

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAUDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS EM RECÉM-
NASCIDOS PREMATUROS ANTES E APÓS
VENTILAÇÃO MECÂNICA E CPAP NASAL**

TESE DE DOUTORADO

CLARISSA GUTIERREZ CARVALHO

Porto Alegre, Brasil
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS EM RECÉM-
NASCIDOS PREMATUROS ANTES E APÓS
VENTILAÇÃO MECÂNICA E CPAP NASAL**

CLARISSA GUTIERREZ CARVALHO

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cassia Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

Porto Alegre, Brasil
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

26 DE SETEMBRO DE 2013

E FOI AVALIADA PELA BANCA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Werther Brunow de Carvalho

Universidade de São Paulo - USP

Dr^a. Andrea Lúcia Corso

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Prof. Dr. Paulo José Cauduro Maróstica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Clarissa Gutiérrez
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS EM RECÉM-NASCIDOS
PREMATUROS ANTES E APÓS VENTILAÇÃO MECÂNICA E CPAP
NASAL / Clarissa Gutiérrez Carvalho. -- 2013.
122 f.

Orientadora: Rita de Cássia Silveira.
Coorientador: Renato Soibermann Procianoy.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. lesão pulmonar induzida pela ventilação. 2.
pressão positiva contínua na via aérea . 3.
citocinas. 4. Ventilação Mecânica. 5. Prematuros. I.
Silveira, Rita de Cássia, orient. II. Procianoy,
Renato Soibermann, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esta tese aos meus pais,
que sempre estimularam
meu sucesso

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Lucas Schindler Daiello, pela compreensão, respeito, elaboração de refeições à noite e debates calorosos sobre a vida, o universo e tudo mais, essenciais para eu conseguir concretizar essa etapa.

Aos meus pais, Paulo Roberto Antonacci Carvalho e Maria Ester Weyne Gutiérrez Carvalho, que me ensinaram a pescar e ir sempre atrás dos melhores peixes, e ao meu irmão, Felipe Gutiérrez Carvalho, que faz parte de grandes lembranças da minha vida.

À minha madrinha Terezinha Gutiérrez de Borba, que me alfabetizou, e meu padrinho João Luiz Gallo de Borba, por terem sido meus segundos pais na infância.

À Professora e Dr^a. Rita de Cássia Silveira pela acolhida, orientação e dedicação, especialmente na reta final deste processo – obrigada por ter acreditado e investido no meu potencial.

Ao Professor e Dr. Renato Procianoy, pelos comentários pertinentes e experientes, sempre.

Às colegas Betânia Bohrer, pelo auxílio com as referências bibliográficas na fase de elaboração do projeto, Andrea Lúcia Corso e Luciana Alonzo Heidemann, na fase inicial da coleta de dados.

Às acadêmicas de iniciação científica da Faculdade de Medicina da UFRGS Mariana Rangel Ribeiro, Mariana Bonilha, Bianca Benincasa e Úrsula Maldaner, pela busca ativa de casos elegíveis.

À estatística Vânia Naomi Hirakata, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Dr. Eurico Camargo Neto e ao técnico André Costa, do Laboratório Nobel, pelas valiosas contribuições na análise das citocinas.

Às minhas amigas médicas e não médicas, que compreenderam minha ausência nos últimos meses.

Aos pacientes e familiares pela disponibilidade em participar deste projeto.

Ao *staff* do Centro de Pesquisa Experimental, especialmente o técnico Jeferson e a Professora Dra. Úrsula Matte.

À secretária Eliane Cavalheiro, do Serviço de Neonatologia.

À secretária Rosane Blanger e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pelo apoio.

Ao PROPG da UFRGS pelo financiamento da pesquisa.

*Follow your steps and you'll find
The unknown ways are on your mind
Need nothing else than just your pride to get there!
So carry on there's a meaning to life
Which someday we'll find*

Mattos, André - 1993

RESUMO

A necessidade de intubação e uso de ventilação mecânica (VM) na prematuridade está relacionada à chamada lesão pulmonar induzida pela ventilação (VILI) e consequente displasia broncopulmonar (DBP). Estudos com animais e também em humanos mostraram que breves períodos de VM são suficientes para a liberação de interleucinas pró-inflamatórias. Outras formas de VM que regulam o volume-corrente evitando o volutrauma e as ventilações não invasivas como a pressão positiva contínua em via aérea por pronga nasal (CPAPn) parecem medidas protetoras ou menos lesivas para VILI. Esses efeitos protetores do CPAPn não foram ainda estudados em humanos. Objetivo: avaliar os níveis plasmáticos da interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α em recém-nascidos tão logo instituído CPAPn e duas horas após. Secundariamente, avaliação dessa resposta inflamatória em pacientes que necessitaram de VM. Metodologia: estudo de coorte prospectivo, incluindo recém-nascidos admitidos com idade gestacional (IG) de 28-35 semanas e necessidade de assistência ventilatória, excluindo malformações, infecção congênita, sepse, surfactante profilático e suporte ventilatório em sala de parto. Amostras de sangue coletadas nesses dois momentos. Realizada descrição das variáveis em medianas e interquartis (p25-p75), empregado Teste de Wilcoxon. Resultados: 43 recém-nascidos, médias de peso 1883,5 \pm 580g e IG 32 \pm 2,4semanas, 23 (53%) receberam CPAPn como primeira modalidade ventilatória. Pré-termos após duas horas de VM apresentaram níveis significativamente maiores de IL-6, TNF- α e IL-8. Já os níveis de IL-6 reduziram significativamente após duas horas de CPAPn. Em 15 dos 22 (68%) neonatos cujas mães receberam corticoide pré-natal, as medianas das citocinas foram menores no início do uso do CPAPn, mas esse efeito não se sustentou duas horas após. O uso de surfactante pelos prematuros em VM não alterou a resposta inflamatória em comparação aos que não

necessitaram do fármaco. Conclusão: demonstramos que os RN em CPAPn apresentaram mínima liberação de citocinas pro-inflamatórias e essa modalidade pode ter um papel protetor - nesse estudo potencializado pelo uso de corticoide ante natal. Por outro lado, VM promove significativa resposta inflamatória, estimulando-se CPAPn como estratégia ventilatória inicial protetora ao prematuro maior de 28 semanas de IG com desconforto respiratório moderado. Ainda assim, serão necessários mais estudos para determinar o papel de outras formas de ventilação não invasiva e outras formas de VM consideradas protetoras na prevenção da VILI. Essa nova compreensão dos mecanismos de lesão envolvendo resposta inflamatória mediada pelas citocinas possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias no cuidado dos recém-nascidos prematuros.

Palavras-chave: prematuros, ventilação mecânica, citocinas, displasia broncopulmonar, pressão positiva contínua na via aérea, lesão pulmonar induzida pela ventilação.

ABSTRACT

The need for intubation and mechanical ventilation (MV) in preterm infants is related to ventilator-induced lung injury (VILI) and subsequent bronchopulmonary dysplasia (BPD). Studies in animals and in humans have shown that short periods of MV are enough for the release of pro-inflammatory interleukins. Other forms of MV that regulate tidal volume avoiding volutrauma and non-invasive ventilation such as continuous positive airway pressure by nasal prongs (nCPAP) seem protective measures against VILI. These protective effects of nCPAP have not been studied in humans. Objective: To evaluate the plasma levels of interleukin (IL) - 1β , IL - 6, IL - 8, IL - 10 and tumor necrosis factor (TNF) - α in preterm infants as soon as established nCPAP and two hours after. Secondly, to evaluate this inflammatory response in patients who required MV. Methods: Prospective cohort including newborns admitted with gestational age (GA) of 28-35 weeks and requiring ventilation support, excluding malformations, congenital infections, sepsis, previous surfactant use and ventilatory support need in the delivery room. Blood samples were collected at those two moments. Cytokines were described as medians and interquartile ranges (p25 - p75), and Wilcoxon test was performed. Results: 43 newborns, medium weight 1883.5 ± 580 g and gestational age of 32 ± 2.4 weeks, 23 (53 %) received nCPAP as the first ventilatory mode. Preterm two hours after MV had significantly higher levels of IL - 6, TNF - α and IL - 8. The levels of IL - 6 decreased significantly two hours after nCPAP. In 15 of 22 (68 %) neonates whose mothers received antenatal corticosteroids, the median of cytokines were lower at the onset of the nCPAP, but this effect was not sustained after two hours. The use of surfactant in preterm infants in MV did not alter the inflammatory response compared to those who did not need the drug. Conclusion: we demonstrated that nCPAP presents minimal release of pro-inflammatory cytokines and may have a protective role - in this study enhanced by the use of

antenatal corticosteroids. Still, MV promotes significant inflammatory response, thus stimulating nCPAP as initial less harmful ventilatory strategy to preterm greater than 28 weeks of GA with moderate respiratory discomfort. Therefore, further studies are needed to determine the role of other forms of non-invasive ventilation and other forms of MV considered protective in preventing VILI. This new understanding of injury mechanisms involving inflammatory response mediated by cytokines allows the development of new strategies in the care of premature infants.

Keywords: preterm infant, mechanical ventilation, cytokines, bronchopulmonary dysplasia, continuous positive airway pressure, ventilator-induced lung injury.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento pulmonar.....	22
Figura 2 - Esquematização do ensaio multiplex e leitura no Luminex.....	40
Figura 3: Preparação dos padrões de citocinas humanas para o ensaio multiplex.....	41

ARTIGO 2

Figura 1 - Níveis de citocinas de acordo com o tipo de suporte ventilatório no momento inicial e após duas horas.....	91
---	----

ARTIGO 2 - INGLÊS

Figure 1: Cytokine levels according to ventilatory support mode immediately after the onset of ventilation and after two hours.....	111
---	-----

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1- Critérios diagnósticos para gravidade da Displasia Broncopulmonar.....24

ARTIGO 1

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para gravidade da Displasia Broncopulmonar.....73

ARTIGO 2

Tabela 1 - Índices de Troca Gasosa de acordo com o Suporte Ventilatório89

Tabela 2 - Comparação das Citocinas no início imediato do Suporte Ventilatório e duas horas após89

Tabela 3 - Associação do uso de Corticoide pré-natal com Citocinas no início imediato do Suporte Ventilatório e duas horas após90

ARTIGO 2 - INGLÊS

Table 1 - Gas exchange according to ventilatory mode.....109

Table 2 - Cytokine levels immediately after the onset of ventilatory support and after two hours.....109

Table 3 - Impact of antenatal steroid use on cytokine levels immediately after the onset of ventilatory support and after two hours.....110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNs - Recém-nascidos

VM - Ventilação Mecânica Invasiva

VILI - *ventilator induced lung injury* - lesão pulmonar induzida pela ventilação

DBP - displasia broncopulmonar

IG - Idade Gestacional

CRF - capacidade residual funcional

IL-6 - interleucina-6

IL-1 β - interleucina 1- β

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

ICAM – *Intercellular Adhesion Molecule* - moléculas de adesão intracelulares

VCAM – *Vascular Cell Adhesion Molecule* - moléculas de adesão de células vasculares

IL-8 - interleucina-8

IL-10 - interleucina-10

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor* - fator de crescimento vascular endotelial

TGF- β – *Transforming Growth Factor - β* - fator de crescimento transformador- β

PEEP – *Positive End Expiratory Pressure* - pressão final expiratória positiva

CPAP - *continuous positive airway pressure* - pressão positiva contínua em vias aéreas

CPAPn – CPAP aplicado por prongas nasais

O₂ - oxigênio

P - pressão

T - tensão superficial

r - raio

PaCO₂ - pressão arterial de gás carbônico

RR - Risco Relativo

IC - Intervalo de confiança

INSURE - IN=*intubation*, SUR=*surfactant* e E=*extubation*- intubação para a administração de surfactante seguido de extubação precoce e retorno para o CPAPn

NIPPV – *Nasal Intermittent Positive Pressure Ventilation* - ventilação nasal de pressão positiva intermitente

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

UTIN - Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

TORSCH - Toxoplasmose, outras infecções (parvovírus), Rubéola, Sífilis, Citomegalovírus, Herpes, Hepatites e HIV

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* –vírus da imuno deficiência humana

TCLE - Termo de consentimento livre e Esclarecido

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético

SNAPPEII - Score for Neonatal Acute Physiology Perinatal Extension II

paO₂ - pressão parcial de O₂ arterial

P_B - pressão barométrica

PH₂O - pressão do vapor d'água = 47mmHg

R – constante dos gases perfeitos

pAO₂ - pressão parcial de O₂ alveolar

P(A-a)O₂ - gradiente alvéolo-arterial de O₂

a/ApO₂ - razão artério-alveolar de O₂

paO₂/FiO₂ - relação entre pressão arterial de O₂ e a Fração Inspirada de O₂

MAP – *Multiple Analyte Profile* – Perfil de Múltiplos Analitos

SAPE - *Streptavidin Phycoerythrin* - Estreptavidina-Ficoeritrina

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*

DP - desvio-padrão

Vt – *volume tidal* - volume corrente

NEOCOSUR - *Neonatal del cono sur* – rede de estudos neonatais do Cone sul

DMH - doença da membrana hialina

MIST - *Minimally-invasive surfactant therapy* – terapia com surfactante minimamente invasivo.

NP-SIMV- *Naso-pharyngeal Synchronized Intermittent Mechanical Ventilation* - ventilação sincronizada mandatória intermitente nasofaríngea

N-BiPAP - pressão positiva em vias aéreas bi-nível nasal

HFOV – *High Frequency Oscillatory Ventilation* - ventilação de oscilação de alta frequência

PSV - ventilação com pressão de suporte

PIP - *peak inspiratory pressure* – pressão de pico inspiratório

VPS - ventilação com volume pré-selecionado

VVG - ventilação por volume garantido

AA - Ar ambiente

IGC - Idade Gestacional Corrigida

RPM - Rotações por minuto

PIG - pequeno para a idade gestacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 O PULMÃO DO PREMATURO	22
2.2 A ETIOLOGIA DA LESÃO PULMONAR.....	23
2.3. AS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	25
2.4. PREVENÇÃO DA LESÃO PULMONAR	28
2.4.1. Cpap nasal	29
3. JUSTIFICATIVA	32
4. HIPÓTESE EM ESTUDO	32
5. OBJETIVOS	33
5.1. OBJETIVO GERAL.....	33
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
6. METODOLOGIA	34
6.1. DELINEAMENTO.....	34
6.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO	34
6.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
6.4. LOCAL.....	35
6.5. LOGÍSTICA	36
6.6. FERRAMENTAS DE PESQUISA	37
6.6.1. Cálculo dos índices de troca gasosa	38

6.6.2. Dosagem das interleucinas.....	38
6.7. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS	43
6.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ARTIGO 1 - LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS	52
ARTIGO 2 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS PRÉ E PÓS USO DE SUPORTE VENTILATÓRIO A PREMATUROS COM DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA PRECOCE.....	74
7. CONCLUSÕES.....	92
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
APÊNDICES	95
APÊNDICE A – ARTIGO 2 EM INGLÊS	95
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	112
APÊNDICE C - FICHA CLÍNICA	114
APÊNDICE D - OUTRAS TABELAS DO ESTUDO.....	116
APÊNDICE E – OUTRAS FIGURAS DO ESTUDO	119
ANEXOS	121
ANEXO A - ESCORE DE SNAPPE II.....	121
ANEXO B - MAPA DA REAÇÃO MULTIPLEX.....	122

1. INTRODUÇÃO

Recém-nascidos prematuros, por definição, são aqueles cujo nascimento ocorreu antes de 37 semanas completas de gestação. Cerca de 15 milhões de neonatos, correspondente a 11% dos nascimentos mundiais, nasce antes do termo a cada ano e a prematuridade está relacionada a 35% de todas as mortes em recém-nascidos (RNs) (HOWSON CP et al., 2012). O prognóstico dos recém-nascidos pré-termo melhorou nos últimos 30 anos devido às inovações no cuidado neonatal, incluindo suporte ventilatório, uso pré-natal de glicocorticoides e o uso de surfactante exógeno, precoce ou de resgate (CROWLEY, 1995; SOLL e MORLEY, 2000; CLARK et al., 2001).

As primeiras 24 horas de vida são cruciais para prematuros com desconforto respiratório precoce; a maioria responderá ao suporte ventilatório e surfactante (ENGLE, 2008), mas neonatos reanimados em sala de parto ou com sepse precoce poderão evoluir para falência respiratória progressiva e que exija ventilação mecânica invasiva (VM) (JOBÉ e IKEGAMI, 1998).

A intubação endotraqueal associada à ventilação com pressão positiva está relacionada à estenose subglótica (ALBERT et al., 1990), infecção respiratória (BALTIMORE, 1998), lesão pulmonar induzida pela ventilação - *ventilator induced lung injury* (VILI) (DONN e SINHA, 2006) e displasia broncopulmonar (DBP) (PANDYA e KOTTECHA, 2001). Estudos experimentais em animais demonstraram que VM precoce induz o recrutamento de neutrófilos nos pulmões, com expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que também foi observado em recém-nascidos humanos (NAIK et al., 2001; BOHRER et al., 2010).

As citocinas contribuem para a patogênese de várias doenças através da indução de outros mediadores inflamatórios, sequestro e acúmulo de neutrófilos, e aumento da permeabilidade vascular (GRONECK et al., 1994; TREMBLAY et al., 2002). Alterações em

citocinas pró-inflamatórias foram implicadas na patogênese de quase todos os processos de doença no prematuro, principalmente no cérebro, nos intestinos e nos pulmões - recentemente demonstrou-se o aumento dos níveis de citocinas na sepse e em formas moderadas a graves de displasia broncopulmonar (BERNER et al., 1998; LISTA et al., 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PULMÃO DO PREMATURO

O desenvolvimento fetal do pulmão humano ocorre em cinco estágios (KOTECHA, 2000) (Figura 1):

- embrionário (3-7 semanas),
- pseudo-glandular (7-17 semanas),
- canalicular (17-26 semanas),
- sacular (27-36 semanas) e
- alveolar, com maturação microvascular (36 semanas a 2 anos).

Tomando como exemplo os pulmões de prematuros com idade gestacional (IG) de 24 a 28 semanas, podemos encontrar tanto a fase canalicular tardia quanto a sacular precoce. A ramificação e expansão dos espaços de ar para formar sáculos, afinamento do mesênquima e síntese de surfactante por células tipo-2 ocorrem mais tarde na gestação.

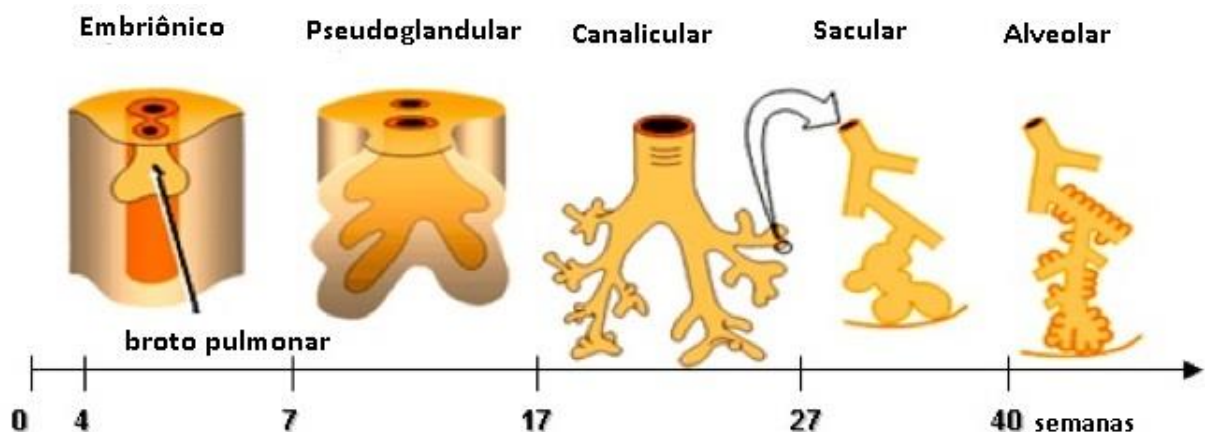


Figura 1- Estágios do desenvolvimento pulmonar.

Fonte: modificado de CENTRE DE REFERENCE DES MALADIES RESPIRATOIRES RARES, 2012.

Como os prematuros nascem antes de completar o desenvolvimento e maturação pulmonar, apresentam espessamento da barreira hemato-alveolar, epitélio das vias aéreas indiferenciado ou imaturo e redução na capacidade de produzir o surfactante. Podem apresentar também dificuldade em eliminar o líquido pulmonar, apresentando pulmões pouco complacentes, susceptíveis ao colapso e com dificuldades nas trocas gasosas (JOBÉ et al., 2008). Redução na produção de surfactante, troca gasosa prejudicada e respiração independente ineficiente resultam muitas vezes na necessidade de VM.

Todas essas características somadas às menores quantidades de colágeno e elastina, disfunção quantitativa e qualitativa do surfactante pulmonar, e menor capacidade residual funcional (CRF) (REBELLO et al., 2002), deixam o sistema respiratório do RN prematuro mais suscetível à VILI. Qualquer dano nos estágios precoces do crescimento pulmonar pode resultar em sequelas à longo prazo.

2.2 A ETIOLOGIA DA LESÃO PULMONAR

A lesão pulmonar tem etiologia multifatorial, relacionada às características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do pulmão do RN. O pré-termo é suscetível primariamente aos agravos ou secundariamente às intervenções médicas associadas ao nascimento pré-termo e suas complicações. Os principais mecanismos incluem: prematuridade, desenvolvimento incompleto dos pulmões, exposição ao oxigênio, trauma devido à pressão ou volume inadequado (barotrauma e volutrauma) na VM, reações inflamatórias pulmonares, presença de edema pulmonar secundário ou não à persistência de canal arterial, fatores nutricionais e obstrução de vias aéreas.

A DBP é uma doença comum entre os prematuros de extremo baixo peso, com incidência de 30 a 75% naqueles que pesam menos de 1000g ao nascimento. Ocorre nos RNs que sobreviveram à fase aguda da doença e permaneceram em ventilação mecânica de forma prolongada, utilizando oxigênio por mais de 28 dias de vida, conforme critérios da Tabela 1 (JOBE e BANCALARI, 2001).

