

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA E CIÊNCIAS APLICADAS À PEDIATRIA

**NÍVEIS DA ENDOTELINA-1 NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA
EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO COM E SEM
DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA**

ANA CLÁUDIA WEBER BENJAMIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA E CIÊNCIAS MÉDICAS APLICADAS À PEDIATRIA

**NÍVEIS DA ENDOTELINA-1 NO SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA
EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO COM E SEM
DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA**

ANA CLÁUDIA WEBER BENJAMIN

Orientador: Dr. Renato Soibelman Procianoy

*A apresentação desta tese é exigência do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas: Pediatria da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, para
obtenção do título de Mestre.*

Porto Alegre, Brasil
2004

B468n Benjamin , Ana Cláudia Weber

Níveis da Endotelina-1 no sangue do cordão umbilical e com 12 a 48 horas de vida em recém-nascidos pré-termo com e sem doença da membrana hialina / Ana Cláudia Weber Benjamin ; orientação de Renato Soibermann Procianoy.-- Porto Alegre: UFRGS, 2004.
133 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas : Pediatria. Porto Alegre , 2004.

1. Endotelina-1- Recém-nascido pré-termo 2. Doença da membrana hialina - Recém-nascido pré-termo 3. Displasia Broncopulmonar-Recém-nascido pré-termo I. Procianoy, Renato Soibermann II.Título.

CDU 616.15(053.32)(043.2)

Catálogo elaborado por Izabel A. Merlo, CRB 10/329.

Aos meus **pais**, pelo carinho e incentivo; aos meus **irmãos** pelo apoio e afeto; ao **Tiago** pelo companheirismo e amor.

Aos pequenos **recém-nascidos**, motivo de todo esforço e dedicação, e aos seus **pais** por autorizarem a participação dos filhos na pesquisa em um momento de tanta ansiedade e incertezas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram de forma decisiva na realização desta pesquisa.

De modo especial agradeço:

- ao meu orientador, **Dr. Renato Soibermann Procianoy**, pela paciência, incentivo, respeito, confiança no meu trabalho e competente orientação;
- à colega e amiga **Dra. Rita de Cássia Silveira**, pelo auxílio na coleta dos dados e em todas etapas da dissertação, além do incentivo e amizade;
- ao meu irmão, e colega, **Winston Weber Benjamin**, pelo auxílio fundamental na coleta dos dados e revisão da literatura.

Agradeço , também:

- às colegas neonatologistas, **Dra. Natacha Toniazzi Uchôa**, **Dra. Clarissa Miura**, **Dra. Viviane Lerman** e **Dra. Janaina Campello**, ex-R3 de Neonatologia do HCPA e aos colegas contratados da Neonatologia do HCPA, pelo empenho na obtenção do sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos pré-termo;
- à **equipe de enfermagem do Centro Obstétrico do HCPA**;
- ao **Prof. Dr. Emer S. Ferro** , Chefe do Laboratório de Comunicação Celular do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento e auxílio na dosagem laboratorial da endotelina-1;
- ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pelas sugestões e orientações na análise estatística;
- ao **Dr. Afonso Luis Barth**, chefe do Laboratório de Pesquisa do HCPA.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

1 – INTRODUÇÃO	2
2 – REVISÃO DA LITERATURA	6
2. 1 – Doença da Membrana Hialina	6
2.1.1 – <i>Fisiopatologia</i>	7
2.1.2 – <i>Quadro Clínico e Tratamento</i>	9
2.1.3 – <i>Complicações</i>	10
2. 2 – Controle do Tônus Vascular Pulmonar no Feto e no Recém- -Nascido	13
2.2.1 – <i>Desenvolvimento Pulmonar</i>	13
2.2.2 – <i>Circulação Fetal</i>	14
2.2.3 – <i>Circulação Transicional</i>	17
2.2.4 – <i>Circulação Pós-Natal</i>	18
2.2.5 – <i>Reguladores da Resistência Vascular Pulmonar: Mediadores</i>	19
2. 3 – Endotelina	25
2.3.1 – <i>Estrutura da Endotelina</i>	26
2.3.2 – <i>Síntese e Degradação</i>	27
2.3.3 – <i>Receptores e Mecanismo de Ação</i>	29
2.3.3.1 – <i>Receptores tipo A das endotelinas</i>	30
2.3.3.2 – <i>Receptores tipo B das endotelinas</i>	32
2.3.4 – <i>Síntese da Endotelina: Regulação e Expressão de seus</i> <i>Receptores</i>	33
2.3.5 – <i>Ações das Endotelinas</i>	35

