.....	21
4.1 Delineamento do estudo	21
4.2 Seleção da Amostra	21
4.3 Variáveis do estudo	22
4.3.1 Operacionalização das variáveis	23
4.4 Coleta das amostras de lavado traqueobrônquico	24
4.5 Processamento da amostra.....	25
4.6 Mensuração das citocinas	25
4.7 Seguimento dos pacientes	26
4.8 Realização dos testes de Função Pulmonar pela técnica da compressão torácica rápida	27
4.8.1 Preparo do paciente.....	27
4.8.2 Equipamento	28
4.8.2.1 Sistema de aquisição e registro de dados.....	28
4.8.2.2 Sistema de Inflação Pulmonar	29
4.8.2.3 Sistema de Compressão Torácica Rápida.....	30
4.8.3 Manobras Expiratórias Forçadas	32
4.8.4 Variáveis estudadas no Teste de Função Pulmonar.....	33
4.9 Análise estatística	34
4.10 Ética.....	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

PARTE II

1 INTRODUÇÃO	45
2 PACIENTES E MÉTODOS	48
2.1 Seleção da Amostra.....	48
2.2 Coleta das amostras de lavado traqueobrônquico	50
2.3 Processamento da amostra	50
2.4 Mensuração das citocinas.....	51
2.5 Seguimento dos Pacientes.....	51
2.6 Realização dos Testes de Função Pulmonar pela Técnica da Compressão torácica Rápida	52
2.7 Análise estatística.....	53
2.8 Ética	53
3 RESULTADOS	55
3.1. Características da população em estudo.....	55
3.2. Acompanhamento ambulatorial	58
3.3 Análise das citocinas	58
3.4 Estudo da função pulmonar.....	62
4 DISCUSSÃO	65
5 CONCLUSÕES	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	76
APÊNDICES	i

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1 - Sumário do dano pulmonar neonatal.....	9
Figura 2 - Sistema de aquisição de sinais e registro	29
Figura 3 - Sistema de inflação pulmonar e compressão torácica rápida.....	32

PARTE II

Figura 1 - Concentrações de IL-10 (pg/ml) nos primeiros 20 dias de intubação dos pacientes estudados	60
Figura 2 - Concentrações de TNF- α (pg/ml) nos primeiros 20 dias de intubação dos pacientes estudados	61
Figura 3 - Escore Z das variáveis do teste de função pulmonar	63
Figura 4 - Correlação entre os níveis de TNF- α no LTB no segundo dia pós- intubação e FEF ₇₅	64

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Tabela 1 - Dados perinatais dos pacientes em estudo	56
Tabela 2 - Características clínicas da amostra	57
Tabela 3 - Positividade das interleucinas em relação aos dias da coleta.....	59
Tabela 4 - Dados dos pacientes no momento do teste de função pulmonar e resultados	62

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Complemento
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i> – Pressão positiva contínua nas vias aéreas
CPT	Capacidade pulmonar total
CRF	Capacidade residual funcional
CVF	Capacidade vital forçada
DBP	Displasia broncopulmonar
DMH	Doença da membrana hialina
DPC	Doença pulmonar crônica
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i> – Ensaio imunoenzimático
FEF₅₀/FEF₇₅/FEF₈₅	Fluxo expiratório forçado a 50, 75 ou 85% da CVF
FEF₂₅₋₇₅	Fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF
FiO₂	Fração inspirada de oxigênio
G	Gramas
GM-CSF	<i>Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i> – Fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos
HSL	Hospital São Lucas
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon- γ
LTB	Lavado traqueobrônquico
LTB₄	Leukotrieno B ₄
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> – Proteína inflamatória de macrófagos
MEFP	Manobras expiratórias forçadas parciais
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> – Fator ativador de plaquetas

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG_s	Prostaglandinas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RN(s)	Recém-nascido(s)
Rpm	Rotações por minuto
SDR	Síndrome do desconforto respiratório
ST	Secreção traqueal
Th	<i>T-helper</i> – Linfócitos T auxiliares
TGF	<i>Transforming growth factor</i> – Fator de crescimento e transformação
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> - Fator de necrose tumoral- α
USA	<i>United States of América</i> – Estados Unidos da América
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VEF1 / FEV_{0,5}	Fluxo expiratório forçado em 1 ou 0,5 segundo
VM	Ventilação mecânica
VR	Volume residual

RESUMO

Objetivos: Analisar a resposta inflamatória pulmonar em recém-nascidos (RNs) prematuros em ventilação mecânica através da mensuração seriada do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina (IL) -10 no lavado traqueobrônquico (LTB), verificando a sua associação com fatores perinatais e com função pulmonar.

Pacientes e Métodos: prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 32 semanas, que necessitaram de ventilação mecânica nas primeiras 24 horas por insuficiência ventilatória foram selecionados para o estudo. Foram mensuradas as concentrações das interleucinas TNF- α e IL-10 no LTB coletado dentro das primeiras 24 a 48 horas de intubação endotraqueal pela técnica de ELISA. Amostras subsequentes foram colhidas nos dias 3, 5, 7, 10, 15 e 20 após intubação, naqueles RNs que permaneceram em ventilação mecânica por esse período. Os pacientes foram acompanhados no ambulatório de Pneumologia Pediátrica e foram realizados testes de função pulmonar após 40 semanas de idade corrigida.

Resultados: Foram obtidas 70 amostras seqüenciais de LTB de 25 prematuros incluídos no estudo. Níveis detectáveis de TNF- α foram observados em quarenta e sete amostras (67%) e de IL-10 em dezoito (26%). Não houve associação significativa dos níveis de TNF- α e IL-10 com idade gestacional, peso ao nascimento, doença da membrana hialina, tempo em ventilação mecânica, duração de suplementação de oxigênio e óbito. Nas amostras coletadas no dia 2, foi encontrada uma associação significativa entre a concentração de TNF- α e IL-10 e o tempo de ruptura das membranas amnióticas ($p = 0,002$, $r = 0,652$ e $p < 0,001$, $r = 0,57$, respectivamente). Em relação ao estudo da função pulmonar, houve uma associação negativa entre a concentração de TNF- α no dia 2 e o FEF₇₅ ($p = 0,03$ e $r = 0,7$).

Conclusões: TNF- α e IL-10 são detectáveis no LTB de prematuros em ventilação mecânica. Foi observada uma relação direta entre suas concentrações e o tempo de ruptura das membranas amnióticas. Houve uma correlação inversa significativa entre os níveis de TNF- α e o FEF₇₅ nos pacientes submetidos ao teste de função pulmonar.

Descritores: inflamação; interleucina-10; fator de necrose tumoral- α ; displasia broncopulmonar; função pulmonar; prematuridade.

ABSTRACT

Objective: to analyze pulmonary inflammatory response in preterm infants requiring artificial ventilation through serial measurements of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-10 in tracheobronchial lavage (TBL) and to investigate the association with perinatal factors and lung function.

Methods: preterm newborns under 32 weeks of age requiring artificial ventilation at birth were selected for the study. The concentrations of TNF- α and IL-10 were measured by ELISA in TBL samples within the first 48 hours of endotracheal intubation. Subsequent samples were collected on days 3, 5, 7, 10, 15 and 20 after intubation. Subjects were followed on outpatient clinic and pulmonary function tests were performed after 40 weeks of corrected age.

Results: twenty-five subjects were recruited. Seventy TBL samples were obtained. Detectable levels of TNF- α and IL-10 were observed in forty-seven (67%) and in eighteen samples (26%), respectively. There was no significant association between the TNF- α and IL-10 levels with gestational age, birth weight, hyaline membrane disease, length of time on the ventilator and on oxygen treatment and death. In the samples collected on day 2 there was a significant association between TNF- α and IL-10 levels and time of rupture of amniotic membranes ($p=0.002$, $r=0.652$ and $p<0.001$, $r=0.57$, respectively). There was also a significant negative association between the TNF- α concentration on day 2 and FEF75 ($p=0.03$ e $r=0.7$).

Conclusions: TNF- α and IL-10 are detectable in preterm infants TBL under artificial ventilation. There was a direct relation ship between interleukins concentration and the time of amniotic membrane rupture. There was a significant inverse correlation between the TNF- α levels and FEF75 in the patients evaluated by lung function test.

Key words: inflammation; interleukin-10; tumor necrosis factor- α ; newborn; bronchopulmonary dysplasia; lung function; prematurity.

PARTE I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Introdução

Nas últimas duas décadas, novos manejos terapêuticos têm resultado em um significativo aumento da sobrevivência de recém-nascidos (RNs) prematuros. O manejo perinatal como o uso de glicocorticóides às mães em trabalho de parto prematuro, combinado à administração de surfatante exógeno e a melhora das estratégias de ventilação assistida têm sido responsáveis pelo aumento das taxas de sobrevivência. Entretanto, estudos demonstram que a incidência de displasia broncopulmonar (DBP) tem se modificado pouco, apesar dos avanços nos cuidados perinatais.¹⁻⁴ Atualmente, a redução do risco de seqüelas pulmonares a longo prazo tornou-se um dos maiores desafios.⁵

1.2 Displasia broncopulmonar

A displasia broncopulmonar, também conhecida como doença pulmonar crônica (DPC) da infância, é a complicação respiratória mais comum em RNs

prematuros submetidos à ventilação assistida.^{1, 6-11} Alguns desses pacientes apresentam doença pulmonar grave, necessitando ventilação mecânica e/ou suplementação de oxigênio por meses ou anos.¹² Estes pacientes são mais suscetíveis a doenças respiratórias durante a infância, como hiperresponsividade das vias aéreas e infecções respiratórias de repetição, com risco maior de hospitalizações nos primeiros dois anos de vida.¹²

Na descrição original de DBP em 1967, Northway e colaboradores descreveram a doença pulmonar crônica que ocorria em recém-nascidos prematuros com doença da membrana hialina grave, e que sobreviveram após tratamento com ventilação mecânica e oxigenoterapia.⁸ Esses autores avaliaram RNs que haviam necessitado de ventilação mecânica, com altos picos de pressão e elevadas concentrações de oxigênio inspirado.⁸ Os RNs estudados eram menos prematuros se comparados àqueles que hoje desenvolvem DBP. O dano pulmonar nestes pacientes foi atribuído principalmente ao barotrauma e à toxicidade ao oxigênio. O surfatante exógeno reduz claramente a gravidade da síndrome do desconforto respiratório (SDR) e, conseqüentemente, a necessidade de ventilação mecânica mais agressiva e a oxigenoterapia prolongada.⁶ Por essas razões, a introdução da terapia com surfatante foi recebida com muita expectativa, visando eliminar ou reduzir significativamente a incidência da DBP. No entanto, a incidência da DBP não tem se modificado.^{1,7,13,14} Existem várias explicações para este fato. Inicialmente, as novas técnicas de cuidados intensivos neonatais vêm proporcionando um aumento significativo da sobrevivência dos RNs extremamente prematuros, aqueles de alto risco para DBP e, além disso, houve uma mudança recente na patogênese e na apresentação da DBP.^{4,6,15} Enquanto a clássica DBP era

principalmente conseqüência do barotrauma e da toxicidade ao oxigênio, a DBP encontrada atualmente resulta da interação de vários fatores,⁶ incluindo, além da imaturidade pulmonar,¹⁶ a necessidade freqüente de ventilação mecânica imediata e prolongada em RNs com prematuridade extrema. Além disto, esses RNs desenvolvem freqüentemente sepse, e em muitos deles ocorre também a reabertura do canal arterial,⁷ que representa um fator de risco adicional significativo para este novo tipo de DBP.¹⁵ É importante ressaltar que a SDR grave é ainda um fator de risco importante para DBP, embora a maioria dos RNs que hoje desenvolvem esta doença são geralmente submetidos a um manejo ventilatório menos intenso, com concentrações relativamente baixas de oxigênio suplementar.^{3,7}

Os recém-nascidos imaturos apresentam riscos adicionais para danos pulmonares devido à imaturidade das junções celulares no pulmão e do sistema imunológico, à inadequada remoção de fluidos, à quantidade insuficiente de surfatante, a baixos níveis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase) e a baixas concentrações de fatores promotores de diferenciação e regeneração pulmonar, se comparados com os RNs a termo.¹⁷⁻²¹ Além disso, as alterações fisiológicas que ocorrem no sistema cardiovascular após o nascimento fazem com que os RNs pré-termo sejam precocemente expostos a fatores potencialmente prejudiciais aos seus pulmões estruturalmente imaturos. A necessidade de ventilação mecânica aumenta sobremaneira o risco de danos pulmonares oxidativos através de radicais livres de oxigênio. Estudos em animais já demonstraram que a exposição ao oxigênio pode induzir a uma redução da formação e do desenvolvimento dos alvéolos provocando uma série de alterações histopatológicas.²²

Antes do tratamento com surfatante, a fibrose do parênquima pulmonar era o principal achado histológico em pulmões de pacientes que não sobreviviam à DBP. Mais recentemente, têm-se observado menos fibrose e presença de alvéolos maiores e em menor quantidade, indicando uma modificação na septação alveolar normal.²³ Juntamente com isso, observa-se uma diminuição na microvasculatura pulmonar.⁶ O uso de ventilação mecânica e de oxigênio podem interferir com o desenvolvimento alveolar e vascular em animais prematuros.^{22,24} Coalson demonstrou que 7 dias de ventilação mecânica em babuínos prematuros (140 dias de idade gestacional), com 100% de oxigênio, reduz significativamente o número de alvéolos.²⁵ A mesma interferência com a septação alveolar, em babuínos ainda mais prematuros (125 dias de idade gestacional), ocorreu após tratamento com surfatante e ventilação, sem exposição a altas concentrações de oxigênio suplementar.²⁴ A diminuição na área de superfície está associada a uma microvasculatura pulmonar reduzida e dismórfica. Essas mudanças anatômicas também estão associadas com um aumento persistente de leucócitos e dos níveis de citocinas nas vias aéreas.¹² Em um estudo com modelos animais, observou-se que a expressão acentuada de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α também pode interferir com a alveolarização, sugerindo que o envolvimento com citocinas pró-inflamatórias nos espaços alveolares de RNs prematuros pode contribuir para uma septação alterada.²⁶

A incidência de DBP, definida como necessidade de oxigenoterapia com 36 semanas de idade pós-concepcional,²⁷ é de cerca de 30% para RNs com peso de nascimento inferior a 1.000 gramas,²⁸ sendo infreqüente em RNs com peso de nascimento acima de 1.200 gramas ou idade gestacional superior a 30 semanas.¹² A

etiologia da DBP é multifatorial e a inflamação pulmonar contribui significativamente para o seu desenvolvimento.^{8,29-31} O uso continuado de ventilação mecânica em RNs com peso de nascimento inferior a 1.250 gramas continua sendo um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de DBP.

Há evidências de que o processo inflamatório pulmonar desempenha um papel importante na patogênese da DBP.^{7,17,32} A inflamação pode ser desencadeada por diversos fatores, incluindo ventilação mecânica, aumento do fluxo pulmonar devido à patência do canal arterial e infecção pulmonar ou sistêmica adquiridas antes ou após o nascimento.⁷ A via final comum para muitos desses insultos é uma resposta inflamatória aguda e persistente na via aérea.⁴ O processo pode iniciar-se antes mesmo do nascimento, através da exposição intra-uterina a citocinas inflamatórias liberadas devido a infecções maternas ou à ruptura prolongada de membranas.^{4, 33} Existem relatos de que a exposição intra-uterina a citocinas, como consequência de uma infecção ascendente, induz inflamação na via aérea que desencadeia a seqüência de dano pulmonar após o nascimento.⁴ Watterberg et al.³⁴ mostraram níveis elevados de citocinas no aspirado traqueal de RNs prematuros nascidos de mães com corioamnionite e níveis bastante altos foram relacionados com alto risco de desenvolvimento de DBP.