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para Displasia Broncopulmonar

IG ao nascer	Leve	Moderada	Grave
<32 semanas	O ₂ suplementar por 28 dias e AA com 36 sem de IGC ou na alta	O ₂ suplementar por 28 dias e FiO ₂ < 0,3 com 36 sem de IGC ou na alta	O ₂ suplementar por 28 dias e FiO ₂ ≥ 0,3 com 36 sem de IGC ou na alta
≥ 32 semanas	O ₂ suplementar por 28 dias e AA com 56 dias ou na alta	O ₂ suplementar por 28 dias e FiO ₂ < 0,3 com 56 dias ou na alta	O ₂ suplementar por 28 dias e FiO ₂ ≥ 0,3 com ou sem suporte de pressão positiva com 56 dias ou na alta

Legenda: IG: idade gestacional; IGC: idade gestacional corrigida; FiO₂: fração inspirada de oxigênio; AA: ar ambiente.

Fonte: modificado de JOBE e BANCALARI, 2001.

Nos prematuros, a VILI causada pela VM é um dos fatores principais para o desenvolvimento de DBP. A tensão de cisalhamento, volume inspiratório, pressão do ar, concentração de oxigênio, estão todos envolvidos no dano das células epiteliais, contribuindo para o extravasamento de proteínas nas vias aéreas, inibindo a função do surfactante e aumentando a infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos. Além disso, a VM pode causar uma resposta inflamatória sistêmica, com ativação de fagócitos na circulação e de linfócitos T CD4 e CD8, ativação essa que também ocorre na DBP (MELVILLE e MOSS, 2013).

Essa ativação de leucócitos está relacionada ao aumento da produção de citocinas, com reações inflamatórias associadas ao crescimento vascular anormal e dano às vias aéreas distais do pequeno paciente (LAUGHON et al., 2009). Como um fator de risco ante natal para

essas reações, a corioamnionite materna é associada a posterior desenvolvimento de DBP, sendo o *Ureaplasma urealyticum* o agente etiológico mais encontrado nos menores de 30 semanas de IG (CASSELL GH et al., 2001).

Está bem estabelecido que a intubação e ventilação com pressão positiva em neonatos pré-termo está entre os maiores fatores preditivos de DBP (VAN MARTER et al., 2000). As pressões altas nas vias aéreas, associadas aos volumes correntes elevados aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões em modelos animais e em aspirados de traqueia de neonatos humanos (KOTECHA et al., 1996b; TREMBLAY et al., 2002).

2.3. AS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

A inflamação tem impacto direto na integridade do tecido local com consequências importantes para o desenvolvimento do pulmão prematuro. Independentemente do fator causador, a inflamação pulmonar envolve um número de mediadores-chave celulares e moleculares. A interleucina-6 (IL-6), a interleucina 1- β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são três citocinas de fase aguda expressadas em seguida ao dano pulmonar.

Essas citocinas iniciam programas de transcrição em várias outras células que não são imediatamente responsivas ao insulto inicial e, portanto, amplificam e estendem a resposta inflamatória. Elas também são responsáveis por atrair células inflamatórias ao sítio de lesão, através de *up regulation* nas células endoteliais e leucocitárias da expressão de moléculas de adesão intracelulares (ICAM) (KOTECHA et al., 1995; KOTECHA et al., 1998) e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM).

Ocorre também aumento da expressão local da interleucina-8 (IL-8), que atrai os neutrófilos ao foco inflamatório. Foi descrita expressão elevada dessa citocina em neonatos que desenvolveram DBP (KOTECHA et al., 1995).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina de ação anti-inflamatória, cuja expressão se dá mais tardiamente após o estímulo de lesão, posteriormente ao aumento dos níveis de IL-8 (DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Prematuros podem ter produção deficiente de interleucinas regulatórias, como a IL-10, sendo, portanto, mais predispostos a uma resposta inflamatória aumentada (BERESFORD e SHAW, 2002).

Outras substâncias que atraem neutrófilos como o complemento C5 e o leucotrieno B4 aumentam a migração leucocitária ao pulmão, estando descritos nos pulmões de neonatos com DBP subsequente (GRONECK e SPEER, 1995). As consequências desse recrutamento exagerado de neutrófilos podem ser graves, pois os grânulos intracelulares dessas células contêm um potencial arsenal de moléculas antimicrobianas, incluindo proteases e enzimas oxidativas, que podem danificar indiscriminadamente o tecido local saudável se esse recrutamento for descontrolado. São característicos da DBP a simplificação e o aumento das estruturas alveolares e o desequilíbrio entre a atividade proteolítica neutrofílica e a redução dos inibidores, que parece contribuir neste processo (SPEER, 2006). O apoptose de neutrófilos também é comprometido nesses bebês que desenvolvem DBP (KOTECHA et al., 2003).

A interação fisiopatológica entre desenvolvimento pulmonar e inflamação foi estudada em modelos animais. Administração intrauterina de endotoxina no líquido amniótico de cordeiros prematuros alterou a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), com remodelamento vascular, o qual precederia a simplificação alveolar (KRAMER et al., 2009). Experimentos em adultos e *in vitro* mostraram que a distensão alveolar sozinha produz resposta pró-inflamatória, aumentando a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , o que

provavelmente contribui para a patogênese de displasia (FRANK et al., 2006). Alisson et al. (2008) desenvolveram um modelo animal de ventilação intra-útero que comprovou desenvolvimento pulmonar alterado devido à VM, de forma dissociada de outros fatores iatrogênicos que poderiam contribuir.

O fator de crescimento transformador (TGF- β) é uma citocina e fator de crescimento que controla o desenvolvimento pulmonar peri e pós-natal, e está aumentado no lavado pulmonar de neonatos que desenvolveram DBP (KOTECHA et al., 1996a). A importância potencial dessa molécula como alvo terapêutico na DBP foi destacada em um estudo com ratos: uso de anticorpos específicos para neutralizar níveis elevados de TGF- β em pulmões com hiperóxia melhoraria a alveolarização, a deposição de elementos de matriz extracelular e o desenvolvimento microvascular, normalizando o desenvolvimento pulmonar (NAKANISHI et al., 2007). De modo semelhante, anticorpos contra quimiocinas específicas neutrofílicas utilizados em ratos expostos a hiperóxia preservaram o desenvolvimento pulmonar normal, consistente com a ideia de que reduzir a inflamação no período pós-natal imediato pode resultar em benefícios à longo prazo em neonatos com dano pulmonar (AUTEN et al., 2001).

Existem controvérsias a respeito do exato momento de liberação dessas citocinas na resposta inflamatória pulmonar; os mecanismos precisos de dano pulmonar pelo ventilador são complexos e não totalmente entendidos. Quinn et al. (2002) ventilaram ratos adultos por duas horas e detectaram que os níveis de IL-8 em lavado broncoalveolar eram os mesmos que nos controles, mas quatro horas depois aumentavam bastante, sugerindo uma expressão retardada de citocinas. Hillman et al. (HILLMAN et al., 2007) demonstraram em cordeiros que a ventilação breve por 15 minutos induzia aumento das citocinas nos pulmões. Capoluongo (2005) reportaram que as citocinas séricas nos dias um, três e cinco em lactentes em ventilação de alta frequência oscilométrica eram menores do que naqueles em ventilação

intermitente mandatória. A VM por uma hora em humanos adultos sem doença pulmonar prévia não causou mudanças nos níveis de mediadores inflamatórios (WRIGGE et al., 2000).

Os estudos em prematuros muito pequenos que documentam a inflamação sistêmica associada à ventilação tem sido limitados a um número pequeno de sujeitos e de mediadores inflamatórios (CAPOLUONGO et al., 2005; TURUNEN et al., 2011). Estudo realizado no HCPA com RNs a termo e prematuros tardios mostrou que a VM, como um estímulo único e mesmo por curto período, induziria a liberação plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) em recém-nascidos duas horas após serem submetidos à ventilação (BOHRER et al., 2010), sugerindo que a cascata de eventos que leva à inflamação pulmonar e remodelamento nos neonatos possa começar dentro de duas horas após a intubação. Nos pacientes desse estudo, a IL-10 reduziu de modo significativo após duas horas de ventilação.

Os achados descritos suportam o uso de estratégias que evitem a intubação e ventilação com pressão positiva sempre que possível – o que pode ser difícil nos neonatos muito prematuros.

2.4. PREVENÇÃO DA LESÃO PULMONAR

Evidências em animais sugerem que a inflamação pulmonar devido à VM pode levar à morbidade respiratória em longo prazo (TREMBLAY et al., 1997; HO et al., 2002). O uso de volumes correntes altos e sem pressão final expiratória positiva (PEEP) resultaram em aumento da concentração de citocinas no pulmão do rato (TREMBLAY et al., 1997), e VM gentil em carneiros recém-nascidos, mesmo por curto período de tempo, resultou em recrutamento de neutrófilos nos pulmões, com expressão de citocinas pró-inflamatórias e morfologia pulmonar alterada semelhante à displasia (HO et al., 2002).

Outros estudos em animais mostraram que a ventilação incorporando PEEP reduz a formação de edema e dano celular (DREYFUSS et al., 1988), podendo ajudar a reduzir o recrutamento de células inflamatórias durante a ventilação prolongada (MARKOS et al., 1993). Esses achados, somados ao observado em recém-nascidos humanos (KOTECHA, 1996; NAKANISHI et al., 2007), justificam a procura de outras estratégias, como a ventilação não invasiva e o emprego precoce de pressão positiva contínua em vias aéreas – *continuous positive airway pressure* (CPAP) na sala de parto - estratégias promissoras na prevenção da lesão induzida pela VM em prematuros extremos.

2.4.1. Cpap nasal

A prevenção do dano causado pela ventilação deveria começar desde o nascimento, sendo o CPAP nasal (CPAPn) precoce uma opção atrativa. O CPAP nasal é frequentemente usado para facilitar a extubação e tratar apneia da prematuridade e, quando usado na fase aguda da angústia respiratória, em bebês entre 25-28 semanas, mostrou reduzir o tempo de dependência do O₂ e de VM (MORLEY et al., 2008).

Introduzido na neonatologia por Gregory et al. (1971), o CPAP nasal é uma forma de aplicar pressão de distensão contínua para manter algum grau de insuflação alveolar durante a expiração. De acordo com a lei de La Place, o aumento do raio da curvatura exige menor pressão para superar a tensão superficial, evitando então o seu colapso e reduzindo o trabalho respiratório.

$$P=2T/r$$

P = pressão

T= tensão superficial

r = raio

Os benefícios descritos com a aplicação da pressão positiva incluem a estabilização das vias aéreas, aumento do volume pulmonar, redução da resistência de vias aéreas, e redução do trabalho respiratório, mas a PEEP excessiva pode resultar em níveis elevados de paCO_2 por aumentar o espaço morto e reduzir o volume corrente. Outro problema potencial é o aumento do volume pulmonar, que reduz a complacência e leva ao pneumotórax. Também se deve lembrar da redução de débito cardíaco que pode ser causada pelo aumento da pressão intratorácica (DE WINTER et al., 2010).

Em estudos epidemiológicos, a substituição da VM pelo uso de CPAPn foi associada à redução de DBP (LINDNER et al., 1999), e redução da necessidade de ventilação mecânica (RR 0,55; 95% CI 0,32 – 0,96) (HO et al., 2002). Assim, há um interesse renovado no uso do mesmo para facilitar o início da respiração espontânea nos prematuros.

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos do CPAPn para reduzir a DBP podem se dever ao fato de se estar evitando a ventilação agressiva com altos volumes correntes e hiperventilação não advertida, que ocorrem em pacientes intubados (JOBÉ et al., 2002), assim como dano na via aérea e colonização do tubo. Esses benefícios são consistentes com os conceitos de que a displasia resulta do estresse inflamatório repetitivo no pulmão pré-termo (JOBÉ e IKEGAMI, 1998).

O papel da VM no prematuro tardio e a resultante elevação persistente das células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias nos pulmões já é bem conhecido – contudo os efeitos do CPAPn na inflamação no pulmão só foram demonstrados em animais: carneiros tratados com CPAPn tinham indicadores mais baixos de dano pulmonar que os ventilados (JOBÉ et al., 2002).

Um grande estudo clínico que randomizou 610 RNs entre 25 e 28 semanas de IG em sala de parto para uso de CPAPn precoce *versus* entubação com VM no quinto minuto de vida (estudo COIN) não mostrou redução de incidência de DBP ou de mortalidade no grupo

CPAPn (MORLEY et al., 2008). Contudo, fora da sala de parto, o uso precoce de surfactante com ventilação por curto período e extubação para CPAPn parece adequado, como foi demonstrado em metanálise (STEVENS et al., 2007) que utilizou o método INSURE.

INSURE é uma técnica desenvolvida com vistas a reduzir a exposição à VM dos pacientes com indicação de surfactante exógeno para o tratamento da DMH, significando IN=*intubation*, SUR=*surfactant* e E=*extubation*. Essa técnica se baseia no uso do CPAPn, intubação para a administração de surfactante seguido de extubação precoce e retorno para o CPAPn.

Alguns recém-nascidos submetidos ao uso de CPAPn precoce desenvolveram insuficiência respiratória devido à doença pulmonar em evolução, apneia da prematuridade ou atelectasia progressiva (OWEN et al., 2007). As taxas de falha na extubação com o uso de CPAPn são de 25-40% nos neonatos de baixo peso de nascimento (DAVIS e HENDERSON-SMART, 2003). Esforços para reduzir essa falha incluem a ventilação nasal de pressão positiva intermitente (NIPPV), que pode proporcionar suporte o suficiente para evitar a intubação em algumas crianças.

Verificamos então que há pouca informação sobre o comportamento das citocinas pró- e anti-inflamatórias na vigência de modos de ventilação não invasivos na literatura nacional e internacional, assim como sobre o comportamento das mesmas em prematuros em ventilação mecânica invasiva.

3. JUSTIFICATIVA

O CPAPn é uma técnica de ventilação não invasiva, possivelmente com menor resposta inflamatória que o uso de ventilação mecânica. Há evidências recentes sobre a maior chance de DBP em pacientes que foram entubados e submetidos à ventilação mecânica invasiva; sabe-se que o CPAPn reduz a taxa de reintubação, portanto seria um fator protetor contra a DBP.

De forma mais relevante, não é conhecido o comportamento das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10, pré e após alguma exposição à CPAPn. A dosagem destes mediadores auxiliará nesta questão.

Além disso, o estabelecimento da presença de um efeito inflamatório após o emprego das ventilações não invasivas, de magnitude similar ou não à VM (como previamente estudado) é um passo para o estudo de fatores de proteção contra a VILI e a DBP.

4. HIPÓTESE EM ESTUDO

A hipótese desse estudo é que o aumento das citocinas pró-inflamatórias na estratégia de CPAP nasal ocorra em níveis menos elevados do que o já previamente estudado em VM, conferindo um caráter protetor.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar níveis plasmáticos das citocinas nos recém-nascidos prematuros com disfunção respiratória precoce tão logo instituído CPAPn como primeira modalidade ventilatória e duas horas após.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a alteração no nível das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos recém-nascidos prematuros tão logo instituído o CPAPn e duas horas após o uso;
- Verificar a alteração no nível das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos recém-nascidos prematuros tão logo instituída a VM e duas horas após o uso;
- Avaliar a influência do uso antenatal de corticosteroides nas alterações dos níveis de citocinas nos recém-nascidos prematuros tão logo instituídos os dois modos de suporte ventilatório e duas horas após o uso;
- Avaliar a influência do uso pós-natal de surfactante exógeno de resgate nas alterações dos níveis de citocinas nos recém-nascidos prematuros tão logo instituída a VM e duas horas após o uso;
- Estudar a variação nos índices de trocas gasosas nos recém-nascidos prematuros tão logo instituídos os dois modos de suporte ventilatório e duas horas após o uso.

6. METODOLOGIA

6.1. DELINEAMENTO

Estudo prospectivo, de coorte, que incluiu uma amostra dos recém-nascidos elegíveis admitidos entre setembro de 2011 e maio de 2013.

6.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO

Recém-nascidos entre 28 e 35 semanas de idade gestacional admitidos na UTIN do HCPA durante o período de estudo, em uso de CPAP nasal ou ventilação mecânica invasiva como modalidades iniciais de assistência respiratória. Foram incluídos neonatos maiores de 28 semanas de IG e com peso de nascimento superior a 1000 gramas, sem qualquer intubação e/ou ventilação invasiva prévia à inclusão no estudo.

6.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Malformação congênita, síndrome cromossômica, evidência clínica ou laboratorial de infecção congênita TORSCHE, sepse – comprovada pela presença de hemocultura com resultado positivo dentro de 72 horas da internação, mãe HIV positiva, uso de óxido nítrico, ressuscitação em sala de parto, uso de surfactante antes da inclusão no estudo.

6.4. LOCAL

O Serviço de Neonatologia do HCPA está localizado em hospital geral universitário de nível terciário, com capacidade para admitir até 47 recém-nascidos. Tem 20 leitos de UTI, que comportam desde casos de menor complexidade até bebês prematuros extremos com necessidade de cuidados que exigem alta capacidade tecnológica e recursos humanos qualificados. Os pacientes são assistidos por cinco equipes chefiadas por professores do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFRGS ou por médicas rotineiras neonatologistas contratadas do HCPA. São avaliados diariamente por médicos residentes de Pediatria e Neonatologia, supervisionados pelos professores e por médicos plantonistas neonatologistas.

Essa estrutura absorve a demanda do Centro Obstétrico da instituição, referência em patologias graves gestacionais e medicina fetal – por consequência, muitos nascimentos ocorridos no HCPA são de bebês bastante graves.

Na rotina diária, o atendimento de sala de parto é realizado pelo médico residente acompanhado do médico plantonista, e as decisões de condutas a seguir na UTI são baseadas em protocolos bem definidos pela chefia do serviço juntamente com a equipe médica e multidisciplinar. Assim, recém-nascidos prematuros com disfunção respiratória admitidos na UTI são submetidos, conforme um conjunto de manifestações clínicas que conferem a gravidade, a duas modalidades de ventilação: VM, após intubação traqueal – quando desconforto grave ou falência ventilatória, ou métodos não invasivos – geralmente o CPAP nasal, quando desconforto leve a moderado.

Como prematuros com peso inferior a 1000g muitas vezes são logo entubados para uso de surfactante precoce e permanecem em VM, optou-se por não incluí-los no nosso estudo.

6.5. LOGÍSTICA

Os pacientes prematuros, logo ao nascer, eram avaliados pela equipe assistente da UTI Neonatal, sendo encaminhados para internação conforme evolução em sala de parto, idade gestacional e peso de nascimento. A aluna de pós-graduação ou as bolsistas de iniciação científica do Serviço eram avisadas desses nascimentos, analisavam os casos e preenchiam ficha de dados após a aplicação do TCLE dos casos elegíveis.

Os pacientes com indicação de uso de CPAP nasal ou VM eram submetidos a exames conforme a rotina do Serviço – assim, quando da elegibilidade e aceitação do ingresso no estudo, era coletada uma alíquota adicional de 500 μ L de sangue em tubo de EDTA para posterior análise de citocinas. Após duas horas no uso de suporte ventilatório, outra amostra era coletada para gasometria e citocinas. Não houve coletas exclusivamente para o estudo. No dia seguinte, era fechado escore de *SNAPPEII* baseado nos dados das primeiras 12 horas de vida do RN.

Todas as amostras eram centrifugadas pela pesquisadora ou pelas bolsistas, durante dez minutos, na velocidade de 3000 rpm, imediatamente após a coleta. Obtinha-se 300 μ L de plasma, congelado para análise laboratorial conjunta a -80°C , com identificação de número e momento da coleta da amostra. A quantificação das citocinas foi realizada pela pós-graduanda nos dias 4, 5 e 6 de julho de 2013 usando o kit *MILLIPLEX[®] Human Cytokine / Chemokine MPXHCYTO-60K*, e as leituras realizadas pelo *Luminex 100* (Austin, Texas) com software apropriado. Amostras e curva-padrão foram processadas em duplicata.

Todos os pacientes foram seguidos até 36 semanas de IG corrigida ou alta hospitalar, a fim de acompanhar desfecho DBP e intercorrências ventilatórias. Não foram realizadas intervenções nos pacientes para a pesquisa, tratando-se de rotinas bem estabelecidas quanto à instalação de suporte ventilatório em paciente sob cuidados intensivos.

6.6. FERRAMENTAS DE PESQUISA

Dados clínicos coletados - variáveis maternas:

- doença hipertensiva (específica da gestação e/ou crônica), eclâmpsia,
- diabetes melito,
- tipo de parto,
- uso de corticoide antenatal e outras medicações,
- ruprema, se trabalho de parto prematuro,
- corioamnionite clínica e infecção materna periparto.

Do RN, foram obtidas as variáveis:

- peso de nascimento,
- idade gestacional e adequação para a idade gestacional,
- sexo,
- valores de Apgar de 5º minuto,
- necessidade de reanimação em sala de parto,
- diagnóstico de doença da membrana hialina, uso de surfactante exógeno,
- diagnóstico de DBP,
- Escore de *SNAPPE II* (RICHARDSON et al., 1993; SILVEIRA RC et al., 2001)

(ANEXO A)

A IG foi registrada conforme dados maternos se ultrassonografia obstétrica precoce ou exame clínico neonatal na ausência de idade obstétrica acurada (BALLARD et al., 1991).

Foram calculados índices de troca gasosa como o gradiente alvéolo-arterial de O_2 – $P(A-a)O_2$, a razão artério-alveolar de oxigênio (a/ApO_2) e a relação pO_2/FiO_2 , conforme literatura (SNIDER, 1973).

6.6.1. Cálculo dos índices de troca gasosa

Gradiente alvéolo-arterial de O₂ - P(A - a)O₂

$$\begin{aligned} P(A-a)O_2 &= pAO_2 - paO_2 \\ PAO_2 &= PIO_2 - PACO_2/R \\ PIO_2 &= FiO_2 (P_B - PH_2O) \\ P_B &= 760 \text{ mmHg (nível do mar)} \end{aligned}$$

Legenda: paO₂ - pressão parcial de O₂ arterial, P_B - pressão barométrica, PH₂O - pressão do vapor d'água = 47mmHg, pAO₂ - pressão parcial de O₂ alveolar, R- constante dos gases.

$$P(A - a)O_2 = \left[\frac{(FiO_2 \times 7,13) - (paCO_2 \times 1,25)}{PIO_2} \right] - \frac{paO_2}{pAO_2}$$

Razão artério-alveolar de oxigênio - a/ApO₂

$$\begin{aligned} a/ApO_2 &= paO_2 / pAO_2 \\ &= paO_2 / P(A - a)O_2 + paO_2 \end{aligned}$$

Relação pO₂/FiO₂

$$paO_2 / FiO_2$$

6.6.2. Dosagem das interleucinas

Foi utilizada a estrutura da Unidade de Análise de Moléculas e Proteínas do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para centrifugação e congelamento das amostras, com a realização do ensaio no Laboratório Nobel, sob a supervisão do Dr. Eurico Camargo Neto.