2.3.5.1 – Endotelina-1 nas Vias Respiratórias	36
2.3.5.2 – Endotelina-1 no Sistema Cardiovascular	40
2.3.5.3 – Endotelina-1 no Sistema Nervoso Central	42
2.3.5.4 – Endotelina-1 nos Rins	43
2.3.5.5 – Endotelina-1 em Doenças Malignas	45
2.3.5.6 – Endotelina-1 durante a Gestação e no Parto	45
2.3.5.7 – Endotelina-1 na Adaptação Circulatória Pós- -Nascimento	46
2.3.5.8 – Endotelina-1 no Canal Arterial	48
2.3.5.9 – Endotelina-1 na Sepses Neonatal	49
2.3.5.10 – Endotelina-1 na Asfixia Perinatal	50
2.3.5.11 – Endotelina-1 na Hérnia Diafragmática Congênita	50
2.3.5.12 – Endotelina-1 Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém-Nascido	50
2.3.5.13 – Endotelina-1 na Doença da Membrana Hialina	53
2.3.5.14 – Endotelina-1 na Displasia Broncopulmonar	56
3 – OBJETIVOS	59
3. 1 – Objetivo Geral	59
3. 2 – Objetivos Específicos	59
4 – METODOLOGIA	62
4. 1 – Delineamento do Estudo	62
4. 2 – População	62
4.2.1 – População em Estudo	62
4.2.2 – População da Pesquisa	62
4. 3 – Amostra e Amostragem	63
4.3.1 – Critérios de Inclusão	63
4.3.2 – Critérios de Exclusão	63
4. 4 – Variáveis em Estudo	64
4. 5 – Variáveis Controladas	66
4. 6 – Logística	67
4. 7 – Método Bioquímico Empregado para Determinação da Endotelina-1	69
4. 8 – Cálculo do Tamanho da Amostra	71
4. 9 – Análise Estatística	71

4.10 – Considerações Éticas	72
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
6 - ARTIGO: NÍVEIS DA ENDOTELINA-1 NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO COM E SEM DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA	88
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
ANEXOS	

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de Variâncias
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AT	Aspirado traqueal
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Cálcio
CPAPn	Pressão positiva e contínua em vias aéreas com dispositivo nasal
DAG	Diacilglicerol
DBP	Displasia broncopulmonar
DMH	Doença da membrana Hialina
ECE-1	Enzima conversora da endotelina-1
ECE-1α	Enzima conversora da endotelina-1 alfa
ECE-1β	Enzima conversora da endotelina-1 beta
ECMO	Membrana de oxigenação extracorpórea
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
FI_{O₂}	Fração inspirada de oxigênio
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPP	Hipertensão pulmonar persistente
IG	Idade gestacional
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
irET-1	Endotelina-1 imunoreativa
Log	Logaritmo
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico, nitritos e nitratos
PaCO₂	Pressão parcial de gás carbônico arterial
PAF	Fator ativador plaquetário
PaO₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PAP	Pressão na artéria pulmonar
PGI₂	Prostaciclina
PN	Peso de nascimento
PreproET-1	Pré-pró-endotelina-1
ProET-1	Pró-endotelina-1
Receptores ETA	Receptores de endotelina do tipo A
Receptores ETB	Receptores de endotelina do tipo B
RIE	Radioimunoensaio
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNPT	Recém nascidos pré-termo
RVP	Resistência vascular pulmonar
RVS	Resistência vascular sistêmica

SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SNAPPE II	<i>Score for Neonatal Acute Physiology Perinatal Extension, version II</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTRN	Taquipnéia transitória do recém-nascido

Nota: Algumas siglas foram mantidas na forma original, em inglês, por serem assim conhecidas internacionalmente.

Lista de Figuras

Figuras da Revisão da Literatura

- Figura 1** Desenho esquemático da circulação fetal, com as áreas mais escuras demonstrando as zonas de menor oxigenação 16
- Figura 2** Estrutura das Endotelinas-1, 2 e 3 e da similar sarafotoxina S6b.....27
- Figura 3** Mecanismo de ação da ET-1 após ligação ao receptor de membrana ETA31

Figuras da Metodologia

- Figura 1** Diluições da Endotelina-1 para formar a curva-padrão70

Figuras do Artigo

- Figura 1** Comparação entre os níveis da ET-1 nos recém-nascidos pré-termo com DMH e controles 109

Lista de Tabelas

Tabelas do artigo em Português

Tabela 1	Características da população estudada	106
Tabela 2	Níveis da ET-1 nos recém-nascidos pré-termo com DMH e controles.....	107
Tabela 3	Dados demográficos e níveis da ET-1 nos RNPT com DMH comparando os sobreviventes e os não-sobreviventes	108

RESUMO

RESUMO

Objetivo: Determinar os níveis da endotelina-1 (ET-1) no sangue de cordão umbilical e no plasma de recém-nascidos pré-termo com doença da membrana hialina (DMH) e comparar estes níveis com controles.