2.8 Mecanismo Inflamatório pulmonar

A capacidade do sistema imune nos alvéolos é deficiente em muitos aspectos em RNs a termo e, principalmente, nos prematuros. Há uma atividade fagocitária diminuída (dos leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos), há reduzida imunidade humoral (baixos níveis de imunoglobulinas, exceto por níveis normais de IgG em recém-nascidos a termo), há baixas concentrações e diminuição dos receptores de complemento e possíveis defeitos na imunorregulação, aumentando o risco de dano pulmonar a partir de uma variedade de estímulos exógenos.³⁵

Durante a fase aguda do dano pulmonar, estímulos diretos ou indiretos (pneumonia/seps, barotrauma, hipóxia ou hiperóxia) iniciam uma resposta inflamatória, levando à inflamação pulmonar. Citocinas e outros mediadores inflamatórios têm um importante papel na regulação e na manutenção dessa resposta. A liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6), quimiocinas (IL-8, MIP-2), mediadores lipídicos (LTB₄, PAF, PG_s), fator de plaquetas 4 e várias células pulmonares locais (ex.: células epiteliais da via aérea, células endoteliais), bem como a ativação do complemento (C3a, C5a), causam mudanças na permeabilidade vascular,^{17,35,36} levando à saída de proteínas a partir do plasma e ao aumento da expressão de adesão molecular pelas células endoteliais com subsequente movimento de leucócitos a partir do compartimento vascular pulmonar para o interstício e para o espaço alveolar. Nas primeiras horas, os macrófagos são o tipo celular predominante nos alvéolos, seguidos por infiltração de

neutrófilos (6 a 12 horas), de linfócitos e de monócitos (24 a 48 horas).³⁶ A diapedese dos neutrófilos desde às vênulas até o tecido pulmonar se dá em diferentes fases, em cada uma das quais estão implicadas diferentes moléculas de adesão intercelular.²¹ O contato direto célula a célula entre macrófagos e monócitos estimulados, linfócitos T e outras células levam à produção de citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores inflamatórios, resultando em um ciclo que pode se perpetuar.³⁶

Mecanismos de “*feedback*” entre células inflamatórias e seus mediadores são de vital importância na resolução da inflamação pulmonar. A supressão da atividade pró-inflamatória dos neutrófilos, macrófagos, linfócitos e seus respectivos mediadores inflamatórios é estabelecida por citocinas antiinflamatórias, dentre elas a IL-10,^{20,37} levando a um processo de reparo tecidual.²⁰ Contudo, se o ciclo agudo se perpetua com acúmulo de células inflamatórias e produção de mediadores, o mesmo processo pode levar à lesão pulmonar irreversível.^{20,38} Uma infiltração de células inflamatórias, predominantemente macrófagos alveolares e linfócitos, a proliferação de fibroblastos e alterações no metabolismo do colágeno são achados patológicos na inflamação pulmonar crônica.^{20,38} Inicialmente, o aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias e de outros mediadores inflamatórios também estão presentes neste estágio e^{20,39} este período usualmente resulta em dano tecidual pulmonar extenso, com um prejuízo longo e duradouro na arquitetura e no desenvolvimento funcional dos pulmões. Uma representação do dano pulmonar e da cascata inflamatória em RNs está representada na Figura 1.

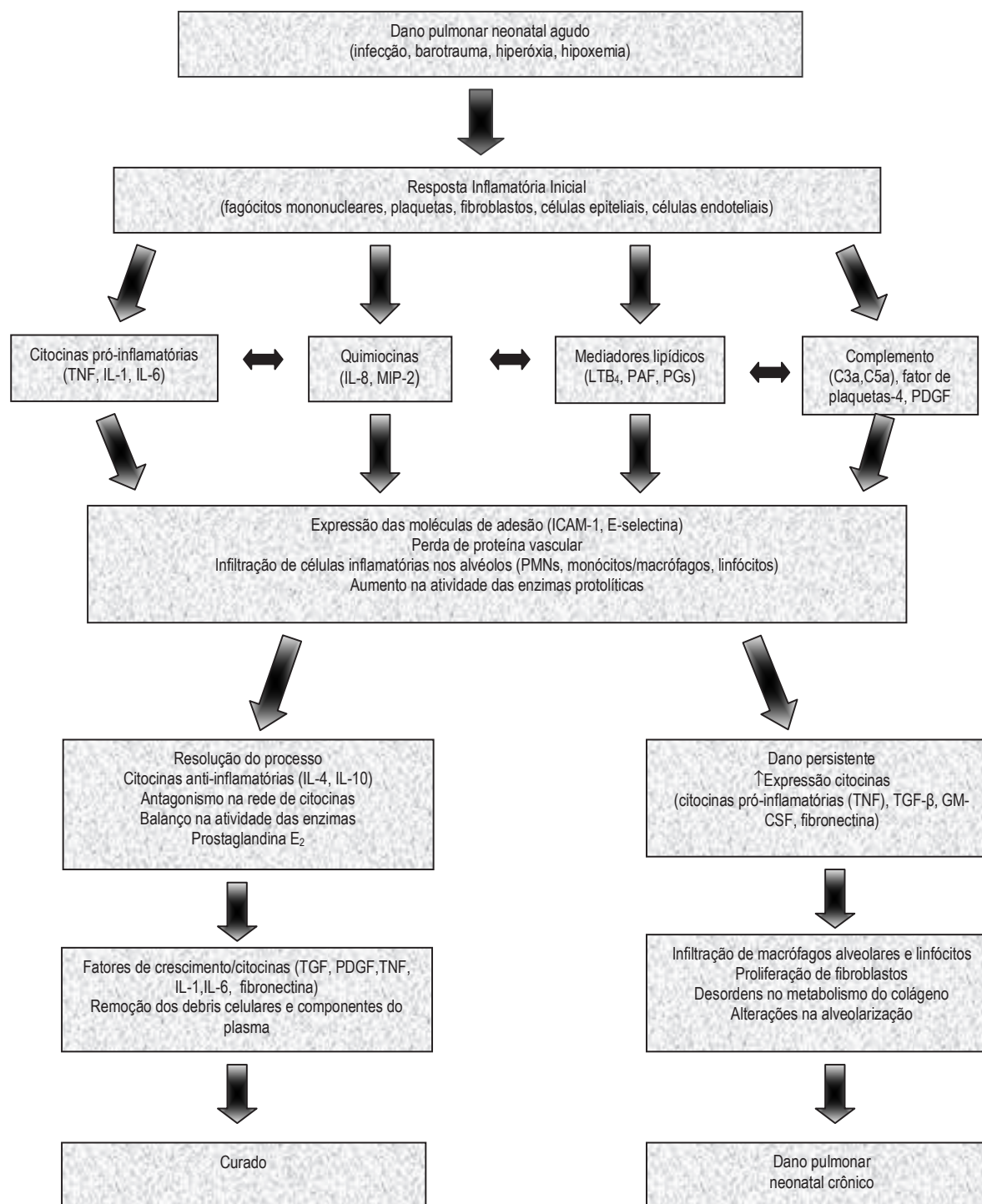


Figura 1- Sumário do dano pulmonar neonatal. GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos; ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; IL: interleucina; LTB₄: leucotrieno B₄; MIP-2: proteína inflamatória de macrófagos-2; PAF: fator ativador de plaquetas; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; PMNs: leucócitos polimorfonucleares; PGs: prostaglandinas; TGF: fator de crescimento e transformação; TFN: fator de necrose tumoral. (Adaptado de Özdemir et al., 1997.²⁰)

O papel das citocinas na inflamação e no dano tecidual tem importância tanto na fase aguda como na fase de resolução. Mecanismos de *feedback* e secreção controlada de citocinas são de vital importância para determinar a resolução do processo. Citocinas pró-inflamatórias da fase aguda (TNF, IL-1, IL-6) podem amplificar a resposta inflamatória,^{20,39} e esta ação pode modificar a matriz genética das células teciduais locais estimulando o recrutamento e proliferação dos fibroblastos, alterando a síntese do colágeno e levando à subsequente fibrose tecidual.

Há um equilíbrio dinâmico e de troca entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no sistema imune humano. A regulação da inflamação por essas citocinas e inibidores da citocinas é complicado pelo fato de que o sistema imune tem vias redundantes com múltiplos elementos que têm efeitos fisiopatológicos similares. Além disso, com exceção do antagonista receptor IL-1, todas as citocinas antiinflamatórias tem alguma propriedade pró-inflamatória.²⁰

Na última década, o conhecimento sobre inflamação e resposta celular imune tem aumentado pela identificação e caracterização desses peptídeos regulatórios intercelulares de baixo peso molecular, chamados de citocinas.

2.8 Citocinas

Citocinas são usualmente proteínas sinalizadoras extracelulares.⁴⁰ São produzidas por diferentes tipos de células e envolvidas em interações célula-célula,

agindo através de receptores específicos localizados na superfície das células-alvo. Como um grupo, estas proteínas têm como função primária modificar o comportamento das células adjacentes induzindo crescimento, diferenciação, quimiotaxia, ativação e/ou aumento da citotoxicidade das células de vários tecidos.^{40,41} As citocinas distinguem-se dos hormônios clássicos porque não são produzidas por um tecido glandular especializado, mas por células infiltrantes ou residentes em muitos tecidos distintos, e também porque agem geralmente nos locais onde são produzidas, não necessitando passar pela corrente sanguínea para exercer seus efeitos.⁴²

Atualmente, mais de 50 citocinas têm sido descritas, e a maioria delas está envolvida com o processo inflamatório, de dano e reparo tecidual. Estes peptídeos imunorreguladores são liberados principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos T, e também por vários outros tipos celulares (linfócitos B, células “*natural killer*”, mastócitos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, eosinófilos etc.) em resposta a endotoxinas, dano celular, hipóxia ou hiperóxia.²⁰

Contudo, as citocinas podem também ser secretadas por outros tecidos, destacando-se a epiderme, a hipófise, o estroma da medula óssea e as células do sistema nervoso central.⁴² Geralmente, sua produção é transitória e seu raio de ação limitado. Seus efeitos iniciam após contato com receptores específicos de alta afinidade geralmente situados na membrana celular, causando alterações de comportamento e na expressão genética das células alvo.^{20,39} Como os receptores são de alta afinidade, as quantidades de citocinas necessárias para estimulá-los são muito pequenas.⁴²

A função mais importante das citocinas parece ser a comunicação intercelular na rede local através da modulação das células adjacentes. Em algumas situações elas podem afetar células em tecidos distantes. Outra característica é sua habilidade em regular a sua própria síntese (ex: IL-1 induz a produção de TNF e vice-versa; IL-4 e IL-6 inibem a produção de TNF ou IL-1). Elas também têm ações modulatórias na expressão dos receptores, sendo estas estimulatórias (IFN- γ aumenta a expressão do receptor de TNF) ou inibitórias (IL-1 diminui a expressão do receptor de TNF). Além disso, antagonistas dos receptores podem bloquear ou reduzir o efeito da mesma citocina (ex.: IL-1RA conhecido como antagonista do receptor de IL-1).^{20,37} O efeito de qualquer citocina é dependente do tempo da liberação da mesma, do local onde ela age, da presença de elementos sinergistas ou competidores, da densidade dos receptores e da responsividade tissular para cada citocina.^{43,44} A definição funcional de uma citocina antiinflamatória é a habilidade da citocina em inibir a síntese de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral e outras citocinas pró-inflamatórias maiores.⁴⁴

O papel das citocinas e dos mediadores da resposta inflamatória pulmonar em RNs prematuros vem sendo estudado principalmente através de sua detecção em amostras de lavado traqueobrônquico.^{10,45,46} Um aumento de células inflamatórias e de várias citocinas têm sido descrito nas vias aéreas de RNs que desenvolvem DBP.⁴⁷ Dentre as citocinas mais estudadas, se destacam o TNF- α e a IL-10 por suas características pró e antiinflamatórias potentes, respectivamente.

1.5 TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T e células epiteliais, sendo que a principal fonte são os macrófagos. Sua liberação é bastante aumentada por outras citocinas como IL-1 e IFN- γ .⁴¹ Essa citocina foi inicialmente reconhecida por sua capacidade em induzir necrose hemorrágica em certos tumores⁴⁰ e sua importância para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e infecciosas tem sido estudada.^{48,49} O TNF- α está envolvido com o desencadeamento da resposta imune, indução do evento inflamatório agudo e transição para inflamação crônica e persistência da mesma.³⁷ Ele também contribui para a inibição da resposta inflamatória pela estimulação da liberação de IL-10.⁵ Por outro lado, a deficiência de produção de TNF- α em experimentos animais está associada à incapacidade de combater uma ampla gama de infecções.⁴²

O TNF- α é um potente mediador da resposta inflamatória pulmonar,^{50,51} promovendo, juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, a liberação de quimiocinas como a IL-8, que levam à infiltração de células imunes (principalmente neutrófilos e células mononucleares) para o interior do tecido pulmonar.^{5,21,39,41} Esse processo pode iniciar-se antes do nascimento pois existem evidências de que a exposição intra-uterina ao TNF- α induz a um processo inflamatório nas vias aéreas fetais, desencadeando uma seqüência de dano pulmonar que pode se continuar após o nascimento,⁴ levando à DBP.

Dentre os marcadores inflamatórios que têm sido encontrados em altas concentrações na secreção traqueobrônquica de RNs que desenvolvem DBP está o TNF- α .^{10,30,45,52,53} Jónsson et al.¹⁰ encontraram um aumento significativo das concentrações de TNF- α , entre outras interleucinas pró-inflamatórias, na secreção traqueobrônquica de RNs prematuros ventilados que desenvolveram DBP. As concentrações de TNF- α foram significativamente correlacionadas com a baixa idade gestacional (que poderia refletir uma exagerada resposta tecidual em pulmões mais imaturos), com a duração da suplementação de oxigênio e com o tempo de ventilação mecânica. A associação entre a produção de TNF- α e a duração da suplementação de oxigênio também foi encontrada em outro estudo.⁵⁰

Como visto anteriormente, estudos em RNs prematuros têm demonstrado que a elevação de TNF- α em secreção traqueobrônquica pode estar associada ao desenvolvimento de DBP.

1.6 IL-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma das citocinas com características antiinflamatórias mais destacadas do sistema imune humano. Ela inibe tanto a síntese de citocinas pró-inflamatórias maiores, incluindo o TNF- α , como também de outras citocinas pró-inflamatórias liberadas a partir de monócitos e macrófagos, como a IL-6, a IL-8, e a IL-12. Também inibe a produção de citocinas produzidas por neutrófilos e

células “*natural killer*” e atenua a expressão de superfície dos receptores de necrose tumoral na circulação sistêmica. Além disso, pode inibir várias atividades das células apresentadoras de antígenos.^{41, 44, 54, 55}

Esta interleucina é produzida por várias células do sistema de defesa, incluindo monócitos/macrófagos ativados, linfócitos CD4⁺ (ambos: Th tipo 1 e tipo 2), linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B. Os macrófagos e monócitos parecem a ser fonte predominante de síntese de IL-10 endógena em humanos.^{44, 55, 56} A sua produção é atenuada por IL-4, IL-1 β e interferon, e pode também ser regulada pela concentração de cálcio intracelular. Bloqueadores dos canais de cálcio aumentam a produção de IL-10 e diminuem os níveis de TNF- α em modelos com experimentais.⁴⁴

Estudos demonstram que níveis elevados de IL-10 no sangue estão associados à mortalidade por doença meningocócica^{57, 58} Por outro lado, níveis baixos de IL-10 no pulmão aumentam o risco de síndrome da angústia respiratória do adulto.⁵⁹ Em endotoxemia, um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode ser controlado pelo aumento da secreção de IL-10, e esta, administrada a ratos, oferece proteção para choque letal.^{60, 61} Como pode ser evidenciado por esses dados, diferentes respostas de IL-10 podem ter tanto um papel protetor em relação a infecções e danos teciduais ao hospedeiro, como podem torná-lo suscetível a respostas inflamatórias exacerbadas.