As medidas das citocinas foram realizadas usando o *kit MILLIPLEX[®] Human Cytokine / Chemokine MPXHCYTO-60K* (MILLIPORE'S, 2011) - ensaio de multiplex para a determinação quantitativa simultânea de interleucinas ou outras substâncias, conforme *kit* e

protocolos previamente estabelecidos. A leitura foi realizada pelo *Luminex 100* (Austin, Texas) com software apropriado.

A tecnologia *Luminex™ xMAP* (MAP = Perfil de Múltiplos Analitos , x = variável, como citocinas, oligonucleotídeos, etc) dosa múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas, tecnologia aplicável a imunoenaios.

Esse método envolve um processo exclusivo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que pode ser identificada pelo instrumento *Luminex*. Os *kits* são comercialmente disponíveis, se fundamentando na reação e/ou interação do enzimo-ensaio; apresentam coeficientes de variação intra e inter ensaio inferiores a 5%.

Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, é adicionado um anticorpo de detecção. A detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (SAPE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento *Luminex 100* movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de *laser* detecta a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo *laser* quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

Cada *kit* contém todos os componentes necessários (incluindo padrões, controles de qualidade, microesferas exclusivas conjugadas a anticorpos, anticorpos de detecção, tampão de ensaio e tampão de lavagem) para ensaio de 96 cavidades em microplaca de titulação. O volume de amostra necessário é de $< 50 \mu\text{L}$.

Os components do *kit* são armazenados entre 2 e 8°C, e, uma vez que os padrões e

controles tenham sido reconstituídos, são armazenados em $\leq -20^{\circ}\text{C}$ em tubos de polipropileno. As microesferas conjugadas a anticorpos, anticorpos de detecção e a SAPE não devem ser congeladas. Para a reação ocorrer também é necessária a obtenção do Fluido de Revestimento (*sheath fluid*), essencial para a condução dos feixes de *laser*. As amostras dos pacientes, que ficaram armazenadas no *freezer* a -80°C durante o período de coleta, foram descongeladas em temperatura ambiente 24 horas antes do início do experimento.

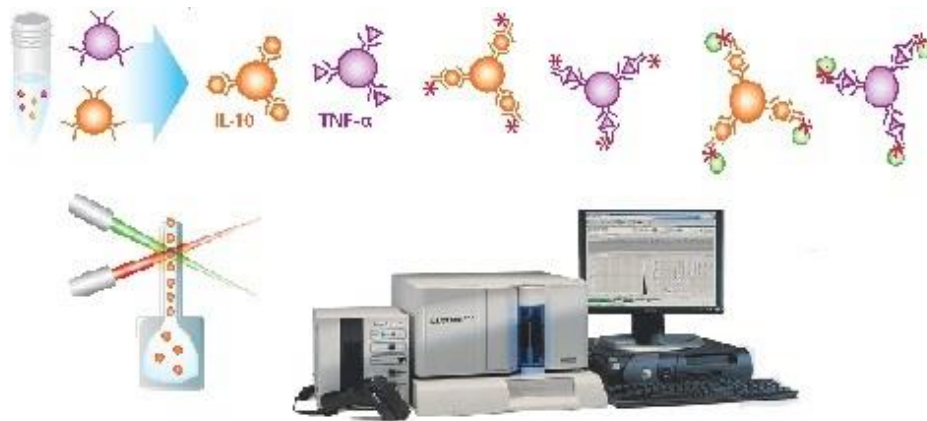


Figura 2 - Esquemática do ensaio multiplex e leitura no *Luminex*
 Fonte: modificado de (PANOMICS, 2007)

Preparação das microesferas: cada frasco de microesferas conjugadas foi agitado no vórtex por um minuto, aspirou-se 60 μL de cada um e adicionou-se 2,64 ml de diluente para formar 3 ml em um frasco de misturas que é disponibilizado no *kit*.

Preparação dos Controles de Qualidade: inicialmente os controles 1 e 2 foram reconstituídos utilizando-se 250 μL de água deionizada e homogeneizados no vórtex. Após dez minutos, foram transferidos a tubos de polipropileno.

Preparação do Tampão de lavagem: 30 ml de tampão foram diluídos em 270 ml de água deionizada e armazenados em frasco adequado.

Preparação do Soro Matriz: foi adicionado 1 ml de água deionizada ao frasco do soro matriz e deixou-se dez minutos em repouso

Preparação dos padrões de citocinas humanas: o padrão foi reconstituído com 250 μL de água deionizada para uma concentração total de 10000 pg/mL para todos os analitos. Foi misturado em vórtex por dez segundos, depois em repouso por dez minutos para depois ser transferido ao tubo de polipropileno para ser usado como o padrão de 10000 pg/mL . A seguir, foram identificados cinco tubos, que se tornariam os padrões 2000, 400, 80, 16 e 3,2 pg/mL . Em cada tubo, adicionado 200 μL de tampão de ensaio. Aspirou-se 50 μL do padrão com 10000 pg/mL e adicionou-se no tubo de 2000 pg/mL , misturou-se no vórtex, depois aspirou-se 50 μL desse ultimo tubo e adicionou-se no tubo de 400 pg/mL , até o ultimo tubo, conforme Figura 3. O tampão de ensaio é considerado o padrão zero, e fica em um sétimo tubo.

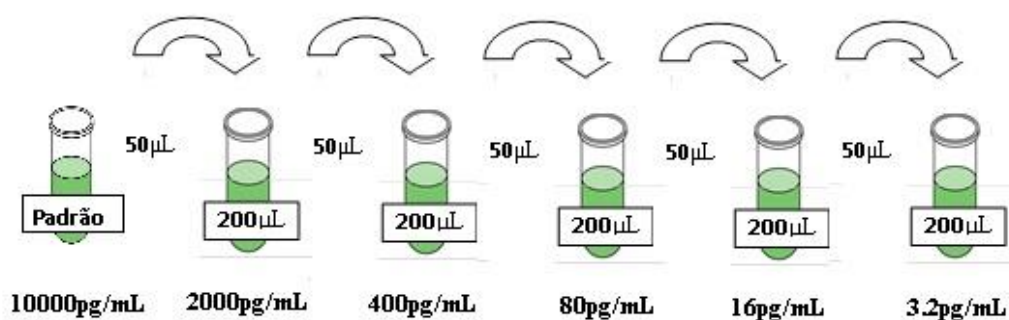


Figura 3 - Preparação dos padrões de citocinas humanas para o ensaio multiplex.
Fonte: modificado de (MILLIPORE'S, 2011).

Após preparados todos os padrões, controles e tampões, foi necessário preparar a microplaca de titulação: primeiro foi umidificada com 200 μL de tampão de ensaio em cada pocinho, selada com o papel-filme adequado que vem no *kit* e agitada por dez minutos no agitador de placas. Removeu-se o tampão por vácuo após.

Em seguida, aspiraram-se 25 μL de cada padrão e controles, adicionados à microplaca. Quanto ao padrão zero, adicionaram-se 25 μL do tampão de ensaio, e depois 25 μL de tampão aos pocinhos onde ficariam as amostras. Adicionaram-se aos padrões e controles 25 μL de soro matriz, e então 25 μL de cada amostra aos seus respectivos pocinhos. Para finalizar, adicionaram-se a todos os pocinhos 25 μL de microesferas.

A microplaca foi selada e deixada por 16 horas em geladeira a 4°C sob agitação. No dia seguinte, retirou-se a placa da geladeira, removeu-se o líquido por vácuo e se lavou com 200 µL de tampão de lavagem duas vezes, removendo novamente o líquido por vácuo. Nesse momento, adicionados a cada pocinho 25 µL dos anticorpos de detecção, microplaca selada e deixada por uma hora no agitador de placas.

Após essa etapa, se adicionaram 25 µL da SAPE à placa, que foi selada e deixada por 30 minutos no agitador de placas. Novamente removeu-se o líquido por vácuo e se lavou com 200 µL de tampão de lavagem duas vezes, removendo novamente o líquido por vácuo.

Adicionou-se por fim o Fluido de Revestimento - 150 µL, agitando-se a placa por mais cinco minutos no agitador de placas e então inserindo-a no leitor do *Luminex*.

Após a leitura de cada interleucina em cada sítio, o programa construiu curvas padrões, através das quais se obtiveram os resultados em pg/dL para cada paciente, em duplicata, após a aplicação de equações polinomiais de base quatro; o que permitiu as correções da leitura dos feixes luminosos de cada citocina, conforme pressuposto equacional:

$$P(x) = a_0x^n + a_1x^{n-1} + a_2x^{n-2} + \dots + a_{n-1}x + a_n, \text{ onde:}$$

P(x)=valor final em pg/ml de cada citocina

Números complexos a_0, a_1, \dots, a_n são os coeficientes do luminômetro fornecidos pelo Luminex 100;

x^1 = valores brutos da IL- 1β;

x^2 = valores brutos da IL-6;

x^3 = valores brutos da IL-8;

x^4 = valores brutos da TNF-α;

x^5 = valores brutos da IL-10;

n= 4 (grau do polinômio aplicado).

6.7. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

Trata-se de uma comparação entre o *baseline* e o depois do uso do CPAPn, tendo sido calculado um tamanho de amostra baseado em estudo em filhotes de cordeiros (JOBÉ et al., 2002). Para detectar uma variação de 37% entre esses dois momentos, considerando um $\alpha=0,05$ e poder de 80%, foram estimados 19 pacientes no total (teste t pareado). Foi determinado então que o tamanho amostral de 20 pacientes em uso de CPAPn e 20 em uso de ventilação mecânica invasiva seria o suficiente na inclusão de neonatos criticamente enfermos, com possibilidade de resultados estatisticamente significativos.

Os dados obtidos no estudo foram armazenados em banco de dados constituído para esse fim específico, utilizando o programa Excel e analisados com o auxílio do programa SPSS, versão 18.0 (*Statistical Package for Social Sciences*). Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP) - para peso de nascimento e idade gestacional, ou medianas e interquartis (p25-p75), para variáveis como as interleucinas, os escores de SNAPPE II e Apgar e índices de trocas gasosas.

As diferenças entre as medianas foram analisada através do teste de Mann-Whitney quando independentes (por exemplo, as comparações entre grupo VM e grupo CPAPn). O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os níveis de citocinas e de índices de trocas gasosas no início imediato e após duas horas de suporte ventilatório. Para comparação de médias de IG e peso de nascimento, utilizado teste t de Student para amostras independentes. Utilizado, ainda, o teste de chi-quadrado para comparação das variáveis categóricas entre os dois grupos. O nível de significância estatística para qualquer uma das análises foi considerado para um valor de alfa = 0,05.

6.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 11-0325. Para o presente estudo foram utilizados dados da ficha clínica, copiada do prontuário do paciente, que se tornou anônimo e identificado por código numérico. Foi assinado o Termo de Compromisso para Utilização de Dados, que é fornecido pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, assegurando a confidencialidade das informações contidas nos bancos que possam identificar os indivíduos. Também foi assinado pelos pais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para inclusão no estudo e autorização de coleta de sangue dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert DM, Mills RP, Fysh J, Gamsu H, Thomas JN. Endoscopic examination of the neonatal larynx damage. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1990; 20 (3): 203-212.
2. Allison BJ, Crossley KJ, Flecknoe SJ, Davis PG, Morley CJ, Harding R, et al. Ventilation of the very immature lung in utero induces injury and BPD-like changes in lung structure in fetal sheep. *Pediatr Res.* 2008; 64 (4): 387-92.
3. Auten RL, Richardson RM, White JR, Mason SN, Vozzelli MA, Whorton MH. Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxiaexposed newborn rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299 (1): 90-5.
4. 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.
5. Baltimore RS. Neonatal nosocomial infections. *Semin Perinatol.* 1998; 22 (1): 25-32.

6. 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.
7. Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res.* 1998; 44 (4): 469-77.
8. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical Ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr.* 2010; 156 (1): 16-9.
9. Capuolongo E, Vento G, Santonocito C, Matassa PG, Vaccarella C, Giardina B, et al. Comparison of serum levels of seven cytokines in premature newborns undergoing different ventilatory procedures: high frequency oscillatory ventilation or synchronized intermittent mandatory ventilation. *Eur Cytokine Netw.* 2005; 16 (3): 199-205.
10. Cassel GHW KB, Crouse DT: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 5th ed In Remington JSKJO WB Saunders Company, 2001.
11. Centre de reference des maladies resoiptoires rares. DEVELOPMENT OF THE RESPIRATORY SYSTEM : THE STAGES. 2012 [23 de julho de 2013]; Available from:http://basenat.u707.jussieu.fr/site_respirare/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=30&lang=en&limitstart=1.
12. Clark RH, Gerstmann DR, Jobe AH, Moffitt ST, Slutsky AS, Yoder BA. Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J Pediatr.* 2001; 139 (4): 478-484.
13. Crowley P. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials – 1972-1994. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 173 (1): 322-335.

14. Davis PG, Henderson-Smart DJ. Nasal continuous positive airways pressure immediately after extubation for preventing morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 2: CD000143
15. 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.
16. de Winter JP, de Vries MAG, Zimmerman LJI. Noninvasive respiratory support in newborns. *Eur J Pediatr.* 2010; 169 (7): 777-82.
17. Donn SM, Sinha SK. Minimizing ventilator induced lung injury in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006; 91 (3): F226-30.
18. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Retrospective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive-end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137(5): 1159-64.
19. Engle WA, American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. *Pediatrics.* 2008; 121(2): 419-432.
20. Frank JA, Parsons PE, Matthay MA. Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. *Chest.* 2006, 130 (6): 1906-14.
21. Gregory GA, Kitterman JA, Phibbs RH, Tooley WH, Hamilton WK. Treatment of the idiopathic respiratory-distress syndrome with continuous positive airway pressure. *N Engl J Med.* 1971; 284 (24): 1333-40.
22. 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.
23. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1995; 73 (1): F1-3.
 24. Hillman NH, Moss TJM, Kallapur SG, Bachurski CJ, Pillow JJ, Polglase GR, et al. Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176 (6): 575-81.
 25. Ho JJ, Henderson-Smart DJ, Davis PG. Early versus delayed initiation of continuous distending pressure for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 2: CD002975
 26. Howson CP, Kinney MV, Lawn JE. Born too soon: the global action report on preterm birth. Geneva: March of Dimes, PMNCH, Save the children and WHO, 2012.
 27. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001, 163(7): 1723-1729.
 28. Jobe AH, Hilman N, Polgase G, Kramer BW, Kallapur S, Pillow J. Injury and inflammation from resuscitation of the preterm infant. *Neonatology*. 2008; 94 (3), 190-196.
 29. Jobe AH, Ikegami M. Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev*. 1998; 53(1): 81-94.
 30. Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, Newham JP, Ikegami M. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res* 2002; 52 (3): 387-92.
 31. 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.
32. Kotecha S, Mildner RJ, Prince LR, Vyas JR, Currie AE, Lawson RA, et al. The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants. *Thorax.* 2003; 58 (11): 961–7.
33. Kotecha S, Silverman M, Shaw RJ, Klein N. Soluble L-selectin concentration in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants who develop chronic lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 78 (2): F143–7.
34. Kotecha S, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. *J Pediatr.* 1996; 128 (4): 464–9.
35. Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res.* 1996; 40 (2): 250–6.
36. Kotecha S. Cytokines in chronic lung disease of prematurity. *Eur J Pediatr.* 1996; 155 (Suppl 2): S14-7.
37. Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000; 82(1): F69-74.
38. Kramer BW, Kallapur S, Newnham J, Jobe AH. Prenatal inflammation and lung development. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009; 14 (1): 2–7.
39. Laughon MM, Smith PB, Bose C. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009, 14 (6): 374-382.
40. Lindner W, Vossbeck S, Hummler H, Pohlandt F. Delivery room management of extremely low birth weight infants: spontaneous breathing or intubation? *Pediatrics.* 1999; 103 (5 pt 1): 961-967.

41. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Reali R, Reggiani A, Bianchi S, et al. Lung inflammation in preterm infants with respiratory distress syndrome: effects of ventilation with different tidal volumes. *Pediatr Pulmonol*. 2006; 41 (4): 357-63.
42. Markos J, Doerschuk CM, English D, Wiggs BR, Hogg JC. Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lung. *J Appl Physiol*. 1993; 74(6): 2627-33.
43. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*. 2013; 7:79.
44. Millipore's. Human Cytokine /Chemokine 96-Well Plate Assay [Internet]. [cited 2013 Jul 6]; Available from: <http://www.millipore.com/userguides>. .
45. Morley CJ, Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB, et al. Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med*. 2008; 358 (7): 700-8.
46. 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): 494-98.
47. Nakanishi H, Sugiura T, Streisand JB, Lonning SM, Roberts Jr JD. TGF-beta neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293 (1): L151-61.
48. Owen LS, Marley CJ, Davis PG. Neonatal nasal intermittent positive pressure ventilation: what do we know in 2007? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92 (5): 414-418.
49. Pandya HC, Kotecha S. Chronic lung disease of prematurity: clinical and pathophysiological correlates. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2001; 56 (3): 270-5.
50. Panomics. Luminex Assays [Internet]. [cited 2013 Jul 23]; Available from: http://www.panomics.com/downloads/LUMINEX_V1.pdf.

51. Quinn DA, Mouffarrej RK, Volokhow A, Hales CA. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*. 2002; 93 (2): 517-525.
52. Rebello CM, Mascaretti RS, Troster EJ, Jobe AH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno – o que é estabelecido e o que precisamos determinar. *J Pediatr (Rio J)*. 2002, 78:S215-26
53. Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldman DA. Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics*. 1993, 91 (3): 617-23.
54. Silveira RC, Schlabendorff M, Procianoy RS. Predictive value of SNAP and SNAPPE for neonatal mortality. *J Pediatr (Rio J)*. 2001; 77(6): 455-60.
55. Snider GL. Interpretation of the arterial oxygen and carbon dioxide partial pressures - a simplified approach for bedside use. *Chest*. 1973; 63 (5): 801-6.
56. Soll RF, Morley C 2001 Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001; (2): CD000510.
57. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5): 354–62.
58. Stevens TP, Harrington EW, Blennow M, Soll RF. Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 17; (4): CD003063.
59. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 1997; 99(5): 944–52.

60. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky A. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin -6 messenger RNA. *Crit Care Med.* 2002; 30 (8):1693-700.
61. Turunen R, Andersson S, Laivuori H, Kajantie E, Siitonen S, Repo H, et al. Increased postnatal inflammation in mechanically ventilated preterm infants born to mothers with early onset preeclampsia. *Neonatology.* 2011; 100 (3): 241-247.
62. Van Marter LJ, Allred EN, Pagano M, Sanocka U, Parad R, Moore M, et al. Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain inter hospital variation in rates of chronic lung disease? *Pediatrics.* 2000, 105 (6): 1194-1201.
63. Wrigge H, Zinserling J, Stuber F, von Spiegel T, Hering R, Wetegrove S, et al. Effects of mechanical ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function. *Anesthesiology.* 2000; 93 (6): 1413-7.

ARTIGO 1 - LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

Artigo submetido para a Revista Brasileira de Terapia Intensiva

LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS

CARVALHO CG (1,2), PROCIANOY RS (1,2,3), SILVEIRA RC (1,2,3)

1 – PPG em Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED – UFRGS

2 – Serviço de Neonatologia, HCPA

3 – Departamento de Pediatria, FAMED – UFRGS

RESUMO

A necessidade de intubação e uso de ventilação mecânica (VM) na prematuridade está relacionada à chamada lesão pulmonar induzida pela ventilação (VILI) e consequente displasia broncopulmonar (DBP). Busca-se a melhor compreensão dos mecanismos de lesão envolvendo resposta inflamatória mediada pelas citocinas para o desenvolvimento de novas estratégias protetoras. Revisamos a base de dados Pubmed incluindo artigos relevantes para unitermos *ventilator induced lung injury preterm, continuous positive airway pressure, preterm, bronchopulmonary dysplasia*. Compilados dados e informações significativas em tópicos, com o objetivo de formar uma visão crítica e plena acerca da lesão induzida pela ventilação e suas consequências ao prematuro. Revisado o papel das citocinas pró-inflamatórias como mediadores da lesão, especialmente IL-6, IL-8, TNF- α . Apresentadas evidências em estudos com animais e também em humanos, mostrando que breves períodos

de VM são suficientes para a liberação dessas interleucinas inflamatórias. Também foram revisadas outras formas de VM e de ventilação não invasiva, como alternativas protetoras aos modos convencionais. Conclui-se que uso de ventilação não invasiva, intubação com administração precoce de surfactante e extubação rápida para CPAP nasal e estratégias que regulam o volume-corrente evitando o volutrauma (como a ventilação com volume garantido) são medidas protetoras da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica no prematuro.

Palavras-chave: Prematuros – Ventilação Mecânica – citocinas – displasia broncopulmonar – pressão positiva contínua na via aérea - lesão pulmonar induzida pela ventilação.

INTRODUÇÃO

Muitos recém-nascidos prematuros com clínica de desconforto respiratório precoce ou Doença de Membrana Hialina respondem bem ao uso de surfactante exógeno, ainda assim, podem evoluir rapidamente para falência respiratória, com necessidade de ventilação mecânica invasiva (VM). A necessidade de intubação e uso de ventilação com pressão positiva está relacionada à chamada lesão pulmonar induzida pela ventilação (*ventilator induced lung injury* - VILI). A displasia broncopulmonar (DBP), por sua vez, está diretamente associada à VILI em prematuros. O período imediato após o nascimento prematuro é aquele de maior risco para VILI, pois é o momento em que os pulmões estão parcialmente preenchidos pelo líquido amniótico, não uniformemente aerados e frequentemente deficientes em surfactante.

A DBP é frequente em prematuros de extremo baixo peso, com incidência de 30 a 75% naqueles que pesam menos de 1000 gramas ao nascimento. Critérios diagnósticos já foram bem estabelecidos¹, disponibilizados na Tabela 1. As consequências a longo-prazo incluem doença crônica que pode persistir na vida adulta, com maior suscetibilidade a

infecções respiratórias, asma, hipertensão pulmonar, internações hospitalares de repetição, atraso no neurodesenvolvimento e mortalidade - com impacto econômico no sistema de saúde. Uma revisão da literatura abrangendo o conhecimento dos mecanismos que levam a lesão induzida pela ventilação e, secundariamente, a DBP, é uma necessidade no nosso meio.

MÉTODOS

Revisão de literatura em base de dados *Pubmed* incluindo apenas artigos publicados nos últimos 10 anos e restritos a área da neonatologia e usando os unitermos: *ventilator induced lung injury and preterm*, com 581 resultados, *continuous positive airway pressure, preterm*, encontrando-se 355 estudos clássicos sobre CPAP nasal, e *bronchopulmonary dysplasia and preterm* com 1065 estudos; sendo 139 estudos com emprego do CPAP e/ou Ventilação Mecânica. Em um primeiro momento foram revisados os títulos e resumos disponíveis no Pubmed. Excluídos artigos não referentes ao período neonatal e apenas sobre displasia broncopulmonar, selecionados aqueles experimentais e clínicos que incluíam *ventilator induced lung injury and preterm*. Compilados dados e informações significativas em tópicos, com o objetivo de formar uma visão crítica e plena acerca da lesão induzida pela ventilação e suas consequências ao prematuro.

A inflamação na origem da doença pulmonar crônica do prematuro

O sistema respiratório do recém-nascido prematuro é mais suscetível à VILI em virtude de algumas características específicas, como menor quantidade de colágeno e elastina, além de uma menor capacidade residual funcional após o nascimento prematuro, resultante de disfunção quantitativa e qualitativa do surfactante pulmonar². A ramificação e expansão dos espaços de ar para formar sáculos, afinamento do mesênquima e síntese de surfactante por pneumócitos tipo-2 ocorrem mais tarde na gestação, e qualquer dano nos estágios precoces do

crescimento pulmonar pode alterar esse processo com sequelas futuras. As reações inflamatórias também estão associadas ao crescimento vascular anormal, danificando as vias aéreas distais do pequeno paciente.

Tensão de cisalhamento, volume inspiratório, pressão do ar, alta concentração de oxigênio, estão envolvidos na lesão às células do epitélio respiratório. Ocorre extravasamento de proteínas nas vias aéreas, inibindo a função do surfactante e aumentando a infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos. Além disso, a VM pode causar resposta inflamatória sistêmica, com ativação de fagócitos na circulação e ativação de linfócitos T CD4 e CD8, produzindo mediadores inflamatórios³.

As citocinas inflamatórias

As citocinas contribuem para a patogênese de várias doenças através das habilidades de induzir a liberação de outros mediadores inflamatórios, recrutar neutrófilos e aumentar a permeabilidade vascular. As citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na patogênese de quase todos os processos de doença no prematuro, principalmente na modulação de danos no sistema nervoso central, nos intestinos e nos pulmões, demonstrando-se aumento dos níveis de citocinas na sepse e em formas moderadas a graves de DBP⁴.

Essas citocinas iniciam programas de transcrição em várias outras células que não são imediatamente responsivas ao insulto inicial e, portanto, amplificam e estendem a resposta inflamatória. Elas também são responsáveis por atrair células inflamatórias ao sítio de lesão, através de *up regulation* da expressão de moléculas de adesão intra-celulares (ICAM)⁵ e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM).

A inflamação tem impacto direto na integridade do tecido local e, independentemente do fator causador, envolve um grande número de mediadores-chave. A interleucina-6 (IL-6), a interleucina 1- β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são três citocinas de fase

aguda expressadas logo em seguida do dano pulmonar. Há aumento da expressão local da interleucina-8 (IL-8), quimiocina que atrai os neutrófilos ao foco inflamatório, especialmente em recém-nascidos que posteriormente desenvolvem DBP⁶.

A IL-10 é uma citocina de ação anti-inflamatória, cuja expressão é mais tardia e secundária ao aumento de expressão da IL-8⁷. Prematuros podem ter produção deficiente de interleucinas regulatórias, como a IL-10, sendo, portanto, mais predispostos a uma resposta inflamatória aumentada e/ou acentuada⁸.

A interação fisiopatológica entre desenvolvimento pulmonar e inflamação foi estudada em modelos animais. Administração intrauterina de endotoxina no líquido amniótico de cordeiros prematuros alterou a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), com remodelamento vascular, o qual precederia a simplificação alveolar⁹. Experimentos em adultos e *in vitro* mostraram que a distensão alveolar sozinha produz resposta pro-inflamatória aumentando a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , o que provavelmente contribui para a patogênese de displasia¹⁰. Alisson et al¹¹ demonstraram experimentalmente que a ventilação intra útero *per si* promove alterações significativas no desenvolvimento pulmonar.

O fator de crescimento transformador (TGF- β) encontra-se aumentado no lavado pulmonar de neonatos que desenvolveram DBP¹². A importância potencial dessa citocina como alvo terapêutico na DBP foi destacada em um estudo com ratos: uso de anticorpos específicos para neutralizar níveis elevados de TGF- β em pulmões com hiperóxia melhoraria a alveolarização, a deposição de elementos de matriz extracelular e o desenvolvimento microvascular, normalizando o desenvolvimento pulmonar¹³. De modo semelhante, anticorpos contra quimiocinas específicas neutrofilicas utilizados em ratos expostos a hiperóxia preservaram o desenvolvimento pulmonar normal, consistente com a ideia de que reduzir a inflamação no pós-natal imediato pode resultar em benefícios a longo prazo em neonatos com dano pulmonar¹⁴.

Momento da liberação das citocinas na VILI

Existem controvérsias a respeito do exato momento de liberação dessas citocinas na resposta inflamatória pulmonar. Quinn et al¹⁵ ventilaram ratos adultos por duas horas e detectaram que os níveis de IL-8 em lavado bronco-alveolar eram os mesmos que nos controles, mas 4 horas depois aumentavam bastante, sugerindo uma expressão mais tardia de citocinas. Hillman et al¹⁶ demonstraram em cordeiros que a ventilação breve por 15 minutos induzia aumento das citocinas nos pulmões. Capoluongo et al¹⁷ reportaram que as citocinas séricas nos dias 1, 3 e 5 em lactentes em ventilação oscilatória de alta frequência eram menores do que naqueles em ventilação mandatória intermitente. A VM por 1 h em humanos adultos sem doença pulmonar prévia não causou mudanças nos níveis de mediadores inflamatórios¹⁸.

Os estudos em prematuros muito pequenos que documentam a inflamação sistêmica associada a ventilação tem sido limitados a um número pequeno de sujeitos e de mediadores inflamatórios. Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa¹⁹ com recém-nascidos a termo e prematuros tardios mostrou que a VM, como um estímulo único e mesmo por curto período, induziria a liberação plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) em recém-nascidos 2 horas após serem submetidos a ventilação, sugerindo que a cascata de eventos que leva a inflamação pulmonar e remodelamento nos neonatos possa começar dentro de 2 horas após a intubação. Nos pacientes desse estudo, a IL -10 reduziu de modo significativo após as 2 horas de ventilação. Dessa forma, demonstramos nesse estudo - e em dados não publicados – uma coexpressão de citocinas ativadoras e desativadoras. Importante salientar o dado recente de que a IL-10 em baixos níveis foi associada com DBP em prematuros⁸. Esses achados suportam o uso de estratégias que evitem a intubação e ventilação com pressão positiva sempre que possível, mesmo que difícil de ser evitada em neonatos muito prematuros.

Outros mecanismos de lesão relacionados

Os prematuros frequentemente necessitam de ajuda para iniciar a respiração, pois líquido amniótico residual e deficiência de surfactante podem impedir o estabelecimento da capacidade residual funcional (CRF). O uso de ventilação mecânica para estabelecer CRF pode piorar as condições do pulmão através dos mesmos mecanismos de agressão descritos anteriormente, como as lesões ao endotélio capilar, ao epitélio alveolar e à membrana basal, resultando em extravasamento de fluidos, proteínas e sangue para o interior das vias aéreas, dos alvéolos e do interstício pulmonar, com conseqüente inibição do surfactante e ativação das respostas inflamatórias local e sistêmica²⁰.

Os mecanismos diretos e conhecidos da agressão promovida pela ventilação mecânica são: barotrauma, volutrauma, atelectrauma e, mais recentemente, o biotrauma.

O **barotrauma** ocorre quando a ventilação é realizada com pressões altas, havendo, portanto, um maior risco de síndromes de escape de ar como enfisema intersticial, pneumotórax ou pneumomediastino, que culminam na ativação da cascata inflamatória. A ventilação no RN é geralmente ciclada a tempo e limitada a pressão, sem controlar o volume de gás fornecido aos pulmões; entretanto, estudos em animais demonstraram que são as mudanças no volume pulmonar, e não na pressão gerada no interior das vias aéreas, que determinam a lesão pulmonar²¹.

Volutrauma é quando ocorre insuflação pulmonar inadequada, conseqüente a hiperexpansão do parênquima pulmonar - localizada ou generalizada. Foi demonstrado que os pulmões são lesados se inflados a um volume maior que a capacidade pulmonar total, resultando em lesão estrutural alveolar por estiramento, migração dos leucócitos para os pulmões, aumento da permeabilidade capilar pulmonar, com edema tanto intersticial como alveolar. Contudo, a lesão também ocorre em volumes correntes (V_t) menores, que podem hiperdistender as porções ventiladas de um pulmão parcialmente colabado. A lesão por

hiperdistensão estimula a produção de citocinas pulmonares, incluindo IL-6 e IL-8, conforme foi demonstrado em estudo com cordeiros²² que foram submetidos a Vt elevado por curto período e depois deixados em Vt mais fisiológicos – os níveis ficavam mais baixos se o Vt utilizado fosse mais baixo. Em RNs, as lesões por hiperdistensão podem se instalar mesmo com poucas ventilações utilizando grande Vt, por períodos tão curtos quanto 30 minutos, indicando a importância da reanimação em sala de parto com uso de PEEP adequada²³.

O **atelectrauma** é resultado da pouca expansão do parênquima pulmonar, regional ou total. A lesão pulmonar está associada à instabilidade alveolar: com os sucessivos episódios de reabertura e colapamento das paredes alveolares, ocorre lise de elementos estruturais que compõem o interstício pulmonar - desencadeando resposta inflamatória local e sistêmica. Modelos de deficiência de surfactante demonstraram que a ventilação mecânica com baixos volumes resulta na liberação de citocinas e início da cascata inflamatória, que nem no volutrauma²⁴.

O **biotrauma** é a liberação de fatores inflamatórios secundários a lesões físicas encontradas tanto no volutrauma como no atelectrauma. É o responsável pela amplificação das lesões pulmonares mecânicas iniciais e também por lesões em órgãos à distancia²⁵. A lesão pulmonar aumenta o número de células e de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica, permitindo também a translocação bacteriana e a liberação de endotoxinas do espaço aéreo, o que agrava o processo inflamatório pulmonar.

Portanto, a ventilação pulmonar promove inflamação e lesão direta ao pulmão do prematuro. Há a necessidade de determinar estratégias preventivas de lesão induzida pela ventilação.

Prevenção da Lesão Pulmonar

Evidências em animais sugerem que a inflamação pulmonar devida à VM possa levar a morbidade respiratória em longo prazo^{26, 27, 11}. O uso de volumes correntes altos e sem PEEP resultaram em aumento da concentração de citocinas no pulmão do rato²⁶. Por outro lado, estudo em cordeiros testou o uso de insuflação pulmonar sustentada previamente ao uso de VM com intuito de melhorar o recrutamento e estabelecimento da CRF, o que por si só foi suficiente para elevar as citocinas pró-inflamatórias²⁷. A VM gentil em carneiros recém-nascidos, mesmo por curto período de tempo, resultou em recrutamento de neutrófilos nos pulmões, com expressão de citocinas pró-inflamatórias, com morfologia pulmonar alterada semelhante a displasia¹¹. Esses achados, somados ao observado em recém-nascidos humanos¹⁹, justificam a procura de outras modalidades de ventilação, como a ventilação não invasiva e o emprego precoce de CPAP na sala de parto - estratégias promissoras na prevenção da lesão induzida pela VM em pretermos extremos^{28,29}.

Ventilação Não Invasiva na Prevenção da Lesão Pulmonar

CPAP NASAL

Embora dados da rede NEOCOSUR³⁰ não tenham demonstrado uma redução das taxas de DBP, o efeito de facilitar o início da respiração espontânea, manter recrutamento alveolar com pressão positiva contínua e reduzir a utilização de VM em pré-termos são ações protetoras do uso do CPAP. Em alguns estudos epidemiológicos, a substituição da ventilação mecânica pelo CPAP nasal foi associada à redução da DBP^{31,32}. Assim, há um interesse renovado no uso do mesmo para facilitar o início da respiração espontânea e reduzir a ventilação mecânica em pré-termos.

Tem-se demonstrado a fácil aplicação do CPAP precoce³³, sua utilização reduz a necessidade de ventilação mecânica e é frequentemente usado para facilitar a extubação e

tratar apnéia da prematuridade. Um grande estudo clínico que randomizou 610 RNs entre 25 e 28 semanas em sala de parto para uso de CPAP precoce versus intubação com VM no quinto minuto de vida (estudo COIN) não mostrou redução de incidência de DBP ou mortalidade no grupo CPAP²⁸. Quando o CPAP foi usado na fase aguda da angustia respiratória, mostrou reduzir o tempo de dependência do O₂ e de ventilação.

Sabe-se que o surfactante pode ser efetivamente administrado a recém-nascidos em CPAP nasal com período breve de intubação seguido de rápida extubação ao CPAP, processo chamado de INSURE. Essa técnica visa reduzir a exposição à VM dos pacientes com indicação de surfactante exógeno para o tratamento da DMH, significando IN=intubation, SUR=surfactant e E=extubation. Metanálise publicada em 2007³⁴ comparou INSURE precoce com o uso tardio de surfactante e VM contínua, demonstrando que o procedimento precoce foi associado a menor necessidade posterior de VM, menor incidência de DBP, menores taxas de síndromes de escape de ar. Tendo em vista esses dados, se observa que a técnica de intubação com administração precoce de surfactante e extubação rápida para CPAP nasal é uma medida protetora da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos efeitos benéficos do CPAP não foram avaliados; especula-se que a redução das taxas de DBP ocorra apenas por se estar evitando a ventilação agressiva com altos volumes correntes e hiperventilação não advertida.

Os efeitos do CPAP na inflamação pulmonar só foram demonstrados em animais. Mesmo dados experimentais são controversos: cordeiros pré-termo submetidos ao uso de CPAP traqueal apresentaram, duas horas após uso, níveis de citocinas ligeiramente menores em relação àqueles submetidos a VM³⁵. Por outro lado, Polglase *et al.*³⁶, em modelo experimental de estímulo inflamatório tipo o lipopolissacarídeo bacteriano, não encontraram menor resposta inflamatória pelo uso de CPAP, sugerindo um efeito limitado do uso do CPAP quando aos pulmões imaturos soma-se um estímulo infeccioso. Esse estudo avaliou efeito do

CPAP traqueal e não CPAP nasal, o que permite especularmos que o estímulo da pressão positiva contínua na traqueia promova uma ação inflamatória direta ao pulmão com elevação de citocinas inflamatórias.

Estudamos prematuros entre 28 e 35 semanas de idade gestacional com disfunção respiratória precoce moderada, onde a primeira modalidade ventilatória foi o CPAP nasal, ainda dentro das primeiras 6 horas de vida, e encontramos valores significativamente menores de citocinas pró-inflamatórias após duas horas de instituído CPAP, demonstrando que essa estratégia é menos lesiva (dados ainda não publicados).

Alguns recém-nascidos submetidos ao uso de CPAP precoce desenvolvem insuficiência respiratória devido à doença pulmonar em evolução, apneia da prematuridade ou atelectasia progressiva. As taxas de falha na extubação com o uso de CPAP são de 25-40% nos neonatos de baixo peso de nascimento³⁷. Novas técnicas de administração de surfactante sob uso de CPAP sem a necessidade de introdução de um tubo endotraqueal estão sendo implementadas (minimally-invasive surfactant therapy - MIST) com sucesso³⁸. Outros esforços para reduzir essa falha incluem a ventilação nasal de pressão positiva intermitente (NIPPV), que pode proporcionar suporte o suficiente para evitar a intubação em algumas crianças.

VENTILAÇÃO NASAL DE PRESSÃO POSITIVA INTERMITENTE

O uso de NIPPV está bem estabelecido em muitas condições pediátricas e adultas. Costuma ser utilizada através de máscaras ou peças nasal que podem ser longas ou curtas, únicas ou em ambas narinas, sincronizando ou não com a inspiração do recém-nascido. Outros termos utilizados para essa modalidade ventilatória são: CPAP com pressão de pico, ventilação sincronizada mandatória intermitente nasofaríngea (NP-SIMV) e pressão positiva em vias aéreas bi-nível nasal (N-BiPAP)³⁹.

Usaremos a nomina ventilação nasal de pressão positiva intermitente, nessa revisão. Essa modalidade ventilatória proporciona dois níveis de pressão que se alternam modificando a CRF do neonato, recrutando alvéolos instáveis ou prevenindo seu colapso, com a geração de volume corrente pela pressão delta entre dois níveis pressóricos que alivia o trabalho respiratório. Outras hipóteses de funcionamento da NIPPV são o aumento da dilatação faríngea, com melhora do drive respiratório, a indução de reflexo paradoxal de cabeça, o aumento da pressão média de via aérea permitindo o recrutamento alveolar, aumento do V_t e do volume minuto³⁹.

Dois ensaios clínicos randomizados revelaram que a NIPPV precoce reduziu a necessidade de intubação dentro das primeiras 72 horas de vida quando comparado com CPAP nasal: Kugelman *et al.*⁴⁰ acharam diferença significativa, mas com falha da NIPPV associada com mais baixos pesos de nascimento, e subsequentemente, Sai Sunil Kishore *et al.*⁴¹ demonstraram que a evolução para VM com 48 horas foi significativamente menor dentre os recém-nascidos no grupo NIPPV (13,5 vs 35,9%).

Bhandari *et al.*⁴² avaliaram NIPPV sincronizada e encontraram menos desfechos de displasia ou morte no grupo NIPPV comparado com VM. O impacto do CPAP nasal comparado com NIPPV sincronizada na incidência de displasia foi avaliado em um grande estudo retrospectivo, com prematuros ao redor de 1250g. No subgrupo daqueles nascidos com 500 a 750g, o NIPPV foi associado à redução na incidência de DBP ($p=0,01$), assim como DBP e morte ($p=0,01$), quando em comparação com o CPAP⁴³. Esses resultados sugerem que NIPPV seja aplicável e efetiva, e resulte em menor incidência de displasia em comparação com a VM.

Estudo brasileiro, avaliando como desfecho a necessidade de intubação de resgate, sugeriu que a NIPPV é aplicável, segura e pode ter efeitos benéficos quando comparadas com CPAP nasal, especialmente para recém-nascidos acima de 1000g de peso de nascimento⁴⁴. A

literatura é falha em estudos que possam avaliar qual o modo de suporte respiratório não invasivo precoce (logo após nascer) ou primário (após a intubação breve e uso de surfactante) pode afetar a displasia broncopulmonar e desfechos em longo prazo.

Encontramos apenas um estudo avaliando as citocinas inflamatórias em prematuros entre 28 e 35 semanas submetidos a CPAP nasal ou NIPPV⁴⁵, não havendo diferença nos níveis de interleucinas entre os dois grupos no 1° e no 7° dias de vida. Por outro lado, os prematuros que usaram NIPPV tiveram alta mais precoce.

Outros tipos de ventilação mecânica e seu efeito na inflamação pulmonar

VENTILAÇÃO DE ALTA FREQUÊNCIA

A ventilação de oscilação de alta frequência (HFOV) é desenvolvida de forma a evitar as grandes mudanças em pressão e volume, observadas durante a ventilação mecânica convencional. Teoricamente, é mais eficiente em recrutar áreas de atelectasia, especialmente no neonato com deficiência de surfactante. Quando comparada a VM convencional, foi demonstrado que ambas as modalidades são equivalentes quanto a mortalidade e quanto a incidência de hemorragia peri-ventricular⁴⁶.

O tratamento precoce com HFOV é associado com uma redução na inflamação pulmonar mediada por citocinas (níveis mais baixos de IL-8 no grupo HFOV), em comparação com ventilação com pressão de suporte (PSV) associada à ventilação com volume-garantido em pré-termos com desconforto respiratório precoce⁴⁷.

NOVOS TIPOS DE VM PROTETORAS

A ventilação mecânica limitada por pressão que libera uma PIP fixa é a que tem sido tradicionalmente utilizada para controlar a $paCO_2$: nesse método o V_t varia de forma ampla. Os estudos realizados com ventilação mecânica convencional de diversos tipos não

conseguiram demonstrar diferenças consistentes quanto a DBP e mortalidade⁴⁸. VM convencional sincronizada (SIMV) com pressões inspiratórias baixas, a fim de ventilar o recém-nascido de uma maneira gentil dentro das possibilidades locais, é uma estratégia bastante empregada. Contudo, controlar o Vt ao invés de controlar a PIP parece uma estratégia mais lógica para ventilar pré-termos.

A ventilação com volume pré-selecionado (VPS) proporciona um Vt que permanece constante dentro de cada insuflação, reduzindo o risco de volutrauma. Uma revisão sistemática⁴⁹ comparou os dois tipos de VM em 556 prematuros, demonstrando que a VPS foi associada a redução significativa dos desfechos combinados de morte e DBP, e também hemorragia grau 3-4 ou leucomalácia, mas redução de DBP sozinha foi de significância estatística *borderline*.