Em relação ao processo inflamatório pulmonar em RNs, existem poucos estudos analisando a produção de IL-10 em lavado tarqueobrônquico. Jones e colaboradores relataram que em condições de inflamação pulmonar, a citocina IL-10 não é detectável nas amostras de lavado broncoalveolar em RNs prematuros, enquanto que

precursores de IL-10 (e em alguns casos a própria IL-10) são detectados nos RNs a termo. Esses mesmos autores relatam ainda que esses resultados poderiam sugerir que RNs prematuros com inflamação pulmonar poderiam ser incapazes de ativar a produção de IL-10, se comparados a RNs a termo, e que a expressão do gene da IL-10 poderia ser regulada pelo grau de desenvolvimento pulmonar. A suscetibilidade dos RNs prematuros para DBP poderia, em parte, refletir uma inabilidade para regular o processo inflamatório através da não produção da citocina antiinflamatória IL-10.⁶² Oei e cols⁶³ estudaram 87 amostras de lavado broncoalveolar de RNs prematuros ventilados e também encontraram influência da idade gestacional com as concentrações de IL-10. Segundo esses autores, a citocina IL-10, se detectada, tende a ser mais elevada com o aumento da idade gestacional, podendo influenciar no desenvolvimento de DBP. Jónsson et al.¹¹ demonstraram concentrações irregulares de IL-10 em lavado traqueobrônquico de RNs que desenvolveram DBP, indicando pode haver um processo regulatório alterado na produção de citocinas antiinflamatórias, podendo desencadear um processo exagerado de fibroproliferação.

Por outro lado, McColm e colaboradores⁵ mensuraram a IL-10 em lavado broncoalveolar de RNs prematuros com idade gestacional abaixo de 29 semanas e encontraram, em 55,8% destes lavados, concentrações de IL-10 em quantidades comparáveis com àquelas encontradas anteriormente em RNs a termo e com doença respiratória submetidos à ventilação mecânica. Todos os sobreviventes do estudo que desenvolveram DBP haviam produzido IL-10. Além disto, Beresford e cols⁶⁴ relataram que a citocina IL-10 é detectável em lavado broncoalveolar de RNs prematuros ventilados e sua concentração aumenta significativamente após os primeiros cinco dias

de idade pós-natal. Comparando os RNs que desenvolveram DBP, as concentrações de IL-10 foram significativamente mais altas no primeiro dia naqueles pacientes que não desenvolveram DBP, mas mais baixas no dia 4 (de idade pós-natal). Por fim, Huang e cols.⁶⁵ demonstraram que a presença de DBP não estava associada à redução ou ausência de expressão de IL-10.

Em relação à administração de surfatante exógeno, este parece não influenciar no perfil de IL-10.⁶⁵ Entretanto, a administração de surfatante natural porcino parece diminuir a liberação de TNF- α a partir de monócitos humanos.⁶⁶

Estudos apontam para diferentes respostas de IL-10 em RNs prematuros com doença pulmonar, alguns sugerem que a prematuridade estaria relacionada à uma produção diminuída dessa interleucina predispondo ao desenvolvimento de DBP.

2 JUSTIFICATIVA

Vários fatores perinatais podem interferir no desenvolvimento pulmonar normal, podendo estes representar o início de uma seqüência de eventos que levará ao desenvolvimento de alterações estruturais pulmonares crônicas, com alterações histopatológicas características de displasia broncopulmonar. Nos últimos anos, novas modalidades terapêuticas têm resultado em significativo aumento na sobrevida dos RNs prematuros. Entretanto, a DBP permanece uma das mais importantes complicações da prematuridade, especialmente no primeiro ano de vida e em prematuros de extremo baixo peso.

Diversos estudos têm demonstrado que a síndrome do desconforto respiratório, a prematuridade, a ventilação mecânica e infecções, entre outros fatores, estão associados ao recrutamento de células inflamatórias nas vias aéreas. O desenvolvimento, a ativação e o recrutamento de células inflamatórias para os locais de dano tecidual podem ser regulados por diversos mediadores, incluindo citocinas. Tem sido demonstrado que a elevação de TNF- α em lavado traqueobrônquico de RNs prematuros

com doença pulmonar pode estar associada ao desenvolvimento de DBP. Por outro lado, alguns autores sugeriram que RNs prematuros com inflamação pulmonar podem ser incapazes de ativar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, tornando-os suscetíveis ao desenvolvimento de DPC. Mesmo com estas evidências, a influência dessas citocinas na patogênese da DBP permanece ainda pouco elucidada.

Assim, a análise da produção de citocinas, tais como TNF- α e IL-10, nas doenças pulmonares dos RNs prematuros submetidos à ventilação mecânica, e sua relação com os fatores perinatais e com o estudo da função pulmonar são importantes para um melhor entendimento da fisiopatogenia deste problema, com potenciais futuros avanços nas áreas de prevenção e tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- Analisar a resposta inflamatória pulmonar em RNs prematuros submetidos à ventilação mecânica, através da mensuração seriada de IL-10 e TNF- α no lavado traqueobrônquico.

3.2 Objetivos Secundários

- Descrever a positividade dessas interleucinas no lavado traqueobrônquico desses pacientes.
 - Verificar a existência da associação entre as mesmas e os fatores perinatais.
 - Correlacionar as suas concentrações com o estudo da função pulmonar.
-

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo de coorte, prospectivo.

4.2 Seleção da Amostra

Os pacientes foram recrutados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS. Foram selecionados para o estudo recém-nascidos (RNs) prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 32 semanas, nascidos no período de novembro de 2001 a novembro de 2002, que necessitaram de ventilação mecânica nas primeiras 24 horas de vida por insuficiência ventilatória.

Foram excluídos os RNs que apresentavam malformações incompatíveis com a vida e aqueles que necessitaram de ventilação mecânica por um período inferior a 24 horas.

Para a coleta de dados foi utilizado um protocolo previamente desenvolvido (Anexo 1). Os dados foram coletados através de revisão dos prontuários dos pacientes, entrevistas com as mães e telefonemas aos hospitais de origem (para aqueles pacientes nascidos fora do HSL). Os prontuários eram revisados diariamente pelo investigador principal para registro das intercorrências ocorridas durante a internação.

Para o acompanhamento ambulatorial utilizou-se a ficha de entrevista (Anexo 2), onde foram anotados dados relacionados a evolução clínica.

4.3 Variáveis do estudo

As seguintes variáveis foram consideradas: idade gestacional, peso de nascimento, relação entre o peso e idade gestacional, sexo, uso de corticoterapia antenatal, idade e raça materna, infecção materna, tempo de bolsa rota (horas), via de nascimento, doença da membrana hialina (DMH), pneumonia, DBP, uso de antibiótico, sepse, dias em suporte ventilatório e em oxigenoterapia, óbito, concentração de IL-10 e TNF- α e variáveis relacionadas ao teste de função pulmonar (medidas de fluxos e volumes pulmonares).

4.3.1 Operacionalização das variáveis

A idade gestacional dos recém-nascidos, de acordo com a rotina da UTI Neonatal, foi obtida através da data da última menstruação (DUM) ou ecografia obstétrica precoce e confirmada pela avaliação da maturidade do recém-nascido pelo método Ballard.⁶⁷ Se a avaliação pelo método Ballard coincide com a DUM, havendo uma variação inferior a 2 semanas, utiliza-se para estimativa da idade gestacional a data da última menstruação. Se a diferença entre esta avaliação e a obtida pela DUM é maior do que 2 semanas, utiliza-se a estimativa feita pelo método Ballard. Se a DUM é desconhecida, a idade gestacional é a obtida pelo método Ballard.

A relação entre peso e idade gestacional foi definida em três grupos, segundo as curvas de crescimento intra-uterino de Usher e McLean.⁶⁸ Foram considerados adequados para a idade gestacional (AIG) os recém-nascidos que se situassem dentro da faixa de dois desvios-padrão acima ou abaixo da média, grandes para idade gestacional (GIG) quando o peso se situasse acima dessa faixa e pequenos para idade gestacional (PIG) quando abaixo de dois desvios-padrão.

A infecção materna foi definida por sinais de corioamnionite, febre materna ou hemograma alterado, hemocultura positiva, infecção do trato urinário recente.

O diagnóstico de doença da membrana hialina (DMH) foi realizado pela equipe assistente através de critérios clínicos, radiológicos e, em alguns pacientes através de um teste demonstrando maturidade pulmonar.

Pneumonia e sepse neonatais foram também definidas pela equipe assistente de acordo com os achados clínicos, radiológicos e culturais.

Displasia broncopulmonar foi definida como a necessidade de oxigênio suplementar com 36 semanas de idade gestacional pós-concepcional e pela presença raio-x de tórax com alteração de parênquima pulmonar.²⁷

Idade e raça materna, uso de corticóide antenatal, tempo de bolsa rota (em horas), via de nascimento e sexo foram dados obtidos através de anotações na ficha de nascimento.

Uso de antibióticos, dias em suporte ventilatório e oxigenoterapia e óbito foram documentados através do registro médico em prontuário.

4.4 Coleta das amostras de lavado traqueobrônquico

O lavado traqueobrônquico (LTB) foi coletado dentro das primeiras 24 a 48 horas de intubação endotraqueal. As amostras foram coletadas durante a aspiração endotraqueal de rotina ou no momento em que a mesma era clinicamente indicada. Depois de instilado 0,5 mL de soro fisiológico no tubo endotraqueal, o respirador era conectado por duas ou três ventilações e, em seguida, era realizada a aspiração com sonda nº 6. A sonda era introduzida até ser encontrada resistência ao avanço da mesma. Após aspirado, o material era diretamente coletado em um frasco estéril. Após a aspiração, a sonda era lavada com 1 mL de solução fisiológica. Após a colheita da

amostra, esta era transportada imediatamente para o laboratório, acondicionada em gelo, para processamento do material. Amostras subsequentes foram colhidas nos dias 3, 5, 7, 10, 15 e 20 após intubação, naqueles RNs que permaneceram em ventilação mecânica por esse período. Em RNs que haviam recebido surfatante a amostra foi coletada pelo menos após 8 horas da sua administração.

4.5 Processamento da amostra

Após pesagem da amostra, o material era centrifugado a 2.000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante era separado e estocado em alíquotas de 110 μ L, a -80°C , para posterior mensuração das citocinas.

4.6 Mensuração das citocinas

As concentrações de IL-10 e TNF- α no sobrenadante das amostras de LTB foram realizadas através do método de ELISA, segundo instruções do fabricante (Pharmigen, USA), no laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

O limite inferior de detecção de IL-10 e TNF- α para este método foi de 7,8 pg/mL. Quando o nível de uma determinada amostra era indetectável, metade do limite inferior de detecção foi considerada para fins de análise estatística. O valor da citocina

mensurada foi sempre ajustado para o volume da amostra coletada do lavado traqueobrônquico.⁶⁹

4.7 Seguimento dos pacientes

Todos os pacientes foram acompanhados pelo investigador principal durante a internação na UTIN até a alta hospitalar. Posteriormente, os pacientes foram seguidos no ambulatório de Pneumologia Pediátrica e monitorizados em relação à presença de sintomas respiratórios (Anexo 2). Durante as consultas, era realizado um exame físico completo do aparelho respiratório pelo investigador principal. Sinais de dificuldade respiratória (taquipnéia, retrações torácicas, batimentos de asa do nariz, gemência e cianose) e ausculta pulmonar foram anotados.

Os radiogramas de tórax realizados durante a internação hospitalar e o acompanhamento ambulatorial foram interpretados por um radiologista do Hospital São Lucas da PUCRS, que não tinha conhecimento do diagnóstico respiratório inicial ou do desfecho clínico do paciente.

4.8 Realização dos Testes de Função Pulmonar pela Técnica da Compressão Torácica Rápida

4.8.1 Preparo do paciente

Quando o paciente atingisse peso superior a 3,5 kg, após 40 semanas de idade corrigida, eram realizados os testes de função pulmonar. O lactente era pesado em uma balança digital, a medida da saturação de hemoglobina era verificada com oxímetro de pulso. Após, os pacientes recebiam hidrato de cloral (50 a 80 mg/kg) por via oral, para indução da sedação, e eram encaminhados ao laboratório de função pulmonar para realização do exame. O comprimento era medido com um antropômetro. O paciente era colocado na mesa de exame em posição supina, e a jaqueta inflável era ajustada em volta do abdômen e do tórax, com pequena folga para não provocar qualquer restrição à inflação pulmonar. Durante todo o período de exame o lactente era monitorizado com oxímetro de pulso. Uma máscara facial transparente com bordas de silicone era delicadamente colocada sobre a face do lactente, cobrindo a boca e o nariz. A região cervical era mantida em ligeira hiperextensão.

O ambiente era mantido em silêncio, com redução da luminosidade e com temperatura entre 20 e 25°C. Materiais para reanimação estavam disponíveis e os lactentes eram alimentados até no máximo duas horas antes do exame.

4.8.2 Equipamento

O sistema de função pulmonar consiste basicamente de três sistemas:

- Aquisição e registro de sinais;
- Inflação pulmonar;
- Compressão torácica.

4.8.2.1 Sistema de aquisição e registro de dados

Compreende transdutores de pressão diferencial, amplificador, placa conversora analógica/digital e software.

A aquisição dos sinais de fluxo é feita através de um pneumotacógrafo de tela (Hans Ruudolph, model 3700, Kansas City, MO) conectado a um transdutor de pressão diferencial (-2 a +2 cmH₂O, Validyne, Northridge, Califórnia). O volume é obtido por integração do fluxo. A pressão na boca e na jaqueta são medidas com transdutores Validyne de pressão diferencial (0 a 60 cmH₂O e 0 a 150 cmH₂O respectivamente). Os sinais são amplificados (MC1-10, Validyne, Northridge, Califórnia), filtrados acima de 50Hz (Validyne CD 19-A) e enviados à placa conversora analógica digital (Data Translation DT3001, Malboro, MA). A amostragem é feita a 100 Hertz e os dados registrados em um banco de dados padrão ODBC (*Open DataBase Connectivity*).⁷⁰ O sistema de aquisição de sinais está esquematicamente representado na Figura 2.