A ventilação por volume-garantido (VVG) é um modo volume-controlado, ciclado a tempo ou fluxo e limitado à pressão, que controla o Vt expirado, proporciona ajustes da PIP a cada respiração para atingir o Vt determinado, e vem sendo usado em 80% das UTI terciárias da Austrália e países nórdicos que utilizam VPS⁵⁰. O aparelho analisa o volume corrente de uma respiração prévia usando o fluxo expiratório para levar em conta qualquer extravasamento e assim ajustar a pressão e obter o volume corrente alvo. Controlando o Vt expirado, esse modo é menos influenciado pelo escape do tubo e pode ser usado com escapes de até 50%. Conforme a complacência do pulmão do recém-nascido melhora, a PIP necessária para fornecer um volume alvo cai, permitindo um auto-desmame das pressões fornecidas para o neonato.

O efeito na inflamação pulmonar mediada pelas citocinas nesses outros modos de ventilação não é descrito.

CONCLUSÃO

Os modos de ventilação não invasivos são técnicas já não tão recentes no nosso meio, mas que parecem promissoras por se tratarem de modalidade com menor resposta inflamatória e com um possível papel protetor na VILI.

A técnica de intubação com administração precoce de surfactante e extubação rápida para CPAP nasal é uma medida protetora da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica no prematuro. Além disso, estratégias que regulam o Vt evitando o volutrauma - ventilação com volume pré-selecionado, especialmente a ventilação com volume-garantido, parecem reduzir a taxa de displasia broncopulmonar.

Uma nova compreensão dos mecanismos de lesão envolvendo resposta inflamatória mediada pelas citocinas está possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias protetoras; pequenos passos para o estudo de fatores de prevenção da displasia broncopulmonar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001, 163(7): 1723-1729.
2. Rebello CM, Mascaretti RS, Troster EJ, Jobe AH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno – o que é estabelecido e o que precisamos determinar. *J Pediatr (Rio J).* 2002, 78:S215-26.
3. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci.* 2013; 7:79.
4. Lista G, Castoldi F, Fontana P, et al. Lung inflammation in preterm infants with respiratory distress syndrome: effects of ventilation with different tidal volumes. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41:357-63.

5. Kotecha S, Silverman M, Shaw RJ, Klein N. Soluble L-selectin concentration in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants who develop chronic lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 78 (2): F143–7.
6. 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.
7. 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.
8. 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; 52:973-8.
9. Kramer BW, Kallapur S, Newnham J, Jobe AH. Prenatal inflammation and lung development. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009; 14 (1): 2–7.
10. Frank JA, Parsons PE, Matthay MA. Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. *Chest.* 2006, 130:1906-14.
11. Allison BJ, Crossley KJ, Flecknoe SJ, Davis PG, Morley CJ, Harding R, et al. Ventilation of the very immature lung in utero induces injury and BPD-like changes in lung structure in fetal sheep. *Pediatr Res.* 2008; 64:387-92.
12. Kotecha S, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. *J Pediatr.* 1996; 128 (4): 464–9.

13. Nakanishi H, Sugiura T, Streisand JB, Lonning SM, Roberts Jr JD. TGF-beta neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293 (1): L151–61.
14. Auten RL, Richardson RM, White JR, Mason SN, Vozzelli MA, Whorton MH. Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxiaexposed newborn rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299 (1): 90–5.
15. Quinn DA, Mouffarrej RK, Volokhow A, Hales CA. Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*. 2002; 93:517-525.
16. Hillman NH, Moss TJM, Kallapur SG, Bachurski CJ, Pillow JJ, Polglase GR, et al. Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176: 575-81.
17. Capuolongo E, Vento G, Santonocito C, Matassa PG, Vaccarella C, Giardina B, et al. Comparison of serum levels of seven cytokines in premature newborns undergoing different ventilatory procedures: high frequency oscillatory ventilation or synchronized intermittent mandatory ventilation. *Eur Cytokine Netw*. 2005; 16:199-205.
18. Wrigge H, Zinserling J, Stuber F, von Spiegel T, Hering R, Wetegrove S, et al. Effects of mechanical ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function. *Anesthesiology*. 2000; 93: 1413-7.
19. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical Ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr*. 2010; 156: 16-9.
20. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157(1): 294-323.

21. Auten RL, Vozzelli M, Clark RH. Volutrauma. What is it, and how do we avoid it? *Clin Perinatol.* 2001; 28:505-15.
22. Wallace MJ, Probyn ME, Zahra VA, Crossley K, Cole TJ, Davis PG, et al. Early biomarkers and potential mediators of ventilation-induced lung injury in very preterm lambs. *Respir Res.* 2009; 10:19.
23. Stenson BJ, Boyle DW, Szyld EG. Initial ventilation strategies during newborn resuscitation. *Clin Perinatol.* 2006; 33: 65-82.
24. Froese AB, McCulloch PR, Sugiura M, Vaclavik S, Possmayer F, Moller F. Optimizing alveolar expansion prolongs the effectiveness of exogenous surfactant therapy in the adult rabbit. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148:569-77.
25. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2003; 289:2104-12.
26. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 1997; 99(5): 944-52.
27. Hillman NH, Kemp MW, Noble PB, Kallapur SG, Jobe AH. Sustained Inflation at birth did not protect preterm fetal sheep from lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013
28. Morley CJ, Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB, et al. Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med.* 2008; 358 (7): 700-8.
29. Finner NN, Carlo WA, Walsh MC, Rich W, Gantz MG, Laptook AR, et al. Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N Engl J Med.* 2010; 362 (21): 1970-79.

30. Tapia JL, Urzua S, Bancalari A, Meritano J, Torres G, Fabres J, et al. Randomized trial of early bubble continuous positive airway pressure for very low birth weight infants. *J Pediatr*. 2012;161(1):75-80.
31. Aly H, Milner JD, Patel K, El-Mohandes AAE. Does the experience with the use of nasal continuous positive airway pressure improve over time in extremely low birth weight infants? *Pediatrics*. 2004; 114(3):697-702.
32. Te Pas AB, Lopriore E, Engbers MJ, Walther FJ. Early respiratory management of respiratory distress syndrome in very preterm infants and bronchopulmonary dysplasia: a case-control study. *PLoS one*. 2007;2(2): e192.
33. Finer N, Carlo W, Duara S, Fanaroff AA, Donovan EF, Wright LL, et al. Delivery room continuous positive airway pressure/ positive end-expiratory pressure in extremely low birth weight infants: a feasibility trial. *Pediatrics*. 2004; 114 (3): 651-57.
34. Stevens TP, Harrington EW, Blennow M, Soll RF. Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 17; (4): CD003063.
35. Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, Newham JP, Ikegami M. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res*. 2002; 52 (3): 387-92.
36. Polglase GR, Hillman NH, Ball MK, Kramer BW, Kallapur SG, Jobe AH, et al. Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation. *Pediatr Res*. 2009; 65(1): 67-71.
37. Davis PG, Henderson-Smart DJ. Nasal continuous positive airways pressure immediately after extubation for preventing morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003: 2: CD000143.

38. Dargaville PA, Aiyappan A, Cornelius A, Williams C, De Paoli AG. Preliminary evaluation of a new technique of minimally invasive surfactant therapy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2011; 96 (4): F243–248.
39. Owen LS, Marley CJ, Davis PG. Neonatal nasal intermittent positive pressure ventilation: what do we know in 2007? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007; 92:414-418.
40. Kugelman A, Feferkorn I, Riskin A, Chistyakov I, Kaufman B, Bader D. Nasal intermittent mandatory ventilation versus nasal continuous positive airway pressure for respiratory distress syndrome: a randomized, controlled, prospective study. *J Pediatr.* 2007; 150 (5):521-526.
41. Sai Sunil Kishore M, Dutta S, Kumar P. Early nasal intermittent positive pressure ventilation versus continuous positive airway pressure for respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr.* 2009; 98(9): 1412-15.
42. Bhandari V, Gavino RG, Nedrelow, et al. A randomized controlled trial of synchronized nasal intermittent positive pressure ventilation in RDS. *J Perinatol.* 2007; 27(11): 697-703.
43. Bhandari V, Finer NN, Ehrenkranz RA, et al. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Synchronized nasal intermittent positive-pressure ventilation and neonatal outcomes. *Pediatrics.* 2009; 124 (2): 517-526.
44. Meneses J, Bhandari V, Alves JG, Herrmann D. Noninvasive ventilations for respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Pediatrics.* 2011; 127: 300-307.
45. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Daniele I, Cavigioli F, Rossi S, Mancuso D, Reali R. Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) versus bi-level nasal CPAP in preterm babies with respiratory distress syndrome: a randomized control Trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010;95:F85-89.

46. Courtney SE, Durand DJ, Asselin JM, Hudak ML, Aschner JL, Shoemaker CT, Neonatal Ventilation Study Group. High-frequency oscillatory ventilation versus conventional mechanical ventilation for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med.* 2002; 347(9):643-52.
47. Dani C, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Pratesi S, Caviglioli C, Rubaltelli FF. Effects of pressure support ventilation plus volume guarantee vs. high-frequency oscillatory ventilation on lung inflammation in preterm infants. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41(3):242-9.
48. van Kaam AH, Rimensberger PC. Lung-protective ventilation strategies in neonatology: what do we know, what do we need to know? *Crit Care Med.* 2007, 35(3): 925-31.
49. Wheeler KI, Klingenberg C, Morley CJ, Davis PG. Volume-targeted versus pressure-limited ventilation for preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Neonatology.* 2011; 100:219-227.
50. van Kaam AH, Rimensberger PC, Borensztajn D, De Jaegere AP. Ventilation practices in the neonatal intensive care unit: a cross-sectional study. *J Pediatr.* 2010; 157: 767–771.

Tabela 1: Classificação de gravidade da DBP

Tratamento com oxigênio suplementar por 28 dias e:

Idade Gestacional	Leve	Moderada	Grave
< 32 sem	AA com 36 sem IGC ou na alta	$FiO_2 < 0,3$ com 36 sem IGC ou na alta	$FiO_2 \geq 0,3$ com 36 sem IGC ou na alta
≥ 32 sem	AA com 56 dias ou na alta	$FiO_2 < 0,3$ com 56 dias ou na alta	$FiO_2 \geq 0,3$ com ou sem suporte de pressão positiva com 56 dias ou na alta

AA: ar ambiente IGC: idade gestacional corrigida FiO_2 : fração inspirada de O_2

ARTIGO 2 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS ANTES E APÓS USO DE SUPORTE VENTILATÓRIO A PREMATUROS COM DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA PRECOCE.

Artigo Submetido para o Intensive Care Medicine

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS ANTES E APÓS USO DE SUPORTE VENTILATÓRIO A PREMATUROS COM DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA PRECOCE

CARVALHO CG (1,2), PROCIANOY RS (1,2,3), NETO, EC (4), SILVEIRA RC (1,2,3)

1 – PPG em Saúde da Criança e do Adolescente, FAMED – UFRGS

2 – Serviço de Neonatologia, HCPA

3 – Departamento de Pediatria, FAMED – UFRGS

4 – Laboratório NOBEL

RESUMO

Introdução: Ventilação mecânica (VM) induz expressão de citocinas pró-inflamatórias em modelos experimentais e estudo clínico, parecendo o emprego precoce de CPAP nasal (CPAPn) estratégia promissora na prevenção da lesão pulmonar induzida pela ventilação - contudo efeitos protetores não estudados em humanos. **Objetivo:** avaliar os níveis plasmáticos da interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α em recém-nascidos tão logo instituído CPAPn ou VM e duas horas após. **Metodologia:** coorte prospectivo, incluindo recém-nascidos (RNs) admitidos com idade gestacional (IG) de 28-35 semanas e necessidade de assistência ventilatória, excluindo malformações, infecção congênita, sepse, surfactante e suporte ventilatório em sala de parto. Amostras de sangue coletadas nesses dois momentos. Realizada descrição das variáveis em medianas e interquartis (p25-p75), empregado Teste de Wilcoxon. **Resultados:** 43 RNs, médias de peso 1883,5 \pm 580g

e IG $32 \pm 2,4$ semanas, 23 (53%) receberam CPAPn como primeira modalidade ventilatória. Pré-termos após duas horas de VM apresentaram níveis significativamente maiores de IL-6, TNF- α e IL-8. Já os níveis de IL-6 reduziram significativamente após duas horas de CPAPn. Em 68% dos neonatos cujas mães receberam corticoide pré-natal, as medianas das citocinas foram menores no início do uso do CPAPn, mas esse efeito não se sustentou duas horas após.

Conclusão: demonstramos que RNs em uso de CPAPn apresentam mínima liberação de citocinas pró-inflamatórias, apresentando essa modalidade um possível papel protetor - nesse estudo potencializado pelo uso de corticoide ante-natal. Por outro lado, VM promove significativa resposta inflamatória, estimulando-se CPAPn como estratégia ventilatória inicial menos lesiva ao pré-termo com desconforto respiratório moderado.

Palavras-chave: citocinas, CPAP nasal, prematuros, lesão induzida pelo ventilador.

INTRODUÇÃO

O emprego precoce de ventilação mecânica (VM) induz à expressão de citocinas pró-inflamatórias em modelos experimentais e estudo clínico^{1,2}. Em muitos estudos epidemiológicos, a substituição da VM pelo uso da pressão contínua positiva nasal em via aérea (CPAPn) foi associada à redução de DBP³⁻⁷.

A ventilação não invasiva e o emprego precoce de CPAPn na sala de parto parecem estratégias promissoras na prevenção da lesão induzida pela VM em prematuros extremos⁸⁻¹⁰. Embora dados da rede¹¹ NEOCOSUR não tenham demonstrado redução das taxas de DBP, o efeito de facilitar o início da respiração espontânea, manter recrutamento alveolar com pressão positiva contínua e reduzir a utilização de VM em pré-termos são ações protetoras do CPAPn. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos efeitos benéficos do CPAPn não foram avaliados; especula-se que a redução das taxas de DBP ocorra apenas por se estar

evitando a ventilação agressiva com altos volumes correntes e hiperventilação não advertida¹².

O papel da VM no pré-termo tratado com surfactante e a resultante elevação persistente das células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias nos pulmões já é bem conhecido – contudo os possíveis efeitos protetores do CPAPn na lesão pulmonar induzida pela ventilação (VILI) só foram estudados em animais¹³.

É possível que o uso de CPAPn, mesmo por curto período de tempo, possa evitar estímulos pró-inflamatórios lesivos ao pulmão. Assim, nosso objetivo primário foi avaliar os níveis plasmáticos da interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α em recém-nascidos tão logo instituído CPAPn e duas horas após. Secundariamente, foi comparada essa possível resposta inflamatória do CPAPn com os níveis de citocinas antes e após Ventilação Mecânica em grupo de recém-nascidos prematuros que requerem essa estratégia.

Métodos:

Estudo de coorte prospectivo incluindo recém-nascidos admitidos de setembro de 2011 a maio de 2013, com idade gestacional de 28 a 35 semanas, com necessidade de uso de CPAPn ou de VM como primeira estratégia de assistência ventilatória nas primeiras 72 horas de vida. Critérios de exclusão: malformações congênitas ou síndromes cromossômicas, infecção congênita do grupo STORCH, sepse comprovada, meningite, necessidade de suporte ventilatório com qualquer pressão positiva em sala de parto, uso de óxido nítrico e surfactante antes da inclusão no estudo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Instituição sob número 11-0325 e consentimento informado foi lido e obtido dos pais ou responsáveis antes da entrada no estudo.

Foram coletados os seguintes dados: idade gestacional, determinada pela data da última menstruação e confirmada por ultrassom no primeiro trimestre e/ou exame clínico neonatal¹⁴, peso ao nascer, sexo, escore de Apgar no quinto minuto, necessidade de reanimação em sala de parto, tipo de parto, além da determinação de presença de pré-eclâmpsia, ruprema e/ou corioamnionite materna.

O cálculo do escore de *SNAPPE-II* foi realizado após 12 horas do nascimento¹⁵ para todos os pacientes. DBP foi definida pela necessidade de uso de oxigênio além de 28 dias de vida¹⁶. Uso de corticoide pré-natal foi considerado apenas para mães que receberam duas doses de betametasona antes do parto.

Os recém-nascidos foram seguidos do nascimento até o início do uso do suporte ventilatório, quando era coletado sangue para gasometria arterial conforme a rotina do Serviço – assim, era coletada uma alíquota adicional de 500 µL em tubo de EDTA para posterior análise de citocinas, sem necessidade de coleta de amostra exclusivamente para pesquisa. Após duas horas no uso da ventilação de eleição, conforme necessidade de cada recém-nascido, a segunda amostra era coletada para nova gasometria e alíquota adicional em tubo EDTA para dosagens de citocinas. As amostras de sangue eram imediatamente centrifugadas por dez minutos a 3000 rotações por minuto (RPM) a fim de obter 300 µL de plasma, que era congelado a -80°C, identificando-se pelo número e momento da coleta da amostra para posterior análise laboratorial conjunta das citocinas.

As medidas das citocinas foram realizadas usando o *kit MILLIPLEX[®] Human Cytokine / Chemokine MPXHCYTO-60K* (Millipore Corp, Missouri, USA), comercialmente disponível. As leituras realizadas pelo *Luminex 100* com *software* apropriado. Amostras e curva-padrão foram processadas em duplicata. Foram calculados, a partir das gasometrias, gradiente alvéolo-arterial de O₂ – P(A-a)O₂ e razão arterio-alveolar de oxigênio (a/ApO₂), tão logo instituído o suporte ventilatório e após duas horas.

Análise estatística: O tamanho da amostra foi calculado de acordo com estudo prévio em animais¹³. Para detectar uma diferença de 37% no percentual de aumento das citocinas em vigência do uso de CPAPn, considerando um $\alpha=0,05$ e poder de 80%, a amostra calculada foi de 19 recém-nascidos. Realizada a descrição das variáveis em média \pm desvio-padrão (DP) ou medianas e interquartis (p25-p75). Empregado Teste de Wilcoxon para comparar os níveis de citocinas no início imediato e após duas horas de CPAPn ou VM e Teste de Mann-Whitney para demais comparações. Utilizado o programa SPSS 18.0 (*Statistical Package for Social Sciences*), e o nível de significância estatística para todas as análises foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 43 recém-nascidos preencheram critérios de inclusão com médias de peso de nascimento de $1883,5 \pm 580$ gramas e idade gestacional de $32 \pm 2,4$ semanas. Vinte e três (53%) prematuros receberam CPAPn como primeira modalidade ventilatória, 14 (32%) eram FIG, 22 (51%) eram do sexo masculino; apenas 13 pacientes apresentaram diagnóstico de Doença de Membrana Hialina (DMH) e dois de DBP. A mediana do escore *SNAPPEII* na população avaliada foi 8 (0-21), mas significativamente superior no grupo VM cuja mediana foi 19 (7-29) comparando-se com o grupo CPAPn, cujo *SNAPPE II* foi 7 (0-9); $p=0,006$. DMH foi mais frequente naqueles recém-nascidos que necessitaram de VM: 11 (55%) e 2 (8,7%) em CPAPn, $p=0,01$. Uso de curso completo de corticoide ante-natal em 22 (51%) mães, 34 (79%) parto cesariana, 13 (30%) apresentaram pré-eclampsia. A mediana do momento da coleta das citocinas foi 2,5 (1,7-6) horas de vida. Recém-nascidos submetidos à VM iniciaram o suporte mais tarde que os recém-nascidos onde CPAPn foi a estratégia inicial: CPAPn 2 (1,5-2,5) horas de vida e VM 9 (3-46) horas de vida, $p=0,001$. A evolução dos índices de trocas gasosas basais e após duas horas de suporte ventilatório está representada na Tabela 1.

Prematuros após duas horas de VM apresentaram níveis significativamente maiores de IL-6, TNF- α e IL-8. Já os níveis de IL-6 reduziram significativamente após duas horas de CPAPn, e em 18 dos 23 pacientes em CPAPn houve redução nos níveis de IL-8. Os níveis de TNF- α foram similares no basal e pós CPAPn (Tabela 2). Os níveis basais das citocinas entre as duas modalidades ventilatórias apresentaram diferença na IL-1 β e TNF- α (Figura 1).

Em 15 dos 22 pretermos (68%) cujas mães receberam corticoide pré-natal, as medianas das citocinas foram menores antes do CPAPn, mas esse efeito não se sustentou na segunda medida, duas horas após (Tabela 3).

Houve administração de surfactante após a intubação em oito dos 20 neonatos (40%) em VM, mas isso não interferiu na resposta inflamatória aferida duas horas após: a mediana de IL-6 foi 81,5 (26-523) pg/mL nos que usaram e 86,8 (20-345) pg/mL nos que não usaram ($p=0,85$), quanto à IL-8, as medianas foram 194 (60-231) pg/mL e 74,5 (48-272) pg/mL respectivamente ($p=0,57$), e na TNF- α , 17 (8-70) pg/mL e 13,8 (11-16) pg/mL ($p=0,73$).

DISCUSSÃO

Os dados de nosso estudo são inovadores, permitindo demonstrar redução nos valores de IL-6, IL-8 e TNF- α após duas horas de uso da modalidade de ventilação não invasiva, possivelmente devido efeito protetor e/ou inibidor da cascata de eventos pro-inflamatórios do uso precoce de CPAPn em recém-nascido pré-termo. Por outro lado, reforçamos o achado da lesão inflamatória mediada por citocinas que a Ventilação Mecânica *per si* causa ao recém-nascido pré-termo.

Estudos em animais mostraram que a ventilação incorporando pressão final expiratória positiva (PEEP) reduz a formação de edema e dano celular¹², e de células inflamatórias durante a ventilação prolongada¹⁷. Contudo, mesmo dados experimentais são controversos: cordeiros pré-termo submetidos ao uso de CPAP traqueal apresentaram níveis de citocinas

duas horas após ligeiramente menores em relação àqueles submetidos à VM¹³. Níveis igualmente elevados de IL-1 β em ambas as modalidades ventilatórias, e maiores de IL-6 e IL-8 no grupo em VM também foram encontrados¹⁸. Por outro lado, Polglase *et al.*¹⁹, em modelo experimental de estímulo inflamatório tipo o lipopolissacarídeo bacteriano, não encontraram resposta inflamatória menor pelo uso de CPAP, sugerindo um efeito limitado do uso do CPAP quando à imaturidade dos pulmões soma-se um insulto infeccioso. Estudo em ratos adultos também mostrou efeitos deletérios do CPAP nesse contexto das infecções, mas com grande atenuação no grupo tratado com corticoide prévio²⁰. Esses estudos avaliaram o efeito do CPAP traqueal e não CPAP nasal, o que permite especularmos que o estímulo da pressão positiva contínua na traqueia promove uma ação inflamatória direta ao pulmão com elevação de citocinas inflamatórias.

Uma possível explicação para os níveis plasmáticos de IL-6 reduzidos significativamente duas horas depois de instituído suporte com CPAPn poderia ser o momento da coleta precoce, embora a meia vida dessa citocina seja muito curta e seus níveis elevem-se rapidamente na circulação após estímulo²¹. O momento da coleta é um fator importante na avaliação da resposta inflamatória^{21,22}. Nesse sentido, a variação de duas horas após o estímulo permitiu um intervalo seguro para evitar outros potenciais eventos inflamatórios característicos do pré-termo que poderiam interferir ou alterar o efeito da ventilação mecânica e/ou do CPAP, procurados nesse estudo.

Demonstramos aumento estatisticamente significativo nos valores de IL-6, IL-8 e TNF- α após duas horas de VM. Já em estudo previamente publicado onde incluímos recém-nascidos a termo e pré-termos tardios, a mediana da IL-6 foi similar, apesar de seus níveis terem aumentado em quase 90% dos RNs duas horas após VM². A IL-6 se encontra em níveis 6,4 vezes maiores no recém-nascido pré-termo em relação ao de termo, sugerindo que o estresse já ocorra pelo nascimento precoce e/ou trabalho de parto²³. Leviton A *et al.*²⁴

reforçaram a teoria da resposta inflamatória fetal progressivamente maior em idades gestacionais menores, especialmente para o pré-termo extremo.

Como a IL-6 é considerada a principal citocina envolvida no desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória fetal²⁵, é descrita como marcador precoce de DBP²⁶ e de sepse neonatal^{27,28}, não foram incluídos recém-nascidos com sepse neonatal, infecção do grupo STORCH ou com necessidade de qualquer suporte ventilatório em sala de parto. Assim, evitaram-se níveis iniciais de IL-6 mais elevados que poderiam prejudicar o entendimento do comportamento da IL-6 na VILI e o efeito protetor do CPAP, uma vez que seus níveis reduziram duas horas após CPAP nasal.

Curiosamente, os níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória, reduziram não apenas duas horas após VM, o que seria esperado, mas também duas horas após CPAPn. A expressão anti-inflamatória da IL-10 é mais tardia^{29,30}, posterior à liberação de IL-8, especialmente para pré-termos com menos de 30 semanas de idade gestacional³¹. Prematuros podem ter produção deficiente de interleucinas regulatórias, como a IL-10, sendo, portanto, mais predispostos a uma resposta inflamatória aumentada³². Os níveis reduzidos de IL-1 β também podem ser explicados pela cinética dessa citocina, uma vez que a IL-1 β aumenta mais tardiamente nas primeiras 24 horas de vida e a maioria de nossas amostras foram obtidas dentro desse período³³.

De acordo com estudos prévios, nossos níveis de IL-8 aumentaram significativamente após a VM^{2,13,18}. Pré-termos com menos de 35 semanas de idade gestacional apresentaram níveis similares de IL-6, IL-8 e TNF- α no primeiro dia e no sétimo dia de uso de CPAPn ou Ventilação Nasal de Pressão Positiva Intermitente (NIPPV), sugerindo que ambas modalidades ventilatórias são protetoras. Contudo, esses autores tentaram avaliar uma resposta inflamatória sustentada³⁴. Nossos dados apontam para um período curto de suporte

ventilatório invasivo ou protetor, apenas duas horas, com diferenças significativas na resposta inflamatória entre essas duas modalidades.

É conhecida a relação do corticoide pré-natal e inibição da resposta inflamatória à lesão induzida pela ventilação^{35,36}. O emprego de corticoide pré-natal a gestantes em trabalho de parto prematuro foi associado com redução significativa da produção basal de IL-6 no cordão umbilical^{37,38}. Nossos pré-termos em CPAP expostos ao corticoide intrauterino apresentaram valores de IL-6 e TNF- α menores inicialmente, mas similares após as duas horas de suporte, quando comparados com pré-termos sem uso de corticoide pré-natal, demonstrando uma ação anti-inflamatória, porém transitória do corticoide.

Nossos achados suportam o emprego de VM a pré-termos mais graves já nas primeiras horas de vida, uma vez que o escore *SNAPPE II* e o gradiente alvéolo-arterial foram significativamente mais elevados nesse grupo, quando comparados aos recém-nascidos nos quais elegeu-se o CPAPn como modalidade inicial. A VM indicada a essa amostra estudada melhorou a insuficiência respiratória, demonstrada pela redução nos índices de troca gasosa com apenas duas horas de VM. Ainda assim, houve elevação de citocinas na Ventilação Mecânica e redução no CPAPn.

No nosso estudo, não incluímos prematuros extremos, com idade gestacional inferior a 28 semanas, devido a dificuldade da utilização do CPAPn como abordagem inicial, o que limita nossos achados a faixas gestacionais superiores. Em estudo randomizado com pré-termos extremos, quase a metade daqueles em CPAPn, necessitaram intubação e uso de surfactante nos primeiros dias de vida³⁹. Três grandes estudos internacionais tentaram definir a melhor abordagem inicial para pré-termos de 25 a 28 semanas de idade gestacional, com resultados inconclusivos^{9,10}, ou tendendo para o uso de CPAPn inicial seguido de uso de surfactante, na expectativa de evitar a intubação⁸. Apesar dessa limitação do nosso estudo, não incluindo justamente população onde a VM é mais utilizada e as consequências da

inflamação sistêmica mais significativa, acredita-se que 90% dos nascimentos prematuros antes de 28 semanas ocorram devido a infecção ou inflamação intra-útero o que naturalmente alterariam os níveis de interleucinas⁴⁰.

Concluindo, nosso estudo demonstrou que o CPAPn apresenta mínima liberação de citocinas pró-inflamatórias e pode ter um papel protetor, visto a redução de IL-6 apresentada em poucas horas de uso; e ao contrário, ventilação mecânica com pressão intermitente, promove significativa resposta inflamatória. Portanto, CPAPn deve ser estimulado como estratégia ventilatória inicial protetora ao pré-termo com desconforto respiratório moderado. Nesse estudo, o efeito protetor do CPAPn foi potencializado pelo uso de corticoide ante-natal, já que a Ventilação Mecânica persiste sendo indutora de liberação de citocinas inflamatórias, a despeito dessa medida pré-natal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, 164:494-8.
2. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical Ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr*. 2010; 156 (1): 16-9.
3. Lindner W, Vossbeck S, Hummler H, Pohlandt F. Delivery room management of extremely low birth weight infants: spontaneous breathing or intubation? *Pediatrics*. 1999; 103 (5 Pt 1):961-7.
4. de Klerk AM, de Klerk RK. Nasal continuous positive airway pressure and outcomes of preterm infants. *J Paediatr Child Health*. 2001; 37(2):161-7.
5. Van Marter LJ, Allred EN, Pagano M, Sanocka U, Parad R, Moore M, et al. Do clinical

- markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? The Neonatology Committee for the Developmental Network. *Pediatrics*. 2000; 105(6): 1194–201.
6. Aly H, Milner JD, Patel K, El-Mohandes AAE. Does the experience with the use of nasal continuous positive airway pressure improve over time in extremely low birth weight infants? *Pediatrics*. 2004; 114(3):697-702
 7. Te Pas AB, Lopriore E, Engbers MJ, Walther FJ. Early respiratory management of respiratory distress syndrome in very preterm infants and bronchopulmonary dysplasia: a case-control study. *PLoS one*. 2007; 2(2): e192. doi: [10.1371/journal.pone.0000192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000192).
 8. Sandri F, Plavka R, Ancora G, Simeoni U, Stranak Z, Martinelli S, et al. Prophylactic or early selective surfactant combined with nCPAP in very preterm infants. *Pediatrics*. 2010; 125 (6):e1402–9
 9. Morley CJ, Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB, et al. Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med*. 2008; 358 (7): 700-8.
 10. Finner NN, Carlo WA, Walsh MC, Rich W, Gantz MG, Laptook AR, et al. Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N Engl J Med*. 2010; 362 (21): 1970-9.
 11. Tapia JL, Urzua S, Bancalari A, Meritano J, Torres G, Fabres J, et al. Randomized trial of early bubble continuous positive airway pressure for very low birth weight infants. *J Pediatr*. 2012;161(1):75-80.
 12. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Retrospective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive-end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 137(5): 1159-64.
 13. Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, Newham JP, Ikegami M. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res*. 52 (3): 387-92, 2002.

14. 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.
15. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr*. 2001;138 (1):92-100.
16. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163(7): 1723-29.
17. Markos J, Doerschuk CM, English D, Wiggs BR, Hogg JC. Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lung. *J Appl Physiol*. 1993; 74(6): 2627-33.
18. Mulrooney N, Champion Z, Moss TJM, Nitsos I, Ikegami M, Jobe AH. Surfactant and physiologic responses of preterm lambs to continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(5): 488-93.
19. Polglase GR, Hillman NH, Ball MK, Kramer BW, Kallapur SG, Jobe AH, et al. Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation. *Pediatr Res*. 2009; 65(1): 67-71.
20. Tsuchida S, Engelberts D, Roth M, McKerlie C, Post M, Kavanagh BP. Continuous positive airway pressure causes lung injury in a model of sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289(4): 554-64.
21. Procianoy RS, Silveira RC. The role of sample collection timing on interleukin-6 levels in early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80 (5): 407-10.
22. Cernada M, Badía N, Modesto V, Alonso R, Mejías A, Golombek S, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2012; 101(5): 203-7.
23. Chiesa C, Signore F, Assumma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, et al. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period:

- reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin chem.* 2001; 47(6): 1016-22.
24. Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, et al. Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. *Cytokine.* 2010; 53(1): 66-73.
25. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183 (5): 1124-9.
26. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Reali R, Reggiani A, Bianchi S, et al. Lung inflammation in preterm infants with respiratory distress syndrome: effects of ventilation with different tidal volumes. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41(4): 357-63.
27. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin chem.* 2003; 49 (1): 60-68.
28. Hotoura E, Giapros V, Kostoula A, Spyrou P, Andronikou S. Pre-inflammatory mediators and lymphocyte subpopulations in preterm neonates with sepsis. *Inflammation.* 2012; 35(3):1094-1101.
29. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor. *J Reprod Immunol.* 1997; 33(2):147-56.
30. 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.

31. 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.
32. Jónsson 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.* 2001; 89(11): 1375-80.
33. Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P. Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine.* 2003; 21(4): 200-6.
34. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Daniele I, Cavigioli F, Rossi S, et al. Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) versus bi-level nasal CPAP in preterm babies with respiratory distress syndrome: a randomized control trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010;95 (2):F85-9.
35. Feldman DM, Carbone J, Belden L, Borgida AF, Herson V. Betamethasone vs. dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197 (3): 284, e 1-4.
36. Hillman NH, Pillow JJ, Ball MK, Polglase GR, Kallapur SG, Jobe AH. Antenatal and postnatal corticosteroid and resuscitation induced lung injury in preterm sheep. *Respir Res.* 2009; 10:124; doi:10.1186/1465-9921-10-124.
37. Arad I, Bar-Oz B, Ergaz Z, Nir A, Barak V. Interleukin-6 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide cord blood levels in premature infants: correlations with perinatal variables. *Isr Med Assoc J.* 2010;12 (7): 419-23.
38. Caldas JP, Vilela MM, Braghini CA, Mazzola TN, Marba ST. Antenatal maternal corticosteroid administration and markers of oxidative stress and inflammation in umbilical cord blood from very low birth weight preterm newborn infants. *J Pediatr (Rio J).* 2012; 88 (1): 61-66

39. Dunn MS, Kaempf J, de Klerk A, de Klerk R, Reilly M, Howard D, et al. Randomized trial comparing 3 approaches to the initial respiratory management of preterm neonates. *Pediatrics*. 2011; 128 (5): e1069-76.
40. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371 (9606): 75–84.

Tabela 1: Índices de Troca Gasosa de acordo com o Suporte Ventilatório

	P(A-a)O₂ basal	P(A-a)O₂ pós	p	pO₂/FiO₂ basal	pO₂/FiO₂ pós	p	Razão a/APO₂ basal	Razão a/APO₂ pós	p
CPAP	62,4 (33,2-105,8)	33,6 (13-70)	0,057	250 (177-331)	296 (191-375)	0,23	0,56 (0,38-0,77)	0,67 (0,45-0,85)	0,19
VM	204 (48-440)	146 (66-232)	0,008	179 (89-365)	225 (159-329)	0,23	0,32 (0,16-0,71)	0,41 (0,35-0,6)	0,26

Legenda: Mediana e p25-p75, Wilcoxon signed-rank test

Tabela 2: Comparação das Citocinas no início imediato do Suporte Ventilatório e duas horas após

Citocina (pg/mL)	Início do CPAPn	2h após	p	Início da VM	2h após	p
N	23	23		20	20	
IL-6	97,1 (43,1-188)	32,4 (17,6-62)	0,002	54,6 (14,9-156)	82,6 (22,3-366)	0,002
IL-8	78,8 (52,8-133,8)	59,9 (51-87,5)	0,064	73,3 (32,3-165)	107 (52,6-255)	0,001
IL-10	71,6 (14-145)	41,7 (13-63,2)	0,055	82 (45,3-188)	47,1 (15-155)	0,079
IL-1β	11 (11-11,9)	11 (11-12)	0,47	8,2 (6,7-11,3)	8,7 (7,4-12,9)	0,14
TNF-α	21,6 (15,7-26,4)	17 (16,5-23,7)	0,28	12,2 (7,8-15,3)	14,6 (11-19,5)	0,001

Legenda: Mediana e p25-p75, Wilcoxon signed-rank test

Tabela 3: Associação do uso de Corticoide pré-natal com Citocinas no início imediato do Suporte Ventilatório e duas horas após

Citocina (pg/mL)	Início CPAPn			Após 2h			Início VM			Após 2h		
	Corticóide pre-natal	Não usou	p	Corticóide pre-natal	Não usou	p	Corticóide pre-natal	Não usou	p	Corticóide pre-natal	Não usou	p
N	15	8		15	8		7	13		7	13	
IL-6	62,8 (15 – 111)	215 (149-392)	0,002	23,4 (8 – 45)	59 (26-84)	0,076	18 (15-78)	124 (15-374)	0,21	57,5 (16-68)	237 (40-559)	0,06
IL-8	95 (55 – 135)	75,4 (52-112)	0,46	70 (51 – 166)	56,6 (42 – 77)	0,35	76 (32-155)	70 (32-175)	0,87	164 (54-262)	77 (51-254)	0,7
IL-10	50,4 (10,4-114)	82,4 (49-328)	0,16	40,5 (11-94)	46,5 (26 -62)	0,46	100 (44-187)	64 (41-519)	0,75	53 (13-207)	44 (15-127)	0,87
IL-1β	11 (11-12)	11,3 (11-14)	0,42	11 (11-12)	11,4 (11-13)	0,9	8,1 (3,9-10,7)	9,6 (7,3-15,1)	0,15	8,1 (7,3-10,7)	11 (7,7-15,9)	0,18
TNF-α	18 (15-24)	26 (19-36)	0,034	19 (16-24)	16,7 (15-24)	0,39	8,7 (5,6-19)	12,7 (9-15)	0,48	16 (9-20)	14,6 (11,4-19,5)	0,99

Legenda: Mediana e p25-p75; Mann-Whitney test

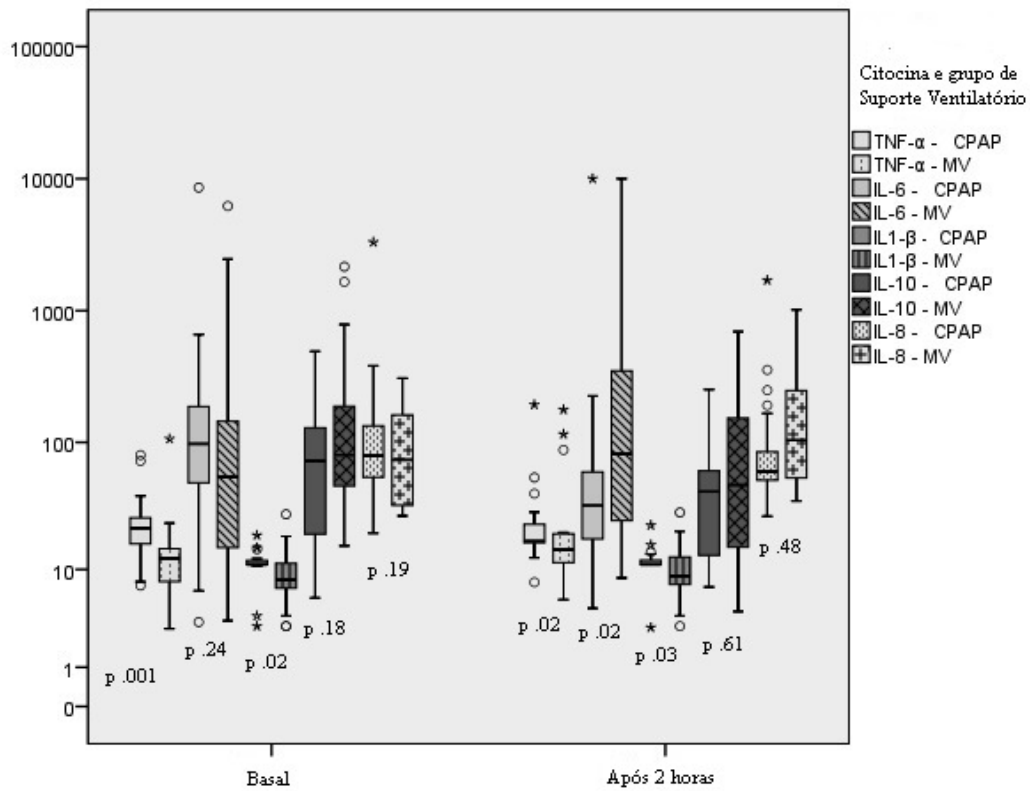


Figura 1 - Níveis de citocinas de acordo com o tipo de suporte ventilatório no momento inicial e após duas horas. - Teste de Mann-Whitney

7. CONCLUSÕES

- 1- Na nossa revisão sobre lesão pulmonar induzida pela ventilação, verificamos que os modos de ventilação não invasivos são técnicas já não tão recentes no nosso meio, mas que parecem promissores por se tratarem de modalidades com menor resposta inflamatória e com um possível papel protetor na lesão pulmonar.
- 2- A técnica de intubação com administração precoce de surfactante e extubação rápida para CPAP nasal é uma medida protetora da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica no prematuro.
- 3- Estratégias que regulam o Vt evitando o volutrauma - ventilação com volume pré-selecionado, especialmente a ventilação com volume garantido - parecem reduzir a taxa de displasia broncopulmonar.
- 4- No nosso estudo observacional, houve redução no nível das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos recém-nascidos prematuros duas horas após o uso do CPAPn, sendo estatisticamente significativa apenas a redução da IL-6.
- 5- Confirmou-se o aumento no nível das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, e TNF- α e a redução da citocina anti-inflamatória IL-10 nos prematuros duas horas após o uso de VM, sendo estatisticamente significativo o aumento da IL-6, IL-8, e TNF- α .
- 6- Os baixos níveis de IL-1 β podem ser explicados pela cinética dessa citocina, uma vez que a IL-1 β aumenta mais tardiamente nas primeiras 24 horas de vida e a maioria de nossas amostras foram obtidas nesse período.
- 7- Os níveis de IL-10 reduziram não apenas duas após VM o que seria esperado, mas também duas horas após CPAP, possivelmente devido a sua expressão mais tardia.

- 8- Nossos pré-termos em CPAPn expostos ao corticoide intrauterino apresentaram valores de IL-6 e TNF- α menores tão logo instituído CPAPn, mas similares após as duas horas de uso, quando comparados com pré-termos sem uso de corticoide pré-natal, demonstrando uma ação anti-inflamatória, porém transitória do corticoide.
- 9- Prematuros em VM expostos ao corticoide intrauterino não apresentaram, na nossa amostra, valores de interleucinas estatisticamente menores tão logo instituída a VM, nem após as duas horas de uso, quando comparados com pré-termos sem uso de corticoide pré-natal.
- 10- Nossos pré-termos em VM expostos ao surfactante exógeno após a intubação apresentaram valores de IL-6, IL-8 e TNF- α maiores após duas horas de VM da mesma forma que os pré-termos que não receberam a medicação, demonstrando que a VM por si só tem ação pró-inflamatória.
- 11- Houve melhoras nos índices de trocas gasosas nos recém-nascidos duas horas após o uso de ambos os modos de suporte ventilatório, o que foi evidenciado principalmente pela redução do gradiente alvéolo-arterial de O₂ na VM.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados suportam o emprego de VM a prematuros mais graves já nas primeiras horas de doença, uma vez que a VM indicada a essa amostra estudada melhorou a insuficiência respiratória – redução do gradiente alvéolo arterial. Os grupos foram bastante homogêneos, conforme dados da Tabela 1 dos Apêndices; contudo eram pacientes com gravidade diferente - o escore SNAPPE II foi significativamente mais elevado no grupo VM, assim como a prevalência de doença da membrana hialina. Apesar da melhora na oxigenação, houve elevação de citocinas na Ventilação Mecânica e redução no CPAPn.

Os resultados dessa pesquisa mostram que os prematuros submetidos à CPAPn apresentaram mínima liberação de citocinas pró-inflamatórias, com possibilidade de papel protetor na lesão pulmonar induzida pela ventilação, visto a redução de IL-6 apresentada em poucas horas de uso. Tendo em vista essa observação, o CPAP deve ser estimulado como estratégia ventilatória inicial menos lesiva ao prematuro com desconforto respiratório moderado – mas ainda serão necessários mais estudos para determinar o papel de outras formas de ventilação não invasiva e outras formas de VM consideradas protetoras na prevenção da inflamação pela ventilação.