O software foi desenvolvido no Laboratório de Função Pulmonar de Lactentes do Riley Hospital, Indianápolis, EUA. Este software processa e integra os sinais e apresenta, em tempo real, as curvas fluxo-volume.⁷⁰

Aquisição de Sinais

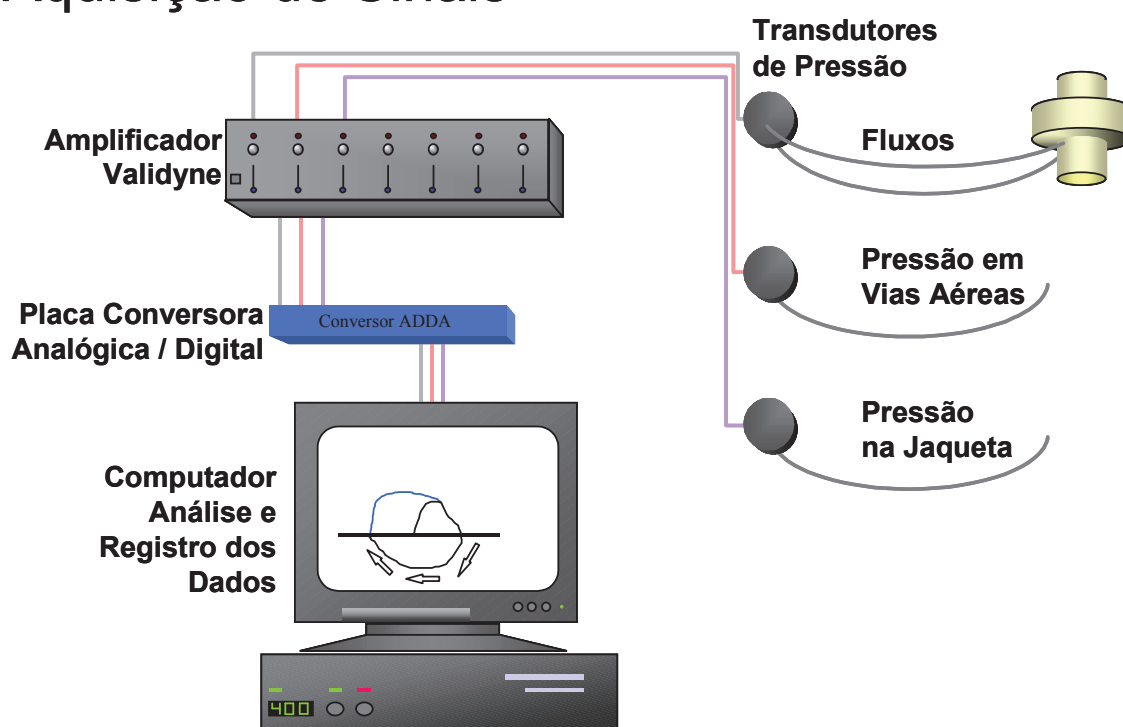


Figura 2-Sistema de Aquisição de Sinais e Registro. Pressão e fluxo são convertidos em sinais elétricos, amplificados e convertidos em informação digital. Os dados são adquiridos com uma taxa de amostragem de 100 Hz e arquivados em um banco de dados de padrão ODBC.

4.8.2.2 Sistema de Inflação Pulmonar

É o sistema que controla o fluxo, a pressão e o volume do ar inspirado através de um sistema de tubos e válvulas. O circuito usado para a Inflação Pulmonar consiste

de fonte de ar comprimido, tubos, controlador eletrônico de válvulas, fluxômetro e válvula de segurança que limita a pressão a 30 cmH₂O. O fluxômetro era regulado de acordo com o pico de fluxo inspiratório do lactente e geralmente ajustado entre 15 e 20 litros por minuto. As quatro válvulas, controladas pelo computador, direcionam o fluxo de ar. A oclusão da válvula expiratória resulta em inflação do sistema respiratório. Ao final da inflação (percebida pelo software por fluxo inspiratório próximo de zero e pressão = 30 cmH₂O), a válvula era aberta e o lactente expirava passivamente.⁷⁰ Geralmente, várias inflações pulmonares (3 a 10) são necessárias para inibir o estímulo ventilatório em lactentes e permitir que a expiração forçada seja feita sem interrupções.⁷¹ As várias insuflações induzem uma breve apnéia através de dois mecanismos: a) queda na pCO₂ pelo aumento da ventilação; b) relaxamento da musculatura respiratória pela indução do reflexo de Hering-Bauer. Esta indução de apnéia torna menos provável que ocorra um estímulo inspiratório durante a manobra de expiração forçada, o que interferiria nas medidas obtidas.⁷²

4.8.2.3 Sistema de Compressão Torácica Rápida (Jaqueta Inflável)

O sistema de compressão torácica regula a pressão aplicada no tórax e abdome do lactente. Consiste de uma fonte de ar comprimido, uma válvula reguladora de pressão, um reservatório de ar comprimido de 100 litros (capaz de suportar pressões de 150 cmH₂O), uma válvula controlada pelo computador, que conecta o reservatório de pressão à jaqueta, tubos e conexões apropriados e a jaqueta inflável. A pressão no

reservatório é ajustada manualmente antes de cada manobra. Após algumas inflações pulmonares, o técnico “autoriza” que, ao fim da próxima inflação, a pressão do reservatório seja transmitida à jaqueta através da abertura da válvula. A compressão torácica é iniciada, portanto, a um volume que equivale à pressão de 30 cmH₂O e mantida até o final da inspiração forçada (quando o fluxo expiratório aproxima-se de zero), quando a válvula é fechada e a jaqueta volta à pressão atmosférica encerrando a compressão torácica. A figura 3 apresenta os sistemas de inflação pulmonar e compressão torácica, ambos controlados pelo computador por meio de uma placa conversora digital-analógica, com resolução de 20 milisegundos.⁷⁰

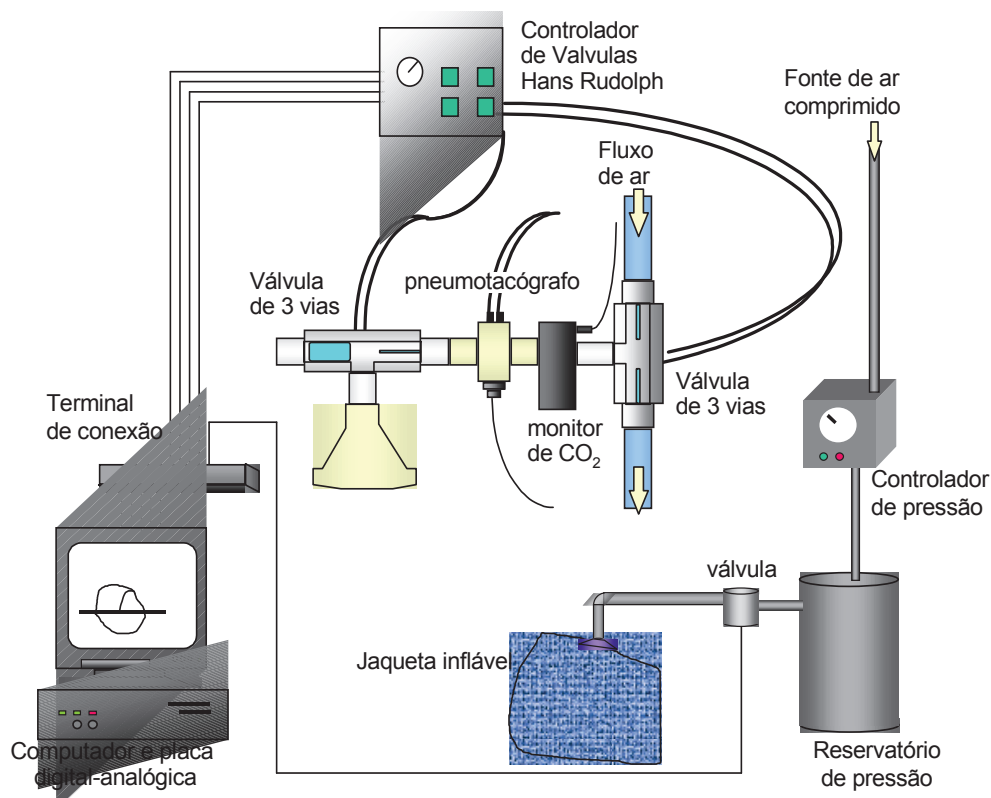


Figura 3- Sistema de Inflação Pulmonar e Compressão Torácica. O sistema de inflação é controlado por quatro válvulas e ativado ao fim de cada expiração. Como o sistema recebe continuamente dados de fluxo e pressão, o algoritmo de decisão é totalmente controlado pelo software, baseado em sinais que caracterizam o início e o final de cada ciclo ventilatório. Ao final de uma inflação pulmonar, o técnico “autoriza” o sistema a realizar uma compressão torácica, que persistirá até o fim da expiração, ou seja, até que o fluxo expiratório seja igual a zero.

4.8.3 Manobras Expiratórias Forçadas

As Manobras Expiratórias Forçadas eram realizadas com sucessivas inflações pulmonares, feitas antes da expiração forçada com objetivo de inibir o impulso inspiratório durante a manobra e conseqüente interrupção da curva fluxo-volume. A expiração forçada iniciava em um volume pulmonar próximo à Capacidade Pulmonar

Total, (pressão da via aérea = 30cm H₂O, V₃₀) e continuava até o volume residual (VR). As manobras expiratórias forçadas eram repetidas com incrementos de 5 a 10 cmH₂O na pressão da jaqueta, partindo de pressões baixas (40 a 50 cmH₂O) até obterem-se fluxos máximos. O teste era encerrado ao atingir limitação de fluxo.⁷⁰

Os critérios de fluxo máximo utilizados nesta pesquisa foram a obtenção de três curvas fluxo-volume visualmente idênticas com pressões de jaqueta que diferiam em pelo menos 10 cmH₂O. Entre as curvas tecnicamente aceitáveis, a curva com o mais alto produto entre CVF e Fluxo Médio-Expiratório Final (FM-EF) era escolhida como a melhor. Os critérios utilizados para considerar uma curva como tecnicamente aceitável foram os seguintes: a) elevação rápida do fluxo, atingindo o *peak-flow*; b) ausência de ruídos no sinal, especialmente na segunda metade da curva expiratória; c) término suave e sem inspiração durante a expiração forçada.⁷⁰

Ao final do teste, a criança era despertada e permanecia sob supervisão médica até que o grau de consciência fosse considerado normal.

4.8.4 Variáveis estudadas no Teste de Função Pulmonar

Os fluxos expiratórios forçados em 50, 75 e 85% representam o fluxo de ar instantâneo (calculado por interpolação linear) na respectiva fração da Capacidade Vital Forçada. O volume foi obtido por integração digital do fluxo e ambos eram apresentados na tela do computador em tempo real e guardados em arquivo de banco de dados para análise posterior.

Foram consideradas as seguintes variáveis:

- Capacidade Vital Forçada - CVF (mL): Volume total de ar expirado pela compressão torácica após inflação pulmonar com pressão de 30 cmH₂O.
- Volume Expiratório Forçado em 0,5 segundo – VEF_{0,5} (mL): Volume de ar expirado pela compressão torácica em 0,5 segundo.
- Fluxo Expiratório Forçado em 50% da Capacidade Vital – FEF₅₀ (mL/s): Fluxo instantâneo em 50% da CVF durante a expiração forçada.
- Fluxo Expiratório Forçado em 75% da Capacidade Vital – FEF₇₅ (mL/s): Fluxo instantâneo em 75% da CVF durante a expiração forçada.
- Fluxo Expiratório Forçado em 85% da Capacidade Vital – FEF₈₅ (mL/s): Fluxo instantâneo em 85% da CVF durante a expiração forçada.
- Fluxo Médio-Expiratório Forçado – FM-EF ou FEF₂₅₋₇₅ (mL/s): fluxo médio na porção central da expiração forçada, obtido pela razão entre o volume e o tempo entre 25 e 75% da CVF.

Os valores de referência da normalidade utilizados foram previamente descritos na literatura, obtidos a partir de 155 lactentes norte-americanos normais a termo.⁷³

4.9 Análise estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados especificamente programado, utilizando-se o programa Excel.

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão ou mediana e interquartil, conforme distribuição da variável. Os dados qualitativos foram apresentados através de percentuais. Foi utilizada a regressão linear múltipla com a finalidade de avaliar os fatores perinatais nos desfechos específicos de interesse no estudo (concentrações das citocinas e teste de função pulmonar). Os valores absolutos das variáveis de desfecho do teste de função pulmonar (fluxos e volumes pulmonares) foram transformados em escore Z. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$

4.10 Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS. Os pais foram sempre informados verbalmente e por escrito de todos os detalhes da pesquisa e assinaram um consentimento informado (Anexo 3), confirmando o conhecimento dos mesmos e consentindo com a participação no estudo. Nenhum dos pais abordados pelo investigador recusou participar do estudo.

Os pacientes não foram submetidos a nenhum risco adicional para coleta do lavado traqueobrônquico já que este foi realizado nos momentos em que havia indicação clínica para aspiração traqueal ou durante os procedimentos de rotina realizados pela enfermagem.

Em relação ao teste de função pulmonar, o método de compressão torácica tem sido utilizado em vários centros clínicos e de pesquisa do mundo, mesmo em prematuros.⁷⁴ A sedação com hidrato de cloral já é realizada para diversos outros procedimentos como ecocardiografia e tomografia computadorizada, sendo que as complicações decorrentes do seu uso não são comuns.⁷⁵

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fitzgerald DA, Mesiano G, Brosseau L, Davis GM. Pulmonary outcome in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2000;105(6):1209-15.
 2. De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 2001;160(8):457-63.
 3. Welty SE. Is Oxidant Stress in the Causal Pathway to Bronchopulmonary Dysplasia? *NeoReviews* 2000;1(1):6e-10.
 4. Lyon A. Chronic lung disease of prematurity. The role of intra-uterine infection. *Eur J Pediatr* 2000;159(11):798-802.
 5. McColm JR, Stenson BJ, Biermasz N, McIntosh N. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82(2):F156-9.
 6. Bancalari E, del Moral T. Bronchopulmonary dysplasia and surfactant. *Biol Neonate* 2001;80 Suppl 1:7-13.
 7. Bancalari E. Changes in the pathogenesis and prevention of chronic lung disease of prematurity. *Am J Perinatol* 2001;18(1):1-9.
 8. Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967;276(7):357-68.
 9. Northway WH, Jr. Bronchopulmonary dysplasia: twenty-five years later. *Pediatrics* 1992;89(5 Pt 1):969-73.
-

10. Jonsson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77(3):F198-201.
 11. Jonsson B, Li YH, Noack G, Brauner A, Tullus K. Downregulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infants with chronic lung disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000;89(11):1375-80.
 12. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(7):1723-9.
 13. Bagchi A, Viscardi RM, Taciak V, Ensor JE, McCrea KA, Hasday JD. Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in lung lavage of premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1994;36(2):244-52.
 14. Hennes HM, Lee MB, Rimm AA, Shapiro DL. Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome. Meta-analysis of clinical trials of single-dose surfactant extracts. *Am J Dis Child* 1991;145(1):102-4.
 15. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995;126(4):605-10.
 16. Stark AR. High-frequency oscillatory ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia-are we there yet? *N Engl J Med* 2002;347(9):682-4.
 17. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1995;19(6):371-8.
 18. Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994;93(5):712-8.
 19. Hudak BB, Egan EA. Impact of lung surfactant therapy on chronic lung diseases in premature infants. *Clin Perinatol* 1992;19(3):591-602.
 20. Ozdemir A, Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997;23(4):292-306.
-

21. Buron Martinez E, Blanco Quiros A, Garrote JA, Oyaguez P, Fernandez Calvo JL. [Cytokines and bronchopulmonary dysplasia]. *An Esp Pediatr* 1998;49(2):116-9.
 22. Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, et al. Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(3):945-58.
 23. Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie, II, Truog WE. Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics* 2000;106(6):1452-9.
 24. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(4):1333-46.
 25. Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(2):640-6.
 26. Jobe AJ. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 1999;46(6):641-3.
 27. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 1988;82(4):527-32.
 28. Stevenson DK, Wright LL, Lemons JA, Oh W, Korones SB, Papile LA, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(6 Pt 1):1632-9.
 29. Northway WH, Jr. Bronchopulmonary dysplasia: then and now. *Arch Dis Child* 1990;65(10 Spec No):1076-81.
 30. Tullus K, Noack GW, Burman LG, Nilsson R, Wretling B, Brauner A. Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 1996;155(2):112-6.
 31. Cassel GHC, D.T.; Cannup, K.C.; Association of *Ureaplasma urealyticum* infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. *Lancet* 1988;II:240-245.
 32. Auten RL, Ekekezie, II. Blocking leukocyte influx and function to prevent chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Pulmonol* 2003;35(5):335-41.
-

33. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):825-30.
 34. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996;97(2):210-5.
 35. Bellanti JA, Kadlec JV, Escobar-Gutierrez A. Cytokines and the immune response. *Pediatr Clin North Am* 1994;41(4):597-621.
 36. Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med* 1994;42(4):640-51.
 37. Burger D, Dayer JM. Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. *Neurology* 1995;45(6 Suppl 6):S39-43.
 38. Finkelstein JN, Horowitz S, Sinkin RA, Ryan RM. Cellular and molecular responses to lung injury in relation to induction of tissue repair and fibrosis. *Clin Perinatol* 1992;19(3):603-20.
 39. Gaudie J, Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* 1993;48(9):931-5.
 40. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(3):765-88.
 41. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54(9):825-57.
 42. Elsas PX. Citocinas Pró-inflamatórias na Medicina Fetal e Neonatal. In: MEDSI, editor. *Recentes Avanços em Neonatologia*. Dezembro ed: Clínica de Perinatologia; 2001.
 43. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16(5-6):457-99.
 44. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998;27(6):1497-507.
 45. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73(1):F1-3.
 46. McColm JR, McIntosh N. Interleukin-8 in bronchoalveolar lavage samples as predictor of chronic lung disease in premature infants. *Lancet* 1994;343(8899):729.
-

47. Bancalari E. Epidemiology and Risk Factors for the "New" Bronchopulmonary Dysplasia. *NeoReviews* 2000;1(1):2e-5.
 48. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328(2):106-13.
 49. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991;163(6):1177-84.
 50. Murch SH, MacDonald TT, Wood CB, Costeloe KL. Tumour necrosis factor in the bronchoalveolar secretions of infants with the respiratory distress syndrome and the effect of dexamethasone treatment. *Thorax* 1992;47(1):44-7.
 51. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1989;1(8647):1122-6.
 52. Deng H, Mason SN, Auten RL, Jr. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2316-23.
 53. Kotecha S, Chan B, Azam N, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;72(2):F90-6.
 54. Cassatella MA. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res* 1998;28(3):148-61.
 55. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209-20.
 56. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993;151(12):6853-61.
 57. Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun* 1995;63(6):2109-12.
 58. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal
-

- meningococcal disease. *Lancet* 1997;349(9046):170-3.
59. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996;125(3):191-6.
60. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994;343(8899):707-8.
61. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993;177(4):1205-8.
62. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996;39(6):966-75.
63. Oei J, Lui K, Wang H, Henry R. Decreased interleukin-10 in tracheal aspirates from preterm infants developing chronic lung disease. *Acta Paediatr* 2002;91(11):1194-9.
64. Beresford MW, Shaw NJ. Detectable IL-8 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 2002;52(6):973-8.
65. Huang HC, Yang MY, Huang CB, Yang KD. Profiles of inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants with respiratory distress disease. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33(1):19-24.
66. Speer CP, Gotze B, Curstedt T, Robertson B. Phagocytic functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf). *Pediatr Res* 1991;30(1):69-74.
67. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119(3):417-23.
68. Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 1969;74(6):901-10.
69. de Blic JM, F. Barbato, A. Clement, A. Dab, I. Eber, E. Green, C. Grigg, J. Kotecha,
-

- S. Kurland, G. Pohunek, P. Ratjen, F. Rossi, G. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. Eur Respir J 2000;15(1):217-31.
70. Jones M. Manobras Expiratórias Forçadas em Lactentes Normais: valores de referência [Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
71. Feher A, Castile R, Kisling J, Angelicchio C, Filbrun D, Flucke R, et al. Flow limitation in normal infants: a new method for forced expiratory maneuvers from raised lung volumes. J Appl Physiol 1996;80(6):2019-25.
72. The raised volume rapid thoracoabdominal compression technique. The Joint American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant Lung Function. Am J Respir Crit Care Med 2000;161(5):1760-2.
73. Jones M, Castile R, Davis S, Kisling J, Filbrun D, Flucke R, et al. Forced expiratory flows and volumes in infants - normative data and lung growth. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:353-359.
74. Hoo AF, Dezateux C, Henschen M, Costeloe K, Stocks J. Development of airway function in infancy after preterm delivery. J Pediatr 2002;141(5):652-8.
75. Pershad J, Palmisano P, Nichols M. Chloral hydrate: the good and the bad. Pediatr Emerg Care 1999;15(6):432-5.
-

PARTE II

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, avanços terapêuticos têm resultado em um significativo aumento da sobrevivência de recém-nascidos (RNs) prematuros. O uso de glicocorticóide materno perinatal em trabalho de parto prematuro, a administração de surfatante exógeno aos RNs e a melhora das estratégias de ventilação assistida têm sido responsáveis pelo aumento das taxas de sobrevivência.^{1,2} Entretanto, a incidência de doença pulmonar crônica (DPC) do prematuro tem se modificado pouco, apesar dos avanços nos cuidados perinatais.³ Desta forma, atualmente, a redução do risco de morbidade a longo prazo tornou-se um dos maiores desafios.⁴

A necessidade de ventilação mecânica ao nascimento nos RNs prematuros e o desenvolvimento de doença pulmonar crônica (DPC), também conhecida como displasia broncopulmonar (DBP), têm sido uma das maiores causas de morbidade nos primeiros anos de vida nesse grupo de pacientes.⁵⁻¹¹ Esses pacientes são mais susceptíveis a doenças respiratórias durante a infância, como hiperresponsividade

brônquica e infecções virais das vias aéreas inferiores, sendo freqüentemente hospitalizados nos primeiros anos de vida.^{12,13}

O papel da inflamação nas vias aéreas na doença pulmonar de RNs prematuros e no desenvolvimento de DPC têm sido amplamente estudado.¹⁴ O envolvimento de citocinas e mediadores da resposta inflamatória nas doenças respiratórias do RN prematuro tem sido descrito, principalmente em secreção traqueobrônquica.^{10,15,16} Há um equilíbrio dinâmico complexo entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sistema imune humano. O papel das interleucinas no desenvolvimento de doença pulmonar em RNs prematuros e DPC é ainda pouco conhecido.

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos T e células epiteliais. Estudos em RNs prematuros têm demonstrado que a elevação do TNF- α em secreção traqueal, entre outras citocinas pró-inflamatórias, pode estar associado ao desenvolvimento de DBP.¹⁷⁻¹⁹ Por outro lado, a interleucina (IL)-10 é uma das citocinas com características antiinflamatórias mais importantes do sistema imune, que poderia potencialmente exercer um papel importante na modulação da DBP do prematuro. Ela inibe tanto a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-8), como também inibe a produção de citocinas por neutrófilos e células “*natural killer*”. Ela é produzida por várias células do sistema imune, incluindo monócitos e macrófagos ativados, linfócitos T e B e células epiteliais do aparelho respiratório.^{20,21-23} Jones e et al. demonstraram que a IL-10 não é detectável nas amostras de lavado broncoalveolar em

RNs prematuros com doença pulmonar.²⁴ Por outro lado, outros estudos demonstraram que RNs prematuros com doença pulmonar produzem IL-10 nas vias aéreas.⁴

Assim, um melhor entendimento da resposta imune das vias aéreas dos RNs prematuros com doença pulmonar e sua associação com fatores perinatais pode resultar em novas estratégias de prevenção e de tratamento da DBP.²⁵

O objetivo do presente estudo é analisar a resposta inflamatória pulmonar em RNs prematuros em ventilação mecânica através da mensuração seriada de IL-10 e TNF- α no lavado traqueobrônquico (LTB), verificando se existe alguma associação dos níveis destas interleucinas com fatores perinatais ou função pulmonar mensurada posteriormente.

2 PACIENTES E MÉTODOS

2.1 Seleção da Amostra

Prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 32 semanas, nascidos no período de novembro de 2001 a novembro de 2002, que necessitaram de ventilação mecânica nas primeiras 24 horas de vida por insuficiência ventilatória, foram recrutados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital São Lucas da PUCRS.

Foram excluídos os RNs que apresentavam malformações incompatíveis com a vida e aqueles que necessitaram de ventilação mecânica por um período inferior a 24 horas.

Para a coleta de dados, foi utilizado um protocolo previamente desenvolvido (Anexo 1). Os dados foram coletados através de revisão dos prontuários dos pacientes e entrevistas com as mães. Os prontuários eram revisados diariamente pelo investigador principal para registro das intercorrências ocorridas durante a internação. As seguintes variáveis foram consideradas nesta etapa da coleta de dados: idade gestacional, peso de

nascimento, relação entre o peso e idade gestacional, sexo, corticoterapia antenatal, idade e raça materna, infecção materna, tempo de bolsa rota (horas), via de nascimento, doença da membrana hialina (DMH), pneumonia, DBP, uso de antibiótico, sepse, dias em suporte ventilatório e em oxigenoterapia, óbito, concentração de IL-10 e TNF- α e variáveis relacionadas ao teste de função pulmonar (medidas de fluxos e volumes pulmonares). Para o acompanhamento ambulatorial utilizou-se a ficha de entrevista (Anexo 2), onde foram anotados dados relacionados à evolução clínica.

A idade gestacional foi obtida através da data da última menstruação ou pela ecografia precoce e confirmada pela avaliação da maturidade do recém-nascido pelo método Ballard. A relação entre peso e idade gestacional foi definida em três grupos, segundo as curvas de crescimento intra-uterino de Usher e McLean.²⁶ Infecção materna foi definida por sinais de corioamnionite, febre materna ou hemograma alterado, hemocultura positiva, infecção do trato urinário recente. O diagnóstico de doença da membrana hialina (DMH) foi realizado pela equipe assistente através de critérios clínicos, radiológicos e, em alguns pacientes, através de um teste demonstrando maturidade pulmonar. Pneumonia e sepse neonatais foram também definidas pela equipe assistente de acordo com os achados clínicos, radiológicos e de exames de cultura. Doença pulmonar crônica foi definida como a necessidade de oxigênio suplementar com 36 semanas de idade gestacional pós-concepcional e radiograma de tórax com alterações.²⁷

2.2 Coleta das amostras de lavado traqueobrônquico

O LTB foi coletado dentro das primeiras 24 a 48 horas de intubação endotraqueal. As amostras foram coletadas durante a aspiração endotraqueal de rotina ou no momento em que a mesma era clinicamente indicada. Depois de instilado 0,5 mL de soro fisiológico no tubo endotraqueal, o respirador era conectado por duas ou três ventilações e, em seguida, era realizada aspiração com sonda nº 6. A sonda era introduzida até haver resistência ao avanço da mesma. Após aspirado, o material era diretamente coletado em um frasco estéril. Após a aspiração, a sonda era lavada com 1 mL de solução fisiológica. Após a colheita da amostra, esta era transportada imediatamente para o laboratório, acondicionada em gelo, para processamento do material. Amostras subsequentes foram colhidas nos dias 3, 5, 7, 10, 15 e 20 após intubação, naqueles RNs que permaneceram em ventilação mecânica por esse período. Em RNs que haviam recebido surfatante, a amostra foi coletada pelo menos após 8 horas da sua administração.

2.3 Processamento da amostra

Após pesagem da amostra, o material era centrifugado a 2.000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante era separado e armazenado em alíquotas de 110 µL a -80°C, para posterior mensuração das citocinas.

2.4 Mensuração das citocinas

As concentrações de TNF- α e IL-10 no sobrenadante das amostras de LTB foram realizadas através do método de ELISA, segundo instruções do fabricante (Pharmigen, USA), no laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O limite inferior de detecção de TNF- α e IL-10 para este método foi de 7,8 pg/mL. Quando o nível de uma determinada amostra era indetectável, metade do limite inferior de detecção foi considerada para fins de análise estatística. O valor da citocina mensurada foi sempre ajustado para o volume da amostra coletada do LTB.²⁸

2.5 Seguimento dos Pacientes

Todos os pacientes foram acompanhados pelo investigador principal durante a internação na UTIN até a alta hospitalar. Posteriormente, os pacientes foram seguidos no ambulatório de Pneumologia Pediátrica e monitorizados em relação à presença de sintomas respiratórios (Anexo 2). Durante as consultas, era realizado um exame físico completo do aparelho respiratório pelo investigador principal. Sinais de dificuldade respiratória (taquipnéia, retrações torácicas, batimentos de asa do nariz, gemência e cianose) e ausculta pulmonar foram anotados.

Os radiogramas de tórax realizados durante a internação hospitalar e o acompanhamento ambulatorial foram interpretados por um radiologista do Hospital São Lucas da PUCRS, que não tinha conhecimento do diagnóstico respiratório inicial ou do desfecho clínico do paciente.

2.6 Realização dos Testes de Função Pulmonar pela Técnica da Compressão Torácica Rápida

A função pulmonar foi avaliada através do método de compressão torácica rápida a partir de volumes elevados.²⁹ Após registro de peso e comprimento, os lactentes foram sedados com hidrato de cloral na dose de 50 a 80 mg/kg. Resumidamente, várias inflações pulmonares a uma pressão de 30 cmH₂O foram realizadas e, ao final, a expiração forçada foi iniciada pela compressão do tórax por uma jaqueta inflável colocada ao redor do tórax e abdômen. Portanto, a expiração inicia em um ponto próximo à capacidade pulmonar total e prossegue até o volume residual, reproduzindo uma espirometria. O volume foi obtido pela integração dos fluxos expiratórios, convertidos em escore Z pelas equações de regressão e variância previamente publicadas.²⁹ A partir de múltiplas curvas fluxo-volumes tecnicamente aceitáveis, obtidas com diferentes pressões de jaqueta (entre 4 a 12 curvas por paciente), a melhor curva fluxo-volume era selecionada como aquela com o maior produto de CVF e FEF²⁵⁻⁷⁵.

2.8 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão ou mediana e interquartil, conforme a distribuição da variável. Os dados qualitativos foram apresentados através de percentuais. Foi utilizada a regressão linear múltipla com a finalidade de avaliar os fatores perinatais nos desfechos específicos de interesse no estudo (concentrações das citocinas e teste de função pulmonar). Os valores absolutos das variáveis de desfecho do teste de função pulmonar (fluxos e volumes pulmonares) foram transformados em escore Z. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

2.8 Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS. Os pais foram sempre informados verbalmente e por escrito de todos os detalhes da pesquisa e assinaram um consentimento informado (Anexo 3). Nenhum dos pais abordados pelo investigador recusou participar do estudo.

Os pacientes não foram submetidos a nenhum risco adicional para coleta do LTB, já que esta foi realizada nos momentos em que havia indicação clínica para a mesma ou durante os procedimentos de rotina realizados pela enfermagem.

Em relação ao teste de função pulmonar, o método de compressão torácica tem sido utilizado em vários centros clínicos e de pesquisa do mundo, mesmo em prematuros.³⁰ A sedação com hidrato de cloral já é realizada para diversos outros procedimentos como ecocardiografia e tomografia computadorizada, sendo que as complicações decorrentes do seu uso não são comuns.³¹

3 RESULTADOS

3.1 Características da população em estudo

Trinta e três prematuros foram recrutados durante o período de novembro de 2001 a novembro de 2002. Não houve exclusão por malformação incompatível com a vida. Oito pacientes foram excluídos por necessitarem de menos de 24 horas de ventilação mecânica. Dos 25 pacientes incluídos no estudo, 5 (20%) haviam nascido em outros hospitais e foram transferidos ao Hospital São Lucas. Quatorze pacientes (56%) foram intubados e ventilados já em sala de parto. Os dados perinatais do grupo em estudo estão apresentados na Tabela 1 e as características clínicas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1 - Dados perinatais dos pacientes em estudo.

Dados	n=25
Idade materna (anos)	23 (19-29,2)
Sem consulta pré-natal	16%
Ruptura de membranas (horas) > 18 horas	20%
Corticóide pré-natal	56%
Infecção materna	40%
Pré-eclâmpsia	12%
Raça materna (branca)	44%
Nascimento Vaginal	60%
Peso de nascimento (gramas)	803 ± 197
Idade gestacional (semanas)	28 (25-28,2)
Sexo (masculino)	36%
Pequenos para idade gestacional	16%

Valores expressos em média ± desvio padrão ou mediana (interquartil) ou percentual (%)

Tabela 2 - Características clínicas da amostra.