No nosso estudo não incluímos prematuros extremos, com idade gestacional inferior a 28 semanas, devido a dificuldade da utilização do CPAPn como abordagem inicial, o que limita nossos achados a faixas gestacionais superiores. Apesar dessa limitação do nosso estudo, não incluindo justamente população onde a VM é mais utilizada e as consequências da inflamação sistêmica mais profunda, acredita-se que 90% dos nascimentos prematuros antes de 28 semanas ocorram devido à infecção ou inflamação intra útero, o que naturalmente alteraria os níveis de interleucinas.

Assim, essa nova compreensão dos mecanismos de lesão envolvendo resposta inflamatória mediada pelas citocinas possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias no cuidado dos recém-nascidos prematuros.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 2 EM INGLÊS

PRE- AND POST-VENTILATION PLASMA CYTOKINE LEVELS IN PRETERM NEWBORN INFANTS WITH EARLY RESPIRATORY DISTRESS

ABSTRACT

Introduction: Mechanical ventilation (MV) induces expression of pro-inflammatory cytokines. Early nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) seems to prevent ventilator-induced lung injury. These effects have not been studied in humans.

Objective: To evaluate plasma levels IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α immediately before the start of nCPAP or MV and two hours later.

Methods: Prospective cohort including preterm newborns with gestational age of 28-35 weeks admitted to a NICU for respiratory support. Newborns with malformations, congenital infections, sepsis, surfactant treatment, and receiving ventilatory support in the delivery room were excluded. Blood samples were collected right before and two hours after the start of ventilation. Wilcoxon test was used for comparisons.

Results: Of 43 preterm (mean weight 1883.5 \pm 580g; GA 32 \pm 2.4 weeks), 23 (53%) were treated with nCPAP. A significant decrease in IL-6 levels was observed after two hours of nCPAP. After two hours of MV, IL-6, TNF- α and IL-8 levels increased significantly. In 15 out of 22 newborns (68%) whose mothers received antenatal steroid, cytokine level was lower at the onset of nCPAP, but this effect was not sustained after two hours.

Conclusion: nCPAP was associated with minimal release of pro-inflammatory cytokines and seems to play a less harmful role, which was enhanced by the use of antenatal steroids. Conversely, MV promoted a significant inflammatory response, thus supporting the use of nCPAP as initial protective respiratory strategy for preterm with moderate respiratory distress.

Introduction

The early use of mechanical ventilation (MV) has been shown to induce pro-inflammatory cytokine expression in experimental models and clinical studies^{1,2}. In many epidemiologic studies, the replacement of MV with nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) has been associated with reduced bronchopulmonary dysplasia (BPD)³⁻⁷.

Noninvasive ventilation and early initiation of CPAP in the delivery room seem to be promising strategies to prevent MV-induced injury in extremely preterm infants⁸⁻¹⁰. Even though data from the South American Neocosur Network¹¹ have not shown a reduction in the rates of BPD following CPAP, this ventilation strategy is still associated with protective effects; CPAP seems to facilitate spontaneous breathing, maintain alveolar recruitment, and reduce the need for MV in preterm infants. The pathophysiological mechanisms underlying the beneficial effects of CPAP have not yet been clarified, but it is speculated that the reduction in BPD rates associated with this ventilatory strategy results mainly from the avoidance of invasive ventilation or inadvertent exposure to high tidal volumes and hyperventilation¹².

The role of MV in preterm infants treated with surfactant and the resulting persistent elevation of inflammatory cytokines in the lungs is well known. However, the possible protective effects of nCPAP in ventilator-induced lung injury (VILI) have only been studied in animals¹³.

It is possible that the use of nCPAP, even for short periods of time, might prevent harmful pro-inflammatory stimuli to the lung. Thus, the aim of this study was to determine plasma levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α in newborns right before start of either nCPAP or MV and two hours later.

Methods

A prospective cohort study was carried out with newborns admitted between September 2011 and May 2013 to the HCPA NICU. Gestational age ranged from 28 to 35 weeks, and all participants required nCPAP or MV as the initial support in the first 72 hours of life. Exclusion criteria were congenital malformations or chromosomal syndromes, STORCH infections, proven sepsis, meningitis, need for ventilatory support with any type of positive airway pressure therapy in the delivery room, and use of nitric oxide and surfactant prior to enrollment in the study. The project was approved by the Institution's Research Ethics Committee (protocol 11-0325). Written informed consent was obtained from the parents or guardians prior to enrollment of participants.

The following data were collected: gestational age (based on the date of the last period and confirmed by ultrasound in the first trimester and/or neonatal clinical examination)¹⁴, birth weight, sex, Apgar score at the fifth minute, delivery room resuscitation, type of delivery, and presence of preeclampsia, amniorrhexis, and/or chorioamnionitis.

SNAPPE-II score was calculated 12 hours after birth¹⁵ for all participants. BPD was diagnosed based on the need for oxygen beyond 28 days of life¹⁶. Preterm infants whose mothers had received two doses of betamethasone prior to delivery were considered to have received antenatal steroids.

Newborns were followed from birth to the start of ventilatory support; samples were collected right before MV or nCPAP for arterial blood gas analysis according to the routine of the NICU. An additional 500 μ L aliquot was collected in ETDA tubes for later cytokine analysis, and therefore no additional punctures were performed strictly for research purposes. Two hours after the onset of the required ventilation mode (nCPAP or MV), samples were again collected for blood gas analysis and cytokine dosing. The blood samples were immediately centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm to yield 300 μ L of plasma, which was

frozen at -80°C . The samples were identified by number and time of collection for later laboratory analysis of cytokines.

Cytokines were measured using a commercially available kit (MILLIPLEX[®] Human Cytokine/Chemokine MPXHCYTO-60K, Millipore Corporation, Billerica, MA USA). The readings were performed with Luminex 100 in duplicate (Austin, Texas, USA) with appropriate software. Samples and standard curve were processed

The alveolar-arterial oxygen gradient - P (Aa) O₂ - and the arterio-alveolar oxygen ratio (a/ApO₂) were calculated from arterial blood gas analyses before and two hours after the start of ventilatory support.

Statistical analysis

Sample size was calculated based on a previous study with animals¹³. To detect an increase of 37% in cytokine levels during nCPAP use, considering $\alpha=0.05$ and 80% power, 19 newborns were required. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median and range (p25-p75). Wilcoxon's test was used to compare cytokine levels immediately before the onset and two hours after nCPAP or MV. Mann-Whitney's test was used for the other comparisons.

Differences between medians were analyzed using the Mann-Whitney test. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare the pre- and post- ventilatory support cytokine levels. Analyses were performed with SPSS, version 18.0 (Statistical Package for Social Sciences), and the level of statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Forty-three newborns met the inclusion criteria. Mean birth weight was 1883.5 ± 580 g, and mean gestational age was 32 ± 2.4 weeks. Twenty-three (53%) pre-term newborns

received nCPAP, 14 (32%) were small for gestational age, and 22 (51%) were males. Thirteen babies were diagnosed with hyaline membrane disease (HMD) and two with BPD. Median SNAPPEII score was 8 (0-21). SNAPPEII score was significantly higher in the MV group: 19 (7-29) vs. 7 (0-9) in the nCPAP group ($p=0.006$). HMD was more frequent in newborns receiving MV (11 or 55% vs. 2 or 8.7% in nCPAP newborns; $p=0.01$). A full antenatal steroid course was given to 22 mothers (51%), 34 (79%) with C-section and 13 (30%) with preeclampsia. The median time for collection of samples for cytokine measurement was 2.5 (1.7-6) hours of life. MV was initiated later than nCPAP: 9 (3-46) vs. 2 (1.5-2.5) hours of life ($p=0.001$). Table 1 presents gas exchange data at baseline (right before the onset of ventilatory support) and two hours later.

Two hours of MV were associated a significant increase in IL-6, TNF- α , and IL-8 levels. IL-6 levels were significantly reduced after 2 hours of nCPAP. IL-8 levels were also reduced in 18 out of 23 nCPAP patients. Pre and post-nCPAP TNF- α levels were similar (Table 2). Both groups presented similar baseline levels for all cytokines except TNF- α and IL-1 β (Figure 1).

The median level of pre-nCPAP cytokines was lower in 15 out of 22 infants (68%) whose mothers received antenatal steroids. However, this effect was not sustained after two hours of nCPAP (Table 3).

Surfactant was administered following intubation in 8 out of 20 newborns (40%) receiving MV prior to the second sample collection time. This however did not interfere with the inflammatory response measured two hours later: median IL-6 levels were 81.5 (26-523) in babies who received surfactant vs. 86.8 (20-345) in those who did not ($p=0.85$). Median levels of IL-8 were 194 (60-231) vs. 74.5 (48-272) respectively ($p=0.57$), and of TNF- α , 17 (8-70) vs. 13.8 (11-16) ($p=0.73$) respectively.

Discussion

This study presents novel data showing a decrease in IL-6, IL-8, and TNF- α levels after two hours of non-invasive ventilation, possibly reflecting a protective and/or inhibiting effect of early nCPAP on the pro-inflammatory cascade in preterm newborns. Conversely, our data also support the notion that MV *per se* causes inflammatory injury in this population.

Animal studies have shown that positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation reduced edema formation and cell damage¹², as well as inflammatory cell recruitment during prolonged ventilation¹⁷. However, even the available experimental data are controversial: preterm lambs receiving tracheal CPAP presented only slightly lower cytokine levels after two hours as compared to those receiving MV¹³. Similar increased levels of IL-1 β were recorded with both ventilation modes, whereas IL-6 and IL-8 were elevated only in the MV group¹⁸. Conversely, Polglase et al.¹⁹, using a model of lipopolysaccharide infection, did not observe decreased inflammatory response with the use of CPAP, suggesting a limited effect of this ventilation mode in the presence of both immature lungs and infectious injury. A study in adult rats has also reported deleterious effects of CPAP in the context of sepsis; however, infection was greatly attenuated in the group receiving pretreatment with steroids²⁰. In those studies, tracheal CPAP rather than nasal CPAP was used. We speculate that the stimulus provided by continuous positive pressure in the trachea promotes direct inflammatory action in the lung, with elevation of inflammatory cytokines.

Timing of sample collection is an important factor in the evaluation of inflammatory response; the half-life of IL-6 is very short, and its circulating levels increase rapidly after stimulation^{21,22}. The strength of our study is that the collection of samples prior to and 2 hours after the stimulus provided a safe interval to prevent the onset of other potential inflammatory events, which are characteristic of preterm newborns and that could interfere with or alter the effect of MV or nCPAP. Pre TNF- α and IL-1 β nCPAP levels were higher than pre MV, once

the median time of collection was shorter in nCPAP than in MV infants. The higher cytokines levels after MV than after nCPAP reinforce a significant role of MV inducing a systemic inflammatory response.

We demonstrated a statistically significant increase in IL-6, IL-8, and TNF- α after 2 hours of MV. In a previous study by our group, including full-term newborns and late preterm newborns, the groups had a similar median level of IL-6, despite an increase recorded in almost 90% of the newborns 2 hours after MV². IL-6 has been shown to be 6.4 times higher in preterm newborns as compared to full-term newborns, which suggests that stress occurs even prior to ventilation, resulting from preterm birth and/or labor²³. The findings of Leviton et al. supported the theory of a fetal inflammatory response that is stronger at lower gestational ages, especially in extremely preterm newborns²⁴.

Because IL-6 is the main cytokine involved in the development of the fetal inflammatory response syndrome²⁵, it has been described as an early marker of BPD²⁶ and neonatal sepsis^{27,28}. Therefore, we excluded all cases of neonatal sepsis and STORCH infections, as well as babies requiring any type of ventilatory support in the delivery room, who might have elevated baseline IL-6 levels – a situation that might impact the evaluation of the behavior of IL-6.

Interestingly, the levels of inflammatory cytokine IL-10 were reduced 2 hours after both CPAP and MV. Anti-inflammatory expression of IL-10 occurs later^{29,30}, after the release of IL-8, especially in preterms with gestational age below 30 weeks³¹. The production of downregulatory interleukins, such as IL-10, may be insufficient in preterm newborns, which leaves them more predisposed to an exacerbated inflammatory response³². The reduced levels of IL-1 β may also be explained by kinetics, since the rate of IL-1 β increase is slower in the first 24 hours of life, the period in which most of our samples were obtained³³.

As previously observed, IL-8 levels increased significantly in our study following MV^{2,13,18}. As shown in a previous study, preterm newborns with less than 35 weeks of gestational age had similar levels of IL-6, IL-8, and TNF- α at the first and seventh day of nCPAP or nasal intermittent positive pressure ventilation (NIPPV), which suggests that both ventilatory modes are protective. Nevertheless, those authors aimed at evaluating a sustained inflammatory response³⁴. Our data shows that after a short period of only a couple of hours, the inflammatory response associated with protective or invasive ventilation is significantly different.

The inhibitory action of antenatal steroid administration on inflammatory response and ventilation-induced injury is well known^{35,36}. Using antenatal steroid in women during preterm labor has been associated with a significant reduction in the baseline production of IL-6 in the umbilical cord^{37,38}. Our preterm newborns receiving nCPAP who had been exposed to intrauterine steroids had lower pre-nCPAP amounts of IL-6 and TNF- α as compared to non-exposed newborns. However, the levels of these markers were similar in all nCPAP babies two hours later, showing a transient anti-inflammatory action of antenatal steroid administration.

Our findings support the use of MV in severely compromised preterm newborns already at the first hours after birth, since SNAPPE II score and the arterial alveolar gradient were significantly increased in this group as compared to newborns receiving nCPAP as initial ventilatory strategy. In the present group of patients, MV promoted improvement of respiratory distress, as demonstrated by a reduction in the gas exchange indices after only two hours of MV. Still, cytokines were increased in MV and reduced with nCPAP.

We did not include extremely premature newborns, with gestational age below 28 weeks, because the application of nCPAP in that group is complicated. Thus, our findings can only be applied to higher gestational ages. A randomized study with extremely preterm

newborns showed that almost half of those receiving nCPAP required intubation and surfactant therapy during the first days of life³⁹. Three large international studies tried to define the best initial approach for preterm newborns at 25 to 28 weeks of gestational age. The results of these studies were either inconclusive^{9,10} or slightly favorable to the use of nCPAP followed by surfactant therapy as an approach to prevent intubation⁸. Extremely preterm newborns are more often treated with MV and affected by systemic inflammation than other preterm populations; however, their exclusion from the present study is justified by the fact that these baseline inflammations would possibly impact interleukin levels⁴⁰.

Conclusion

Our study shows that nCPAP is associated with minimal release of pro-inflammatory cytokines and may cause less harm than MV, especially considering the reduction in IL-6 after a few hours of ventilation. On the contrary, intermittent-pressure MV promotes a significant inflammatory response. Thus, nCPAP should be used as an initial, protective ventilatory strategy for preterm newborn infants with moderate respiratory distress. In the present study, the effects of nCPAP seemed to have been enhanced by the use of antenatal steroids, while MV was associated with increased inflammatory cytokine levels despite antenatal steroid use.

Acknowledgements

We thank Vania Hirakata for assistance with the statistical analysis, and Mrs Claudia Buchweitz for the English revision.

Conflict of interest

Clarissa G Carvalho, Rita C. Silveira, Eurico C Neto, Renato S. Procianoy, Vania Hirakata and Claudia Buchweitz do not have any conflict of interest to disclose.

REFERENCES

1. 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, 164:494-8.
2. Bohrer B, Silveira RC, Neto EC, Procianoy RS. Mechanical Ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Pediatr.* 2010; 156 (1): 16-9.
3. Lindner W, Vossbeck S, Hummler H, Pohlandt F. Delivery room management of extremely low birth weight infants: spontaneous breathing or intubation? *Pediatrics.* 1999; 103 (5 Pt 1):961-7.
4. de Klerk AM, de Klerk RK. Nasal continuous positive airway pressure and outcomes of preterm infants. *J Paediatr Child Health.* 2001; 37(2):161-7.
5. Van Marter LJ, Allred EN, Pagano M, Sanocka U, Parad R, Moore M, et al. Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? The Neonatology Committee for the Developmental Network. *Pediatrics.* 2000; 105(6): 1194–201.
6. Aly H, Milner JD, Patel K, El-Mohandes AAE. Does the experience with the use of nasal continuous positive airway pressure improve over time in extremely low birth weight infants? *Pediatrics.* 2004; 114(3):697-702
7. Te Pas AB, Lopriore E, Engbers MJ, Walther FJ. Early respiratory management of respiratory distress syndrome in very preterm infants and bronchopulmonary dysplasia: a case-control study. *PloS one.* 2007; 2(2): e192. doi: [10.1371/journal.pone.0000192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000192).
8. Sandri F, Plavka R, Ancora G, Simeoni U, Stranak Z, Martinelli S, et al. Prophylactic or early selective surfactant combined with nCPAP in very preterm infants. *Pediatrics.* 2010; 125 (6):e1402–9

9. Morley CJ, Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB, et al. Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med.* 2008; 358 (7): 700-8.
10. Finner NN, Carlo WA, Walsh MC, Rich W, Gantz MG, Laptook AR, et al. Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N Engl J Med.* 2010; 362 (21): 1970-9.
11. Tapia JL, Urzua S, Bancalari A, Meritano J, Torres G, Fabres J, et al. Randomized trial of early bubble continuous positive airway pressure for very low birth weight infants. *J Pediatr.* 2012;161(1):75-80.
12. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Retrospective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive-end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137(5): 1159-64.
13. Jobe AH, Kramer BW, Moss TJ, Newham JP, Ikegami M. Decreased indicators of lung injury with continuous positive expiratory pressure in preterm lambs. *Pediatr Res.* 52 (3): 387-92, 2002.
14. 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.
15. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001;138 (1):92-100.
16. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(7): 1723-29.
17. Markos J, Doerschuk CM, English D, Wiggs BR, Hogg JC. Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lung. *J Appl Physiol.* 1993; 74(6): 2627-33.
18. Mulrooney N, Champion Z, Moss TJM, Nitsos I, Ikegami M, Jobe AH. Surfactant and physiologic responses of preterm lambs to continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(5): 488-93.

19. Polglase GR, Hillman NH, Ball MK, Kramer BW, Kallapur SG, Jobe AH, et al. Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation. *Pediatr Res.* 2009; 65(1): 67-71.
20. Tsuchida S, Engelberts D, Roth M, McKerlie C, Post M, Kavanagh BP. Continuous positive airway pressure causes lung injury in a model of sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289(4): 554-64.
21. Procianoy RS, Silveira RC. The role of sample collection timing on interleukin-6 levels in early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80 (5): 407-10.
22. Cernada M, Badía N, Modesto V, Alonso R, Mejías A, Golombek S, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 2012; 101(5): 203-7.
23. Chiesa C, Signore F, Assumma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, et al. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin chem.* 2001; 47(6): 1016-22.
24. Leviton A, Fichorova R, Yamamoto Y, Allred EN, Dammann O, Hecht J, et al. Inflammation-related proteins in the blood of extremely low gestational age newborns. The contribution of inflammation to the appearance of developmental regulation. *Cytokine.* 2010; 53(1): 66-73.
25. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183 (5): 1124-9.

26. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Reali R, Reggiani A, Bianchi S, et al. Lung inflammation in preterm infants with respiratory distress syndrome: effects of ventilation with different tidal volumes. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41(4): 357-63.
27. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin chem.* 2003; 49 (1): 60-68.
28. Hotoura E, Giapros V, Kostoula A, Spyrou P, Andronikou S. Pre-inflammatory mediators and lymphocyte subpopulations in preterm neonates with sepsis. *Inflammation.* 2012; 35(3):1094-1101.
29. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor. *J Reprod Immunol.* 1997; 33(2):147-56.
30. 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.
31. 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.
32. Jónsson 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.* 2001; 89(11): 1375-80.
33. Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P. Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine.* 2003; 21(4): 200-6.
34. Lista G, Castoldi F, Fontana P, Daniele I, Cavigioli F, Rossi S, et al. Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) versus bi-level nasal CPAP in preterm babies with

- respiratory distress syndrome: a randomized control trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010;95 (2):F85-9.
35. Feldman DM, Carbone J, Belden L, Borgida AF, Herson V. Betamethasone vs. dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197 (3): 284, e 1-4.
 36. Hillman NH, Pillow JJ, Ball MK, Polglase GR, Kallapur SG, Jobe AH. Antenatal and postnatal corticosteroid and resuscitation induced lung injury in preterm sheep. *Respir Res.* 2009; 10:124; doi:10.1186/1465-9921-10-124.
 37. Arad I, Bar-Oz B, Ergaz Z, Nir A, Barak V. Interleukin-6 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide cord blood levels in premature infants: correlations with perinatal variables. *Isr Med Assoc J.* 2010;12 (7): 419-23.
 38. Caldas JP, Vilela MM, Braghini CA, Mazzola TN, Marba ST. Antenatal maternal corticosteroid administration and markers of oxidative stress and inflammation in umbilical cord blood from very low birth weight preterm newborn infants. *J Pediatr (Rio J).* 2012; 88 (1): 61-66
 39. Dunn MS, Kaempf J, de Klerk A, de Klerk R, Reilly M, Howard D, et al. Randomized trial comparing 3 approaches to the initial respiratory management of preterm neonates. *Pediatrics.* 2011; 128 (5): e1069-76.
 40. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371 (9606): 75–84.

Table 1: Gas exchange according to ventilatory mode

	P(A-a)O ₂ pre	P(A-a)O ₂ post	p	pO ₂ /FiO ₂ pre	pO ₂ /FiO ₂ post	p	Ratio a/APO ₂ pre	Ratio a/APO ₂ post	p
CPAP	62.4 (33.2-105.8)	33.6 (13-70)	0.057	250 (177-331)	296 (191-375)	0.23	0.56 (0.38-0.77)	0.67 (0.45-0.85)	0.19
MV	204 (48-440)	146 (66-232)	0.008	179 (89-365)	225 (159-329)	0.23	0.32 (0.16-0.71)	0.41 (0.35-0.6)	0.26

Median (p25-p75).