Características	n=25
DMH	76%
Pneumonia congênita	4%
Sepse*	56%
Sepse**	40%
Pneumonia	12%
Persistência do canal arterial	56%
Hemorragia pulmonar	32%
Enfisema pulmonar	16%
Sífilis congênita	4%
Pneumotórax	20%
Hemorragia intraventricular	32%
Enterocolite necrotizante	4%
Suporte ventilatório: (dias)	
CPAP	2,0 (0-5)
Ventilação mecânica	5,0 (2-10,2)
Oxigênio suplementar (dias)	9 (6-28,8)
DBP	8%
Óbitos na UTIN	52%
Dias de internação	31 (7-61,2)

Valores expressos em mediana (interquartil) ou percentual (%)

*Sepse precoce: quadro clínico + alterações laboratoriais, sem hemocultura positiva

**Sepse tardia: quadro clínico + alterações laboratoriais, com hemocultura positiva

Quatorze pacientes foram a óbito durante o período do estudo, sendo que treze deles durante a internação na UTIN e um durante o período de seguimento ambulatorial. Todos os óbitos da UTIN estavam associados à presença de sepse, 2 com hemocultura positiva, 3 com hemorragia pulmonar e pneumotórax associados, 1 com hemorragia cerebral intra-parenquimatosa, 6 com persistência de canal arterial, 4 com insuficiência renal e 1 com pneumonia. Nenhum paciente recebeu alta hospitalar necessitando de oxigenoterapia. Entre os 11 sobreviventes, dois pacientes desenvolveram DBP.

3.2 Acompanhamento ambulatorial

Dos doze lactentes acompanhados, seis (54,5%) apresentaram sibilância durante os primeiros seis meses de vida. Um paciente apresentou apenas 1 episódio de sibilância, 2 pacientes apresentaram episódios de sibilância recorrente e 3 pacientes apresentaram sibilância persistente. Destes, três necessitaram hospitalizações nos primeiros seis meses de vida, para tratamento das exacerbações respiratórias.

Um paciente faleceu durante o acompanhamento ambulatorial, no domicílio, com 6 meses de vida. Esse paciente apresentava sibilância persistente. A causa do óbito não foi determinada clinicamente.

3.3 Análise das citocinas

Foram obtidas setenta amostras seqüenciais de LTB dos 25 pacientes incluídos no estudo. Das 70 amostras coletadas, quarenta e sete (67%) foram positivas para TNF- α e dezoito (26%) para IL-10. A positividade das amostras em relação aos dias de coleta é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3- Positividade das interleucinas em relação aos dias da coleta

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Total
TNF- α	7	14	8	7	3	4	2	2	47
IL-10	2	4	5	2	1	2	1	1	18
Total	12	21	14	10	4	4	3	2	70

Não foi observado um padrão linear na produção de citocinas no LTB durante o período de colheita das amostras. As concentrações de IL-10 e TNF- α durante os dias de colheita de LTB são ilustradas nas Figuras 1 e 2.

Não houve associação significativa dos níveis de TNF- α e IL-10 com idade gestacional, peso de nascimento, DMH, tempo em ventilação mecânica, duração de suplementação de oxigênio e óbito dos pacientes. Entretanto, nas amostras coletadas no dia 2, foi encontrada uma associação significativa entre a concentração de TNF- α e IL-10 e o tempo de ruptura das membranas amnióticas ($p=0,002$, $r=0,652$ e $p<0,001$, $r=0,57$, respectivamente).

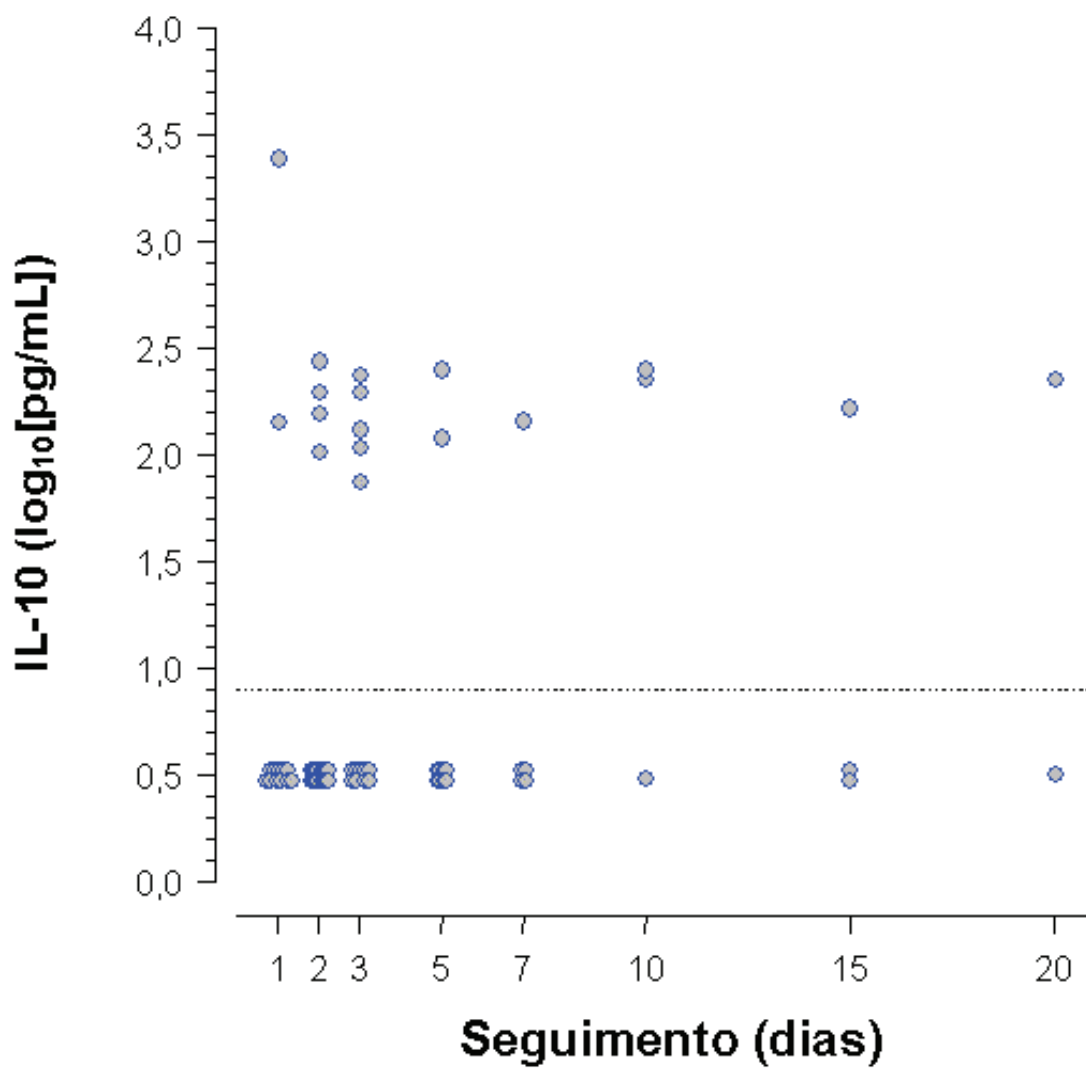


Figura 1- Concentrações de IL-10 (pg/mL) nos primeiros 20 dias de intubação dos pacientes estudados.

As amostras nas quais a IL-10 foi indetectável são representadas na metade do limite de detecção para esse método (3,9 pg/mL).

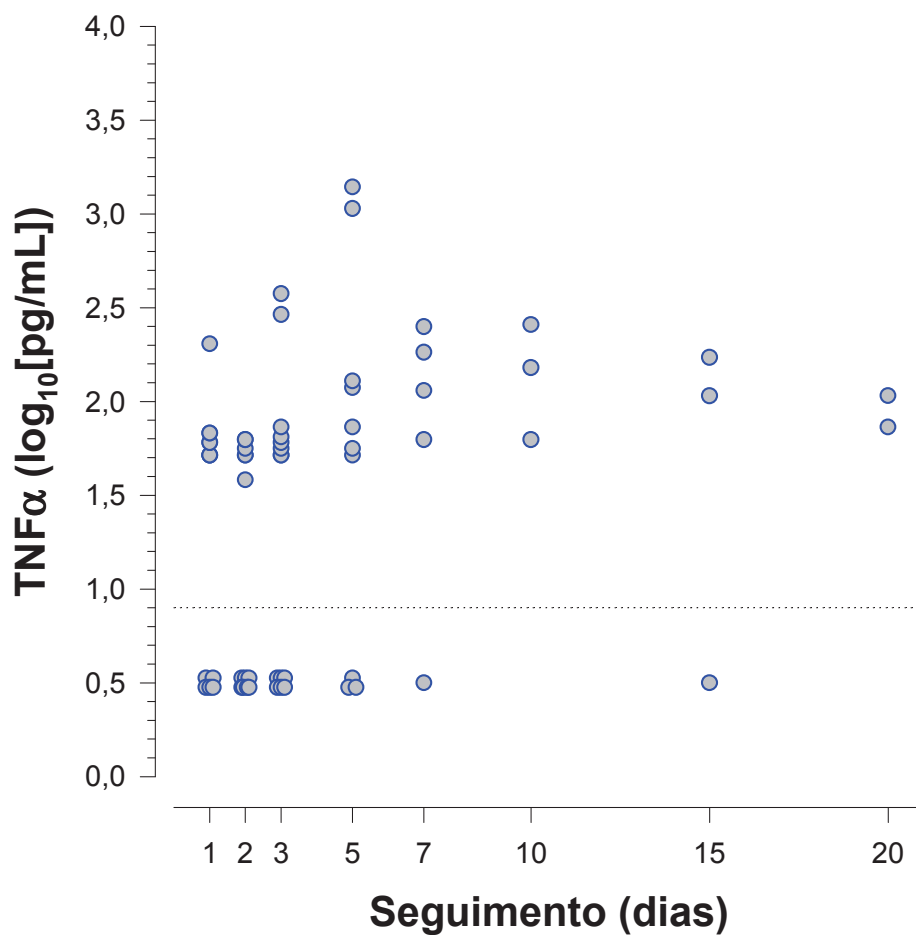


Figura 2- Concentrações de TNF- α (pg/mL) nos primeiros 20 dias de intubação dos pacientes estudados.

As amostras nas quais o TNF- α foi indetectável são demonstradas na metade do limite de detecção para esse método (3,9 pg/mL).

3.4 Estudo da função pulmonar

Dez pacientes realizaram o estudo de função pulmonar. Não houve intercorrências durante a realização dos exames. Não foram observadas reações adversas ao uso do hidrato de cloral.

As características dos pacientes no momento da realização do teste de função pulmonar e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 4. Os parâmetros testados através das Manobras Expiratórias Forçadas foram convertidos em escore Z pela seguinte fórmula: $Z = (\text{observado} - \text{previsto}) / \text{desvio padrão}$.

Tabela 4- Dados dos pacientes no momento do teste de função pulmonar e resultados:

Características (n = 10)	
Peso de nascimento (gramas)	997,0 ± 231
Idade gestacional (semanas)	27,8 ± 1,4
Sexo (masculino)	20%
Idade ao teste (semanas corrigidas)	11,3 ± 5,5
Peso ao teste (Kg)	4,7 ± 1,1
Comprimento (cm)	55,4 ± 4,4
CVF	0,182 ± 1,383
FEF ₅₀	-2,717 ± 1,454
FEF ₇₅	-2,184 ± 2,589
FEF ₈₅	-2,452 ± 3,057
FEF ₂₅₋₇₅	-2,945 ± 2,117
VEF _{0,5}	-0,947 ± 1,172

Valores apresentados em média ± desvio padrão, mediana (interquartil) ou percentual (%)

A figura 3 ilustra a mediana e os percentis 5, 25, 75 e 95 dos escores Z das variáveis de função pulmonar dos prematuros estudados.

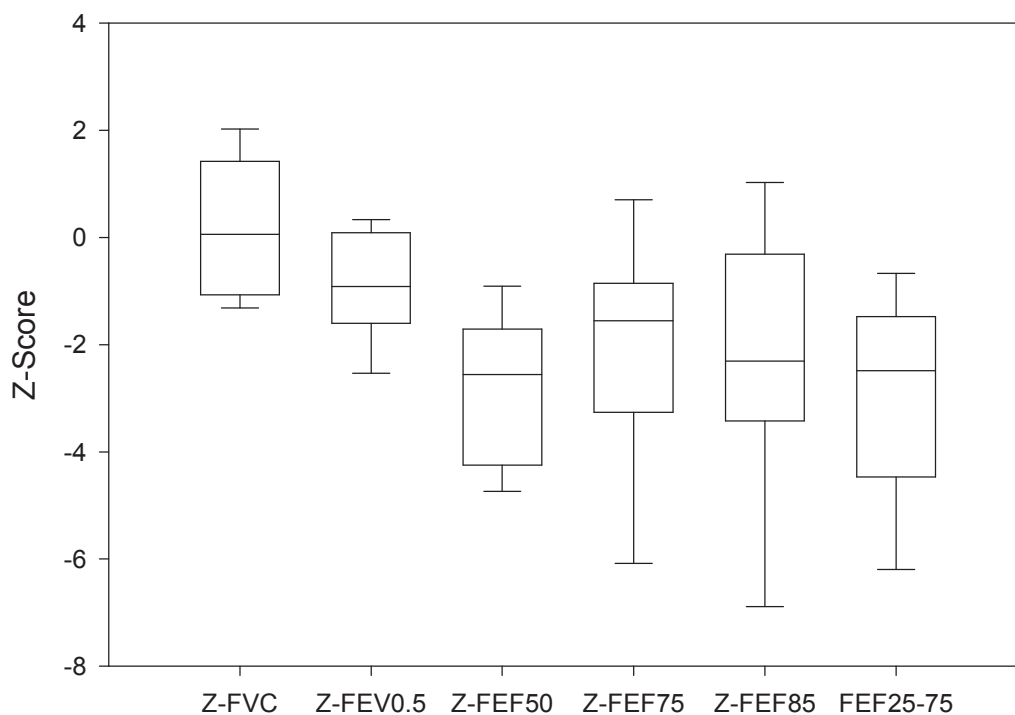


Figura 3- Escore Z das Variáveis do Teste de Função Pulmonar: mediana, percentis 5, 25, 75 e 95. * $p < 0,05$.

Foi encontrada uma associação inversa significativa entre FEF_{75} e a concentração de $TNF-\alpha$ no dia 2 pós-intubação ($p=0,03$ e $r=0,7$).

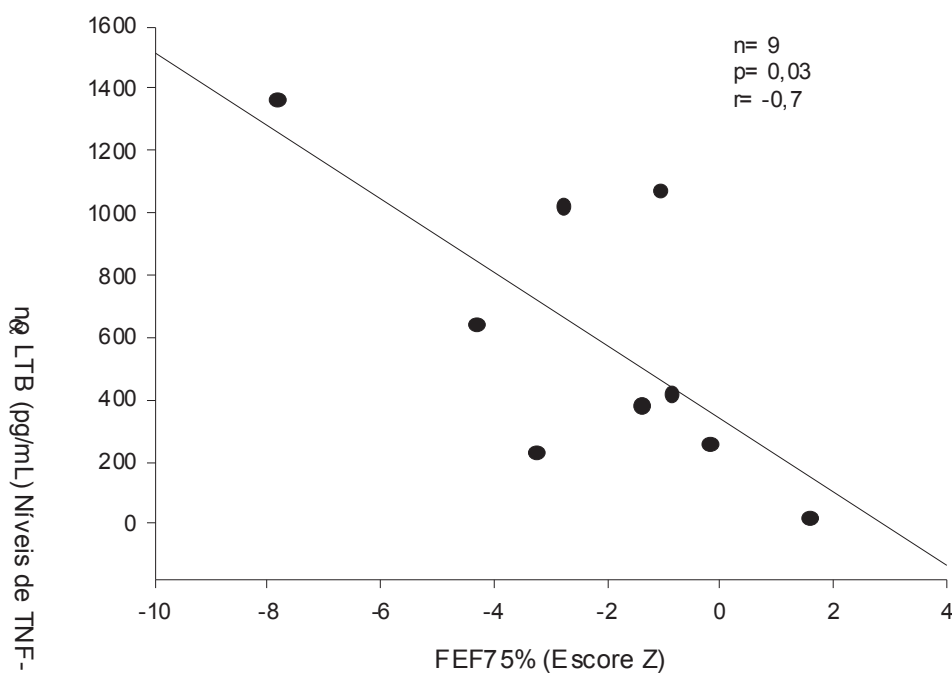


Figura 4- Correlação entre os níveis de TNF- α no LTB no segundo dia pós-intubação e FEF₇₅.

Não foi encontrada relação entre o número de dias de ventilação assistida, suplementação de oxigênio e as variáveis de função pulmonar nos pacientes testados. Um paciente não realizou o estudo da função pulmonar durante o acompanhamento por não comparecer nos dias agendados para o exame.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que concentrações de TNF- α e IL-10 são detectáveis no LTB de RNs prematuros entre 24 e 32 semanas de idade gestacional. O TNF- α foi detectado em 67% das amostras coletadas, enquanto a IL-10 em apenas 26%. Além disto, foi encontrada uma relação direta entre as concentrações de TNF- α e IL-10 e o tempo de ruptura das membranas amnióticas e uma associação negativa entre TNF- α e FEF₇₅, no segundo dia pós-intubação.

Neste estudo, foi utilizado o LTB como o método de análise da resposta inflamatória pulmonar dos RNs prematuros. Não existe um método padronizado para este fim, como o lavado broncoalveolar através da broncoscopia flexível em lactentes e crianças maiores, devido a limitações técnicas do tamanho do aparelho em RNs intubados. Entretanto, vários estudos têm adaptado métodos para RNs intubados, usando técnicas de lavado broncoalveolar não broncoscópicas.^{4,10,11,24,32-36} A utilização de marcadores para correção do fator dilucional, como IgA, uréia ou

albumina, não demonstrou ser um método confiável.^{11,37} Desta forma, até o momento, como um apropriado denominador de referência para corrigir os efeitos dilucionais do lavado não tem sido uniformemente aceito, calcular a concentração de citocinas a partir do volume de retorno do LTB (pg/ml) tem sido o método de escolha em pesquisas para análise de concentração de solutos em lavados broncoalveolares^{11,24,34}. O método de LTB não seletivo foi utilizado neste estudo porque, além de fazer parte da técnica de rotina utilizada pela enfermagem, é o método de escolha de vários estudos prévios.^{4, 10, 11, 24, 32-34, 36}

Uma infiltração de células inflamatórias e a presença de citocinas têm sido descritas nos pulmões de RNs prematuros com doença respiratória. Essa resposta inflamatória pode ser desencadeada por diversos fatores, incluindo ventilação mecânica, radicais livres de oxigênio, aumento do fluxo pulmonar devido a patência do canal arterial e infecção pulmonar ou sistêmica adquiridas antes ou após o nascimento.⁵ Existem dados convincentes de que a inflamação contribui para o dano pulmonar em recém-nascidos prematuros²⁴ e desempenha um papel importante na fisiopatogenia da DBP. Há evidências de que a DBP está associada com uma resposta inflamatória nos pulmões imaturos e com um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no LTB.¹¹

As citocinas TNF- α e IL-10 têm sido envolvidas na inflamação pulmonar de RNs prematuros submetidos à ventilação mecânica^{10,11,24,33,35,36}. No presente estudo, foram detectados TNF- α em 67% e IL-10 em 26% das amostras coletadas. Como não era objetivo deste estudo, o delineamento (não controlado) não nos permite concluir se

estas frequências são significativamente elevadas ou reduzidas. Uma das justificativas para a escolha deste delineamento é que existe uma contra-indicação absoluta, técnica e ética, de coletar secreção traqueobrônquica de RN normais sem doença pulmonar. Estudos em modelos animais e RNs prematuros ventilados encontraram elevados níveis de TNF- α na secreção traqueobrônquica.^{10,36,38,39} Por outro lado, uma deficiência na produção de IL-10 pode estar associada à doença pulmonar dos RNs prematuros.^{11,24,34} Assim, vários estudos prévios têm demonstrado que TNF- α e IL-10 parecem exercer um papel importante na fisiopatogenia da inflamação pulmonar neste grupo de pacientes.

Devido à amostra muito pequena, não foi possível analisar adequadamente a existência da associação entre DBP e os níveis de citocinas. Além disto, ao contrário de Jónsson et al.¹⁰, nós não encontramos relação entre as concentrações de TNF- α ou IL-10 e idade gestacional, duração da ventilação mecânica e tempo de oxigenoterapia.

Neste estudo, não foi possível determinar um padrão linear característico (crescente ou decrescente) de produção de TNF- α ou IL-10 no decorrer dos dias de ventilação mecânica, concordando com alguns estudos anteriores.^{4,11,24,32,34} Beresford et al.³³ relatou que as concentrações de IL-10 aumentam após os primeiros cinco dias de idade pós-natal. Tal achado não foi observado no presente estudo.

Em relação à ruptura de membranas amnióticas, foi demonstrada uma associação entre o tempo de ruptura das mesmas e o aumento do processo inflamatório nas vias aéreas nos RNs prematuros (aumento de TNF- α e IL-10 no LTB). A inflamação pulmonar pode iniciar-se antes mesmo do nascimento, através da exposição intrauterina

a citocinas inflamatórias liberadas devido a infecções maternas ou ruptura prolongada de membranas.^{3,40} O aumento do número de células inflamatórias no líquido amniótico é uma das características da ruptura prolongada de membranas amnióticas.⁴¹ Como resultado de infecção ou outros estímulos, o exudato inflamatório amniótico poderia banhar o pulmão dos fetos.^{41,42} Portanto, durante a ruptura prolongada de membranas, o pulmão fetal está exposto a células inflamatórias e seus mediadores.⁴¹ Assim, a exposição intra-uterina a citocinas, como consequência de uma inflamação ou infecção ascendente, poderia induzir trabalho de parto prematuro e inflamação nas vias aéreas, desencadeando doença pulmonar após o nascimento.³

Vários estudos demonstraram que a corioamnionite e a produção de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico ou no pulmão do RN prematuro está associada ao desenvolvimento de DBP.^{40, 43-45} Assim, pode se especular que o processo inflamatório intrauterino desencadeado por infecção pode ser um fator de risco para desenvolvimento de DBP.

Em relação à função pulmonar, foi encontrada uma associação negativa significativa entre a concentração de TNF- α no dia 2 pós-intubação e o FEF₇₅. Esses achados não foram descritos previamente. A incidência de morbidades respiratórias em crianças nascidas prematuramente já vem sendo estudada há algumas décadas^{46,47} e tem sido relacionada às doenças pulmonares e às terapias ventilatórias durante o período neonatal.⁴⁶⁻⁵³

Estudos demonstraram que a resposta inflamatória tem um papel fundamental na patogênese do dano pulmonar^{12,15, 43,54,55} e que a DPC está associada a um aumento

dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no LTB, dentre elas o TNF- α .¹¹ Dados recentes detectaram uma associação positiva entre ruptura prematura de membranas e redução de fluxos expiratórios em prematuros sem doença pulmonar significativa no período neonatal.⁵⁶ A resposta inflamatória intrauterina à infecção, através de citocinas, pode ter um importante papel na determinação de DBP em prematuros.⁴⁴ Van Marter⁵⁷ observou que a ventilação mecânica prolongada e infecção pós-natal interagem com infecção antenatal para o aumento de risco para DBP. Fluxos reduzidos nas vias aéreas podem ser secundários a uma redução do calibre destas devido à inflamação e espessamento da mucosa como também por um aumento de complacência do parênquima pulmonar e/ou das vias aéreas.

Este estudo não revelou uma relação estatisticamente significativa entre a idade gestacional, o peso de nascimento e a redução de fluxos expiratórios, talvez pela pequena quantidade de pacientes testados, embora alguns estudos realizados em idades mais avançadas tenham encontrado resultados sugestivos dessa associação.^{58,59} Igualmente não foi encontrada uma associação significativa entre tempo em ventilação mecânica ou oxigenoterapia e redução de fluxos expiratórios.

Com todos esses resultados, conclui-se que investigações futuras são necessárias para determinar o papel de várias citocinas na fisiopatogenia da DBP, auxiliando no desenvolvimento de alternativas terapêuticas e preventivas para reduzir a morbidade da doença pulmonar crônica dos RNs prematuros.

5 CONCLUSÕES

- Níveis detectáveis de TNF- α e IL-10 foram encontrados no lavado traqueobrônquico em 67% e 26% dos RNs prematuros submetidos à ventilação mecânica, respectivamente. Citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias estão presentes nas vias aéreas de RNs prematuros submetidos à ventilação mecânica.
 - Foi encontrada uma relação direta entre as concentrações de IL-10 e TNF- α no lavado traqueobrônquico e o tempo de ruptura das membranas amnióticas.
 - Houve uma correlação negativa significativa entre os níveis de TNF- α e o FEF₇₅ nos pacientes submetidos ao teste de função pulmonar.
-

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welty SE. Is Oxidant Stress in the Causal Pathway to Bronchopulmonary Dysplasia? *NeoReviews* 2000;1(1):6e-10.
 2. De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 2001;160(8):457-63.
 3. Lyon A. Chronic lung disease of prematurity. The role of intra-uterine infection. *Eur J Pediatr* 2000;159(11):798-802.
 4. McColm JR, Stenson BJ, Biermasz N, McIntosh N. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82(2):F156-9.
 5. Bancalari E. Changes in the pathogenesis and prevention of chronic lung disease of prematurity. *Am J Perinatol* 2001;18(1):1-9.
 6. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(7):1723-9.
 7. Fitzgerald DA, Mesiano G, Brosseau L, Davis GM. Pulmonary outcome in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2000;105(6):1209-15.
 8. Northway WH, Jr. An introduction to bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol* 1992;19(3):489-95.
 9. Northway WH, Jr. Bronchopulmonary dysplasia: twenty-five years later. *Pediatrics* 1992;89(5 Pt 1):969-73.
 10. Jonsson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung
-

disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77(3):F198-201.

11. Jonsson B, Li YH, Noack G, Brauner A, Tullus K. Downregulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infants with chronic lung disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000;89(11):1375-80.
12. Yoon BH, Romero R, Kim KS, Park JS, Ki SH, Kim BI, et al. A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(4):773-9.
13. Stark AR. High-frequency oscillatory ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia--are we there yet? *N Engl J Med* 2002;347(9):682-4.
14. Bancalari E. Epidemiology and Risk Factors for the "New" Bronchopulmonary Dysplasia. *NeoReviews* 2000;1(1):2e-5.
15. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73(1):F1-3.
16. McColm JR, McIntosh N. Interleukin-8 in bronchoalveolar lavage samples as predictor of chronic lung disease in premature infants. *Lancet* 1994;343(8899):729.
17. Deng H, Mason SN, Auten RL, Jr. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2316-23.
18. Kotecha S, Chan B, Azam N, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;72(2):F90-6.
19. Kotecha S. Cytokines in chronic lung disease of prematurity. *Eur J Pediatr* 1996;155 Suppl 2:S14-7.
20. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998;27(6):1497-507.
21. Cassatella MA. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res* 1998;28(3):148-61.
22. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54(9):825-57.
23. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209-20.
24. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to

- chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996;39(6):966-75.
25. Ozdemir A, Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997;23(4):292-306.
 26. Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 1969;74(6):901-10.
 27. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 1988;82(4):527-32.
 28. de Blic JM, F. Barbato, A. Clement, A. Dab, I. Eber, E. Green, C. Grigg, J. Kotecha, S. Kurland, G. Pohunek, P. Ratjen, F. Rossi, G. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J* 2000;15(1):217-31.
 29. Jones M, Castile R, Davis S, Kisling J, Filbrun D, Flucke R, et al. Forced expiratory flows and volumes in infants - normative data and lung growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:353-359.
 30. Hoo AF, Dezateux C, Henschen M, Costeloe K, Stocks J. Development of airway function in infancy after preterm delivery. *J Pediatr* 2002;141(5):652-8.
 31. Pershad J, Palmisano P, Nichols M. Chloral hydrate: the good and the bad. *Pediatr Emerg Care* 1999;15(6):432-5.
 32. Huang HC, Yang MY, Huang CB, Yang KD. Profiles of inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants with respiratory distress disease. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33(1):19-24.
 33. Beresford MW, Shaw NJ. Detectable IL-8 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 2002;52(6):973-8.
 34. Oei J, Lui K, Wang H, Henry R. Decreased interleukin-10 in tracheal aspirates from preterm infants developing chronic lung disease. *Acta Paediatr* 2002;91(11):1194-9.
 35. Murch SH, MacDonald TT, Wood CB, Costeloe KL. Tumour necrosis factor in the bronchoalveolar secretions of infants with the respiratory distress syndrome and the effect of dexamethasone treatment. *Thorax* 1992;47(1):44-7.
 36. Tullus K, Noack GW, Burman LG, Nilsson R, Wretling B, Brauner A. Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 1996;155(2):112-6.
 37. Bagchi A, Viscardi RM, Taciak V, Ensor JE, McCrea KA, Hasday JD. Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in lung lavage of
-

- premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1994;36(2):244-52.
38. Naik AS, Kallapur SG, Bachurski CJ, Jobe AH, Michna J, Kramer BW, et al. Effects of ventilation with different positive end-expiratory pressures on cytokine expression in the preterm lamb lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):494-8.
 39. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(4):1333-46.
 40. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):825-30.
 41. Grigg J, Arnon S, Silverman M. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage fluid from intubated babies. *Eur Respir J* 1992;5(6):727-32.
 42. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, et al. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988;12(4):262-79.
 43. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996;97(2):210-5.
 44. Curley AE, Sweet DG, Thornton CM, O'Hara MD, Chesshyre E, Pizzotti J, et al. Chorioamnionitis and increased neonatal lung lavage fluid matrix metalloproteinase-9 levels: implications for antenatal origins of chronic lung disease. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(4):871-5.
 45. Hitti J, Krohn MA, Patton DL, Tarczy-Hornoch P, Hillier SL, Cassen EM, et al. Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(1):50-6.
 46. McCormick MC, Shapiro S, Starfield BH. Rehospitalization in the first year of life for high-risk survivors. *Pediatrics* 1980;66(6):991-9.
 47. McLeod A, Ross P, Mitchell S, Tay D, Hunter L, Hall A, et al. Respiratory health in a total very low birthweight cohort and their classroom controls. *Arch Dis Child* 1996;74(3):188-94.
 48. Pelkonen AS, Hakulinen AL, Turpeinen M. Bronchial lability and responsiveness in school children born very preterm. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(4 Pt 1):1178-84.
-

49. Bertrand JM, Riley SP, Popkin J, Coates AL. The long-term pulmonary sequelae of prematurity: the role of familial airway hyperreactivity and the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1985;312(12):742-5.
 50. Chan KN, Elliman A, Bryan E, Silverman M. Respiratory symptoms in children of low birth weight. *Arch Dis Child* 1989;64(9):1294-304.
 51. Andreasson B, Lindroth M, Mortensson W, Svenningsen NW, Jonson B. Lung function eight years after neonatal ventilation. *Arch Dis Child* 1989;64(1):108-13.
 52. Hakulinen AL, Jarvenpaa AL, Turpeinen M, Sovijarvi A. Diffusing capacity of the lung in school-aged children born very preterm, with and without bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1996;21(6):353-60.
 53. Kitchen WH, Olinsky A, Doyle LW, Ford GW, Murton LJ, Slonim L, et al. Respiratory health and lung function in 8-year-old children of very low birth weight: a cohort study. *Pediatrics* 1992;89(6 Pt 2):1151-8.
 54. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1995;19(6):371-8.
 55. Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994;93(5):712-8.
 56. Friedrich L. Avaliação da Função Pulmonar em Prematuros Normais [Mestrado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do RS; 2003.
 57. Van Marter LJ, Dammann O, Allred EN, Leviton A, Pagano M, Moore M, et al. Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr* 2002;140(2):171-6.
 58. Mansell AL, Driscoll JM, James LS. Pulmonary follow-up of moderately low birth weight infants with and without respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1987;110(1):111-5.
 59. Galdes-Sebaldt M, Sheller JR, Groggaard J, Stahlman M. Prematurity is associated with abnormal airway function in childhood. *Pediatr Pulmonol* 1989;7(4):259-64.
-

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de registro de dados

Recém-Nascido:.....Sexo:.....Registro:.....