Wilcoxon signed-rank test

Table 2: Cytokine levels immediately after the onset of ventilatory support and after 2 hours

Cytokine (pg/mL)	Pre-nCPAP	2h	p	Pre-MV	2h	p
N	23	23		20	20	
IL-6	97.1 (43.1-188)	32.4 (17.6-62)	0.002	54.6 (14.9-156)	82.6 (22.3-366)	0.002
IL-8	78.8 (52.8-133.8)	59.9 (51-87.5)	0.064	73.3 (32.3-165)	107 (52.6-255)	0.001
IL-10	71.6 (14-145)	41.7 (13-63.2)	0.055	82 (45.3-188)	47.1 (15-155)	0.079
IL-1β	11 (11-11.9)	11 (11-12)	0.47	1.1 (0.8-3)	1.2 (0.8-3)	0.14
TNF-α	21.6 (15.7-26.4)	17 (16.5-23.7)	0.28	12.2 (7.8-15.3)	14.6 (11-19.5)	0.001

Median (p25-p75).

Wilcoxon signed-rank test

Table 3: Impact of antenatal steroid use on cytokine levels immediately after the onset of ventilatory support and after 2 hours

Cytokine (pg/mL)	Pre-nCPAP			2h after			Pre-MV			2h after		
	With antenatal steroid	Without	p	With antenatal steroid	Without	p	With antenatal steroid	Without	p	With antenatal steroid	Without	p
N	15	8		15	8		7	13		7	13	
IL-6	62.8 (15 – 111)	215 (149-392)	0.002	23.4 (8 – 45)	59 (26-84)	0.076	18 (15-78)	124 (15-374)	0.21	57.5 (16-68)	237 (40-559)	0.06
IL-8	95 (55 – 135)	75.4 (52-112)	0.46	70 (51 – 166)	56.6 (42 – 77)	0.35	76 (32-155)	70 (32-175)	0.87	164 (54-262)	77 (51-254)	0.7
IL-10	50.4 (10.4-114)	82.4 (49-328)	0.16	40.5 (11-94)	46.5 (26 -62)	0.46	100 (44-187)	64 (41-519)	0.75	53 (13-207)	44 (15-127)	0.87
IL-1β	11 (11-12)	11.3 (11-14)	0.42	11 (11-12)	11.4 (11-13)	0.9	1 (0.8-3)	1.2 (0.8-3)	0.53	0.9 (0.7-3.9)	1.5 (0.8-3)	0.39
TNF-α	18 (15-24)	26 (19-36)	0.034	19 (16-24)	16.7 (15-24)	0.39	8.7 (5.6-19)	12.7 (9-15)	0.48	16 (9-20)	14.6 (11.4-19.5)	0.99

Median (p25-p75).

Wilcoxon signed-rank test

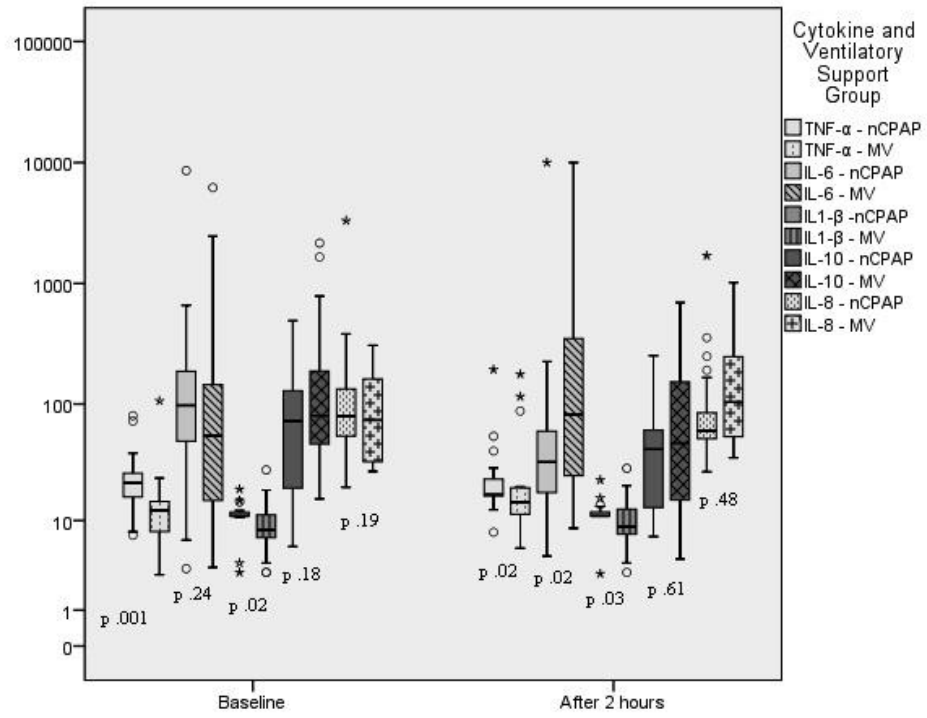


Figure 1 - Cytokine levels according to ventilatory support mode immediately after the onset and after 2 hours of ventilation. Mann-Whitney's test.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Níveis plasmáticos de citocinas em recém-nascidos pretermo antes e após emprego de ventilação não invasiva – pacientes em uso de CPAP

O bebê de pré-termo, nos primeiros dias de vida, muitas vezes evolui com dificuldade na respiração porque os pulmões ainda não estão maduros o suficiente. Alguns recém-nascidos podem necessitar de suporte respiratório, com uso de ventilação mecânica ou outras formas de ventilação chamadas de “não-invasivas”, pois não exigem que se coloque um tubo na traqueia do paciente.

Já foi visto que bebês que necessitam de ventilação mecânica com uso de tubo têm aumento de substâncias no sangue chamadas de citocinas. Essas citocinas podem ser responsáveis por danos nos pulmões que estão amadurecendo, porém mais estudos estão sendo feitos sobre esses danos.

Estamos realizando em estudo para detectar se essas substâncias citocinas aumentam nos bebês prematuros que estão na UTI Neonatal e que necessitam de ventilação “não-invasiva”. Nosso objetivo é descobrir se esse tipo de ventilação será capaz de proteger os pulmões de danos, o que vai nos ajudar a tratar melhor os bebês que internem por disfunção respiratória e prematuridade no futuro.

A pesquisa será realizada com 0,5ml de sangue do bebê, coletado junto com os outros exames que ele fará durante seu tratamento, sem acarretar nenhum risco adicional. O sangue será armazenado no laboratório da pesquisa, e a participação é sigilosa, sendo cada bebê identificado por um número. Optando por participar deste estudo, os resultados serão informados posteriormente por contato telefônico ou correspondência se for de seu interesse, bem como será orientado como lidar com esses resultados. No caso de não querer participar, isso não prejudicará em nada o tratamento do bebê.

Eu, abaixo assinado, fui informado dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa, e autorizo meu filho _____, ser avaliado para as modificações em citocinas na ventilação não invasiva.

POA. ____/____/____ Responsável: _____

Endereço/telefone: _____

Pesquisadora Responsável: Profa. Rita de Cassia da Silveira Fone: 33598142

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA Fone: 33598304

Testemunha: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Níveis plasmáticos de citocinas em recém-nascidos pretermo antes e após emprego de ventilação não invasiva – pacientes em ventilação mecânica

O bebê de pré-termo, nos primeiros dias de vida, muitas vezes evolui com dificuldade na respiração porque os pulmões ainda não estão maduros o suficiente. Alguns recém-nascidos podem necessitar de suporte respiratório, com uso de ventilação mecânica ou outras formas de ventilação chamadas de “não-invasivas”, pois não exigem que se coloque um tubo na traqueia do paciente.

Já foi visto que bebês a termo que necessitam de ventilação mecânica com uso de tubo têm aumento de substâncias no sangue chamadas de citocinas. Essas citocinas podem ser responsáveis por danos nos pulmões que estão amadurecendo, porém mais estudos estão sendo feitos sobre esses danos.

Estamos realizando um estudo para detectar se essas substâncias citocinas aumentam nos bebês prematuros que estão na UTI Neonatal e que necessitam de ventilação mecânica. Nosso objetivo é descobrir se nesse tipo de bebê em uso de ventilação mecânica também aumentarão os níveis de citocinas, o que vai nos ajudar a tratar melhor os bebês que internem por disfunção respiratória e prematuridade no futuro.

A pesquisa será realizada com 0,5ml de sangue do bebê, coletado junto com os outros exames que ele fará durante seu tratamento, sem acarretar nenhum risco adicional. O sangue será armazenado no laboratório da pesquisa, e a participação é sigilosa, sendo cada bebê identificado por um número. Optando por participar deste estudo, os resultados serão informados posteriormente por contato telefônico ou correspondência se for de seu interesse, bem como será orientado como lidar com esses resultados. No caso de não querer participar, isso não prejudicará em nada o tratamento do bebê.

Eu, abaixo assinado, fui informado dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa, e autorizo meu filho _____, ser avaliado para as modificações em citocinas na ventilação não invasiva.

POA. ____/____/____ Responsável: _____

Endereço/telefone: _____

Pesquisadora Responsável: Profa. Rita de Cassia da Silveira Fone: 33598142

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA Fone: 33598304

Testemunha: _____

APÊNDICE C - FICHA CLÍNICA

ID. _____ Registro _____

Nº _____ DN / / SEXO : 1.F 2.M ().

História obstétrica:

IGO: _____ Eco pré-natal() _____

Sorologias maternas no terceiro trimestre() _____

ITU não tratada ou sem urocultura de controle() _____

Corioamnionite() _____

ITU no parto () _____

HAS/PEG () _____

Medicações no pré natal _____

Complicações no pré natal _____

Bolsa rota () _____ horas Febre materna () _____

Parto:

Vaginal () Vaginal .+ fórceps () cesárea () cesárea + fórceps ()

PN: _____ gr. IG (sem): _____ CLASS. P/IG: PIG () AIG () GIG ()

APGAR: 1º min. _____ 5º min _____ 10º min _____

Horas de vida no início do suporte ventilatório _____ PA _____ g. IGC: _____

Momento da primeira coleta de sangue (pré) _____ horas de vida

GA pré suporte: pH _____, pCO₂ _____, pO₂ _____ CO₂T _____ Bica _____ EB _____

pré suporte: _____ (condições de ventilação)

AA() O₂() _____% cpap () campânula/incubadora() CN () _____ L/min de O₂

Parâmetros de VNI iniciais, () CPAP () NIPPV

PIP: _____ peep: _____ FR: _____ Ti: _____ i:e: _____ fluxo: _____ FiO₂: _____

volume minuto: _____ vol _____ ml/kg

IO: _____ Gradiente a/A: _____

GA após 2 horas: pH _____, pCO₂ _____, pO₂ _____ CO₂T _____ Bica _____ EB _____

Parâmetros na segunda coleta: _____

PIP: _____ peep: _____ FR: _____ Ti: _____ i:e: _____ fluxo: _____ FiO₂: _____

volume minuto: _____ vol ___ ml/kg

IO: _____ Gradiente a/A: _____

Momento da segunda coleta de sangue _____ horas de vida

INTERLEUCINAS na primeira coleta

IL-6 _____ pg/ml, IL-8 _____ pg/ml.

IL-1- α _____ pg/ml, TNF- α _____ pg/ml.

INTERLEUCINAS na segunda coleta

IL-6 _____ pg/ml, IL-8 _____ pg/ml.

IL-1- α _____ pg/ml, TNF- α _____ pg/ml.

Indicação de VNI _____

Medicações em uso: _____

SNAP PE II (12h) _____ NTISS (24H) _____

Intubação por Insuficiência Respiratória Aguda () medicações () _____

PCA() indometacina() doses() fechamento cirúrgico() restrição hídrica()

furosemide()

DMH() surfactante() doses() horas de vida em cada dose _____

BCP()

DBP() Enfisema pulmonar() AIR LEAK () _____

Tempo que permaneceu em VNI: _____

Outros exames _____

Alta() óbito()

.....

APÊNDICE D - OUTRAS TABELAS DO ESTUDO

Tabela 1- Características da amostra:

	CPAP n=23	VM n = 20	P
Peso de nascimento (g)*	1850,65 ±403	1921,4 ±742,7	0,9
Idade gestacional (semanas)	32,36 ±1,74	32,2 ± 3,1	0,7
Pequenos para Idade Gestacional (%)‡	7 (30%)	7 (35%)	1
Doença de Membranas Hialinas	2 (8,7%)	11 (55%)	0,01
Sexo Masculino	13 (56%)	9 (45%)	0,54
Uso de corticoide antenatal	15 (65%)	7 (35%)	0,06
Trabalho parto prematuro	6 (26%)	2 (10%)	0,25
Ruprema	5(21,7%)	7 (39%)	0,3
Pre-eclampsia materna ou hipertensão crônica	6 (26%)	7 (37%)	0,5
corioamnionite	4 (17%)	3 (15%)	0,1
Parto cesariana	18 (78%)	16 (80%)	1
Escore de SNAPPE II§	7 (0-9)	19 (7-29)	0,006
Tempo de vida na coleta (h)	2 (1,5-2,5)	9 (3-46)	0,001
Escore de Apgar no quinto minuto	9 (8-9)	8 (7-9)	0,8

* média ± DP, teste t para amostras independentes

‡ prevalência, teste de χ^2

§ Mediana e p25-p75, teste de Mann-Whitney

Tabela 2 - Associação do uso de surfactante pós-intubação com citocinas no início imediato da VM e duas horas após

Citocina (pg/mL)	Surfactante pós entubação		p [¥]
	Sim	Não	
N	8	12	
IL-6 pré	50,5 (4 – 330)	54,6 (16-156)	0,62
IL-6 pós	81,5 (26-523)	86,8 (20-345)	0,85
P*	0,025	0,034	
IL-8 pré	115 (35 – 178)	55,7 (32-126)	0,47
IL-8 pós	194 (60-231)	74,5 (48-272)	0,57
p	0,012	0,004	
IL-10 pré	63 (51-236)	109 (36-185)	0,13
IL-10 pós	123 (21-227)	33 (13,5-65)	0,91
p	0,57	0,09	
IL-1β pré	5,2 (3,3-10)	10,1 (8,1-12,4)	0,031
IL-1β pós	7,9 (3,9-10,7)	9,9 (8,1-14,5)	0,098
p	0,46	0,21	
TNF-α pré	12 (4-18)	12 (8-15)	0,79
TNF-α pós	17 (8-70)	13,8 (11-16)	0,73
p	0,012	0,041	

* Mediana e p25-p75, Wilcoxon signed-rank test

¥ Mediana e p25-p75, teste de Mann-Whitney

Tabela 3 - Mediana das citocinas no início imediato do uso de CPAPn e duas horas após e relação com uso de corticoide pré-natal

Citocina (pg/mL)	Início CPAPn			Após 2h		
	Corticoide pré-natal		p	Corticoide pré-natal		p
	Sim	Não		Sim	Não	
N	15	8		15	8	
IL-6	62,8 (15 – 111)	215 (149-392)	0,002	23,4 (8 – 45)	59 (26-84)	0,076
IL-8	95 (55 – 135)	75,4 (52-112)	0,46	70 (51 – 166)	56,6 (42 – 77)	0,35
IL-10	50,4 (10,4-114)	82,4 (49-328)	0,16	40,5 (11-94)	46,5 (26 -62)	0,46
IL-1β	11 (11-12)	11,3 (11-14)	0,42	11 (11-12)	11,4 (11-13)	0,9
TNF-α	18 (15-24)	26 (19-36)	0,034	19 (16-24)	16,7 (15-24)	0,39

Mediana e p25-p75
Mann-Whitney test

Tabela 4 - Mediana das citocinas no início imediato do uso de VM e duas horas após e relação com uso de corticoide pré-natal

Citocina (pg/mL)	Início VM			Após 2h		
	Corticoide pré-natal		p	Corticoide pré-natal		p
	Sim	Não		Sim	Não	
N	7	13		7	13	
IL-6	18 (15-78)	124 (15-374)	0,21	57,5 (16-68)	237 (40-559)	0,06
IL-8	76 (32-155)	70 (32-175)	0,87	164 (54-262)	77 (51-254)	0,7
IL-10	100 (44-187)	64 (41-519)	0,75	53 (13-207)	44 (15-127)	0,87
IL-1β	8,1 (3,9-10,7)	9,6 (7,3-15,1)	0,15	8,1 (7,3-10,7)	11 (7,7-15,9)	0,18
TNF-α	8,7 (5,6-19)	12,7 (9-15)	0,48	16 (9-20)	14,6 (11,4-19,5)	0,99

Mediana e p25-p75
Mann-Whitney test

APÊNDICE E – OUTRAS FIGURAS DO ESTUDO

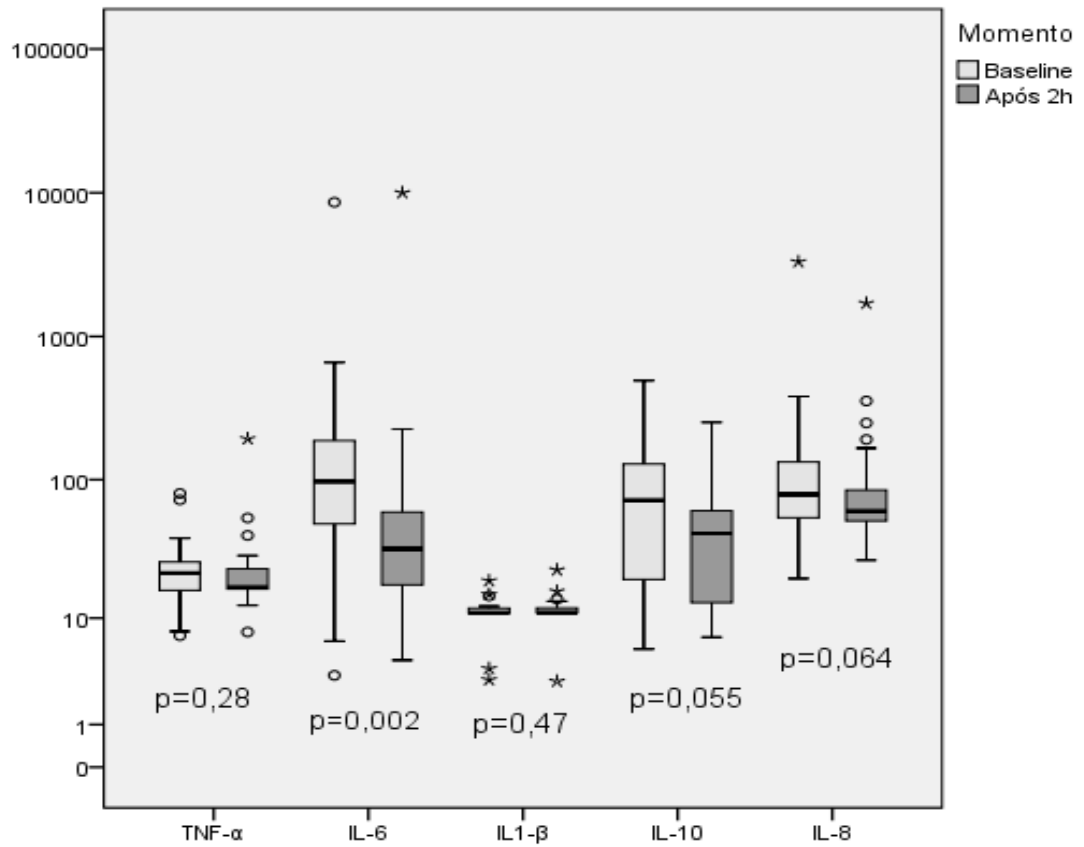


Figura 1 - Níveis de citocinas no momento inicial e após 2 horas de CPAPn- Teste de Wilcoxon.

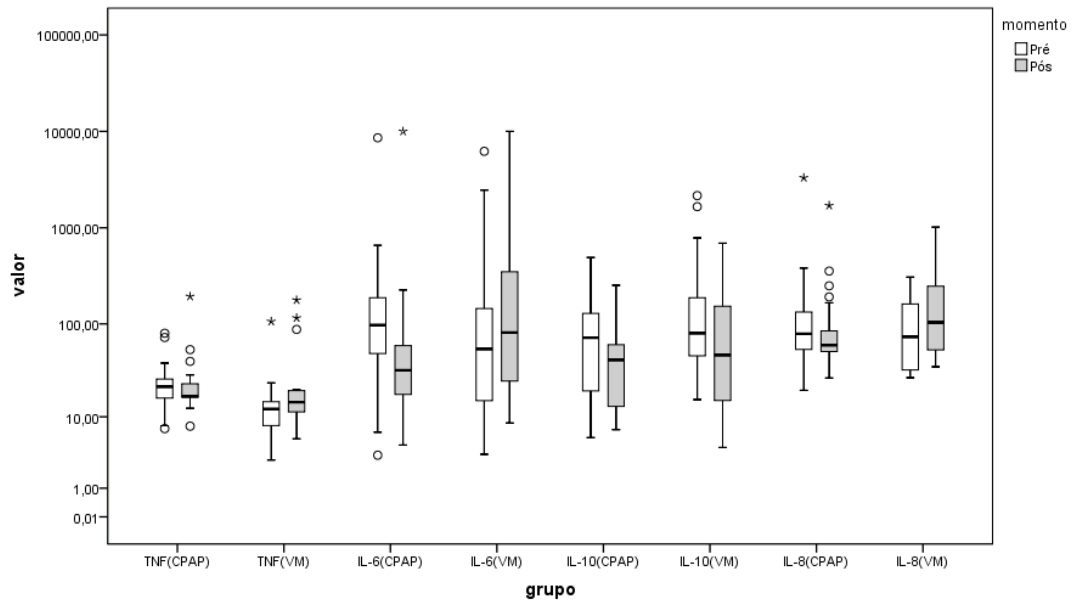


Figura - Representação em boxplot das medianas de cada citocina no momento inicial e após 2h de uso, conforme grupo de suporte ventilatório.

ANEXOS

ANEXO A - ESCORE DE SNAPPE II

Variáveis:		Pontuação
Pressão sanguínea Média	≥ 30	0
	20-29	9
	<20	19
Menor temperatura	> 35,6	0
	35-35,6	8
	<35	15
PO2/FIO2	>2,49	0
	1-2,49	5
	0,3-0,99	16
	<0,3	28
Menor Ph sérico	≥7,2	0
	7,1 – 7,19	7
	<7,1	16
Convulsões múltiplas	Não	0
	Sim	19
Débito urinário	≥1	0
	0,1-0,9	5
	<0,1	18
Apgar	≥ 7	0
	<7	18
Peso de nascimento	≥1000g	0
	750 – 999g	10
	<750g	17
PIG	> P3	0
	< P3	12

Fonte: Richardson DK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldman DA. Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics*. 1993, 91: 617-23 (RICHARDSON et al., 1993).