Mãe:.....Idade:.....Gesta:.....P:.....A:.....

Pai:.....Fone:.....

Endereço:.....

Pré-natal: nr.cons.(); exames:.....

Medicações utilizadas

()Pré-eclâmpsia; ()DMG; ()ITU; ()Fumo; ()Rupreme.....hs.

Uso de corticóide:nr. de doses.....; quando.....

Sinais de corioamnionite:()febre materna ()dor baixo ventre ()LA fétido

IGO:.....Eco:.....DUM.....

DN:.....às.....hs.

Parto:.....apresentação.....BR:.....LA:.....

Atend. sala de parto.....

PN:.....Apgar:.....IGP:.....()AIG ()GIG ()PIG

Diagnósticos na baixa:.....CRIB.....

Foi à ventilação:.....hs de vida, por.....

Uso de surfactante: 1ª dose:.....hs de vida; 2ªdose:.....hs de vida; 3ªdose:.....hs de vida.

Coletas de secreção traqueal:

1ª: data:.....horário:.....hs de vida:.....GA prévia:.....em VM:.....
parâmetros vent. na coleta:.....

2ª: data:.....horário:.....hs. de vida:.....GA prévia:.....em VM:.....
parâmetros vent. na coleta:.....

3ª: data:.....horário:.....hs de vida:.....GA prévia:.....em VM:.....
parâmetros vent. na coleta:.....

4ª: data:.....horário:.....hs de vida:.....GA prévia:.....em VM:.....
parâmetros vent. na coleta:.....

5ª: data:.....horário:.....hs. de vida:.....GA prévia.....em VM:.....

parâmetros vent. na coleta:.....

Dias em ventilação mecânica:

Dias em CPAP:

Dias em oxigenoterapia:

Complicações: Sepses:Clínica () () HMC positiva.....

Enterocolite necrotizante:.....

Pneumonia:.....

Persistência do canal arterial: Clínica () Ecocardiograma()

Hemorragia intra-ventricular:.....

Pneumotórax:.....Enfisema intersticial.....

Doença pulmonar crônica:.....

Alta

em:.....Peso:.....IGC.....

Óbito em:.....por:.....

Tempo de internação:.....dias.

ANEXO 2

Acompanhamento ambulatorial

Ficha de entrevista

1.Prontuário:

2.Data:

3.Idade:

4.Raça: ()caucasiana ()negra ()mista

5.Peso:

6.Sibilância: Primeiro episódio () Recorrente () Persistente ()

7.Tosse: ()sim ()não

8.Exame físico: FR____ Retrações () Cianose () Sibilos () Crepitações ()

Roncos () gemência () BAN ()

9.Medicamentos: Beta 2 () Ipratropium () Antibióticos () Corticóide oral () Cort.

Inalatório ()

10.Rx de tórax: Infiltrado peri-hilar () Hiperinsuflação () Atelectasia ()

Outros.....

11.Hist. familiar de asma/atopia: Mãe () Pai () Irmãos ()

12.Tabagismo domiciliar: Mãe () Pai () Outros ()

13.Saturação:

14.Necessidade de oxigênio: Sim () Não (), Se sim, quanto:

15.Intercorrências/Internações:

ANEXO 3**Termo de Consentimento Informado**

O seu bebê no momento está necessitando de um tipo de ajuda para respirar que chamamos de ventilação mecânica. Esse tipo de tratamento requer alguns cuidados, especialmente em bebês prematuros. Um dos cuidados é a aspiração frequente do tubo que leva o ar até o pulmão do bebê. Esta aspiração tem por objetivo retirar as secreções que ficam aderidas ao tubo. Quando essa secreção é retirada, ela é desprezada e jogada fora. O objetivo desse trabalho é analisar o material dessa secreção e após correlacionar estes achados com a função do pulmão e isto pode nos levar a identificar quais serão os bebês que terão doença pulmonar no futuro.

O meio que vamos usar para realizar este trabalho se dá através de um aspirado broncoalveolar, isto é, da colocação de soro fisiológico dentro do tubo endotraqueal e da sua aspiração logo a seguir. O material obtido será após analisado em laboratório.

O teste da função do pulmão será realizado após a alta hospitalar, por uma equipe médica treinada, e para o mesmo, será feita sedação com um remédio (hidrato de cloral) que faz com que a criança fique sonolenta e durma por aproximadamente 20 a 30 minutos. A sedação com hidrato de cloral é usada rotineiramente em procedimentos em crianças por ser bastante segura.

Sua participação nesse estudo não irá afetar o tratamento que seu filho faz e você pode desistir quando quiser. Os resultados são sigilosos e não haverá identificação das criança estudadas na publicação dos dados.

Eu, _____ (responsável) fui informado sobre os objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Estou ciente que caso existam danos a saúde de _____, ele terá direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo posso chamar o pesquisador responsável, Dra Andréa Lúcia Corso pelo telefone 3388.3719 ou Dr. Marcus Jones pelo telefone 3320.3000 ramal 2221.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Ass. do responsável pelo paciente _____ Nome ____/____/____
Data

Ass. do Pesquisador _____ Nome ____/____/____
Data

Este formulário foi lido para _____ (nome do responsável do paciente) em ____/____/____, pelo _____ (nome do pesquisador), enquanto eu estava presente.

Ass. da testemunha _____ Nome ____/____/____
Data

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE I - Dados dos pacientes - Parte 1

Paciente	Sexo	Raça Materna	Idade Materna	IG	Peso nasc (g)	IG/P	Tipo parto	Nasc.to. HSL	Pré-eclâmpsia	BR (hs)	Apgar 1'	Apgar 5'
2	F	NB	18	26	970	AIG	Vag	Sim	Não	1	6	8
3	F	B	20	29	1.060	AIG	Vag	Sim	Não	0	3	7
4	F	NB	14	28	1.250	AIG	Vag	Não	Não	0	3	5
5	F	NB	29	28	975	AIG	Ces	Sim	Não	0	7	8
6	M	NB	29	25	650	AIG	Vag	Não	Não	0	3	4
7	F	NB	23	28	515	PIG	Ces	Sim	Não	360	7	8
8	M	B	34	29	1.325	AIG	Ces	Não	Não	0	-	7
9	F	B	19	31	1.180	AIG	Vag	Não	Não	144	5	6
10	F	NB	38	25	810	AIG	Ces	Sim	Sim	0	1	6
11	M	B	28	28	990	AIG	Ces	Sim	Não	192	3	8
12	F	B	19	27	630	PIG	Ces	Sim	Não	0	1	
13	F	B	19	27	945	AIG	Ces	Sim	Não	0	4	8
14	F	B	19	28	750	PIG	Vag	Sim	Não	0	7	8
15	M	B	19	28	1.140	AIG	Vag	Sim	Não	0	5	7
16	F	NB	30	29	1.180	AIG	Vag	Sim	Não	0	4	8
17	F	NB	30	29	1.350	AIG	Vag	Sim	Não	0	2	5
18	M	NB	19	25	640	AIG	Vag	Sim	Não	36	7	8
19	M	NB	29	28	920	AIG	Ces	Sim	Sim	0	6	7
20	M	B	26	24	740	AIG	Vag	Sim	Não	1	3	7
21	M	B	21	24	850	AIG	Vag	Sim	Não	24	-	-
22	F	NB	16	26	655	PIG	Vag	Sim	Não	1	5	8
23	F	NB	31	25	835	AIG	Vag	Sim	Não	0	0	6
24	F	NB	15	25	670	AIG	Vag	Sim	Não	0	7	8
25	F	B	25	24	580	AIG	Ces	Sim	Sim	0	9	9
26	M	NB	32	32	1.195	AIG	Ces	Não	Não	0	5	7

APÊNDICE I - Dados dos pacientes – Parte 2

Corticóide pré-natal (nr. doses)	Antibiótico	DMH	Surfactante (doses)	Sepse prec	Infeção materna	Dias em VM	Dias em CPAP	Dias suporte vent
1	Sim	Sim	1	Sim	Sim	2	3	5
1	Sim	Sim	2	Não	Não	11	17	28
0	Sim	Sim	1	Sim	Não	8	0	8
0	Sim	Sim	1	Não	Não	1	5	6
0	Sim	Sim	1	Não	Não	10	0	10
0	Sim	Não	0	Sim	Sim	3	1	4
2	Sim	Sim	1	Não	Não	2	1	3
0	Sim	Não	0	Sim	Sim	2	0	2
2	Sim	Não	0	Sim	Não	3	4	7
1	Sim	Sim	2	Sim	Sim	7	9	16
1	Sim	Sim	3	Sim	Sim	4	0	4
1	Sim	Sim	1	Sim	Sim	18	18	36
0	Sim	Sim	1	Sim	Não	1	3	4
0	Sim	Sim	1	Não	Não	8	0	8
2	Sim	Sim	1	Não	Não	1	2	3
2	Sim	Sim	1	Não	Não	2	4	6
0	Sim	Sim	1	Sim	Sim	6	0	6
2	Sim	Sim	4	Sim	Não	17	8	25
2	Sim	Não	0	Sim	Sim	5	1	6
0	Sim	Não	0	Sim	Sim	7	0	7
0	Sim	Sim	1	Não	Não	39	30	69
2	Sim	Não	0	Sim	Sim	5	0	5
2	Sim	Sim	1	Não	Não	36	4	40
2	Sim	Sim	5	Não	Não	11	0	11
0	Sim	Sim	3	Não	Não	3	18	21

APÊNDICE I - Dados dos pacientes - Parte 3

Dias com O2 na incubadora	Dias em oxigenioterapia	Pneumotórax	HIV	PCA	Enfisema pulmonar	Hemorragia pulmonar	DBP	Óbito UTI	Dias Internação	Peso alta
6	11	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	60	1.935
44	72	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	80	2.170
0	8	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	8	
0	6	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	31	1.960
0	10	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	10	
0	4	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	4	
1	4	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	48	2.205
0	2	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	2	
0	7	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	80	1.990
11	27	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	65	1.950
0	4	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	4	
14	50	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	76	2.130
33	41	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	65	1.975
0	8	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	8	
31	34	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	42	1.845
3	9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	42	1.995
0	6	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	6	
0	25	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	26	
0	7	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	7	
0	7	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	7	
14	83	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	115	2.370
0	5	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	5	
0	40	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	40	
0	11	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	11	
1	22	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	53	1.975

APÊNDICE II - Dados concentrações das citocinas

Paciente	IL-10	D1	D2	D3	D5	D7	D10	D15	D20	TNF-alfa	D1	D2	D3	D5	D7	D10	D15	D20
2			3,9									463,3						
3			3,9	3,9								38,1	56,0					
4			3,9	3,9	3,9							3,9	51,7	51,7				
5			3,9									51,7						
6			3,9	3,9	250,0							3,9	60,3	1390,0				
7		3,9	275,0								60,3	681,8						
8		3,9	3,9								51,7	51,7						
9		3,9	101,8								3,9	3,9						
10		3,9	3,9	3,9							51,7	56,0	3,9					
11		3,9	3,9								3,9	214,2						
12		3,9		129,6							60,3		51,7					
13		3,9	3,9	3,9	3,9		250,0				3,9	125,0	64,6	118,4		151,3		
14			3,9									64,6						
15			3,9	73,5	3,9	3,9						51,7	3,9	56,0	182,4			
16		140,3									3,9							
17		3,9	195,1								3,9	3,9						
18			153,8	195,1								114,2	72,9					
19			3,9	231,7	119,0	3,9		3,9				3,9	3,9	72,9	3,9		107,0	
20		2447,3			3,9						67,7			128,5				
21			3,9	3,9	3,9							3,9	3,9	3,9				
22			3,9	3,9	3,9	3,9	225,0	3,9	3,9			62,5	3,9	3,9	114,2	256,7	171,4	107,1
23			3,9	107,1								62,5	375,0					
24		3,9	3,9	3,9	3,9	142,8	3,9	166,6	225,0		202,7	310,8	290,5	1066,1	250,0	62,5	3,9	72,9
25			3,9	3,9	3,9							3,9	3,9	3,9			62,5	
26		3,9									67,7							

APÊNDICE III - Dados dos testes de Função Pulmonar – Parte 1

Paciente	Sexo	Estatura (cm)	Id. Cronol.	Id Corrig	Peso (kg)	H. Cloral (mg)	P. Nasc.(g)	Data Masc	IG	Data do Teste	FVC	V50	V75
14	F	61,5	33,7	21,7	6,38	450	750	31-mai-02	28	22-jan-03	192,108	279,597	96,238
22	F	53	21,0	7,0	4	300	655	13-ago-02	26	07-jan-03	103,264	133,106	42,608
16	F	61	26,6	15,6	5,7	460	1.180	01-jun-02	29	04-dez-02	166,618	270,140	129,341
17	F	62	26,6	15,6	6,35	470	1.350	01-jun-02	29	04-dez-02	189,407	450,413	351,677
13	F	55,5	23,6	10,6	4,925	370	945	11-mai-02	27	23-out-02	191,551	301,902	123,207
10	F	51	26,3	11,3	3,66	183	810	08-abr-02	25	08-out-02	125,358	131,107	52,512
11	M	53	20,1	8,1	4,22	310	990	23-abr-02	28	11-set-02	189,208	151,719	15,214
5	F	53	23,3	11,3	4,25	300	975	24-dez-01	28	05-jun-02	144,763	257,986	141,747
8	M	51,5	12,1	1,1	3,7	180	1325	05-mar-02	29	29-mar-02	97,254	209,034	108,513
3	F	52	22,0	11,0	3,75	180	990	05-dez-01	29	08-mar-02	149,757	231,417	94,959

APÊNDICE III - Dados dos testes de Função Pulmonar – Parte 2

V85	FEF2575	FEV5	FEV1	Time constant	Z-FVC	Z-V50	Z-V75	Z-V85
49,811	232,609	143,563	171,494	3,818	-0,610	-2,660	-2,794	-2,812
20,250	104,456	75,259	89,145	3,506	-1,307	-4,874	-4,313	-4,383
71,991	237,863	131,440	157,425	3,380	-1,325	-2,751	-1,708	-1,647
244,487	438,537	179,157	187,903	2,095	-0,872	-0,451	1,590	1,680
50,663	258,293	145,507	174,277	3,732	1,568	-1,370	-1,061	-1,985
25,328	113,615	83,384	107,072	2,508	0,728	-4,601	-3,264	-3,422
3,803	69,830	115,774	134,401	2,886	2,478	-4,248	-7,862	-9,389
92,479	231,246	119,631	140,093	3,212	0,604	-1,708	-0,183	0,165
73,375	184,046	86,018	0,000	4,134	-1,067	-2,456	-0,854	-0,311
34,586	202,334	114,397	133,908	3,645	1,424	-2,057	-1,396	-2,627