Metodologia: Nós determinamos os níveis da ET-1 em 18 pré-termos com DMH que não tiveram diagnóstico clínico ou ecocardiográfico de hipertensão pulmonar e em 22 pré-termos sem DMH (peso de nascimento < 2000g e idade gestacional ≤ 34 semanas). Foram utilizados sangue do cordão umbilical e uma segunda amostra de sangue coletada durante as primeiras 12 a 48 horas de vida após o nascimento, para determinação da ET-1 por enzimo-imunoensaio.

Resultados: As medianas dos valores da ET-1 do sangue de cordão umbilical foram similares nos dois grupos (controles: 10,9pg/mL e DMH: 11,4pg/mL) e foram significativamente maiores do que as da segunda amostra (controles: 1,7pg/mL, DMH: 3,5pg/mL; $p < 0,001$ para ambos os grupos). As medianas da ET-1 da segunda amostra foram significativamente maiores no grupo com DMH do que no grupo controle ($p < 0,001$). Houve uma correlação positiva entre dosagem da ET-1 na segunda amostra e o Escore de Gravidade Neonatal SNAPPE II ($r = 0,36$, $p = 0,02$), e duração da ventilação mecânica ($r = 0,59$, $p = 0,04$). Um declínio mais lento nos valores da ET-1 do nascimento para as 12 a 48h de vida foi observado nos recém-nascidos pré-termo com DMH comparados com os controles.

Conclusões: Recém-nascidos pré-termo com e sem DMH tem níveis semelhantes da ET-1 no sangue de cordão umbilical, enquanto os níveis da ET-1 no recém-nascido com 12 a

48 horas de vida foram maiores nos com DMH do que nos controles. Níveis elevados da ET-1 na DMH sugerem que este mediador está envolvido na fisiopatologia da DMH.

Palavras-chave: endotelina-1, doença da membrana hialina, prematuridade, displasia broncopulmonar, SNAPPE II.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a sobrevida dos recém-nascidos pré-termo tem melhorado progressivamente. Com avanços no conhecimento das doenças e de seus tratamentos, além de novos medicamentos e técnicas de suporte, recém-nascidos cada vez mais imaturos estão tendo chances maiores de sobrevida. Algumas patologias, no entanto, permanecem causas importantes de morbi-mortalidade, como a doença da membrana hialina.

A doença da membrana hialina (DMH) é uma doença respiratória freqüente em recém-nascidos pré-termo (RNPT). Melhorias na forma de tratamento, como o uso do surfactante exógeno, modificaram o curso natural da DMH, mas não solucionaram o problema neste grupo de recém-nascidos, indicando a possibilidade da existência de alguns aspectos na fisiopatologia da doença ainda não esclarecidos. Estudos recentes têm sugerido a presença de um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) em RNPT com DMH, todavia, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão bem estabelecidos (SKINNER et al., 1992; WALTHER et al., 1992; KÄÄPÄ et al., 1993; IVY et al., 1998; VROOMEN et al., 2001).

O entendimento de todos os fatores envolvidos no controle da RVP do recém-nascido necessita de maiores estudos. Há vários mediadores que regulam o tônus vascular pulmonar, dentre os quais o óxido nítrico (NO) e a endotelina (LYRENE e PHILIPS, 1984; ZIEGLER et al., 1995).

A endotelina (ET) é uma potente proteína vasoconstritora, isolada e descrita em 1988

por Yanagisawa e colaboradores (YANAGISAWA et al., 1988). É composta por 21 aminoácidos em cadeia, com duas pontes dissulfeto, havendo três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) (YANAGISAWA et al., 1988). A ET-1 é a mais estudada e conhecida do grupo (LEVIN, 1995). Originalmente descrita como fator vasoconstritor, posteriormente foram descobertas inúmeras outras funções biológicas desempenhadas junto ao leito vascular, assim como farta distribuição em outros tecidos. Induz contração isolada das veias pulmonares, mitogênese do músculo liso vascular, hipertrofia de células miocárdicas e tem efeitos inotrópico e cronotrópico positivos. Nas vias respiratórias, tem atividades de broncoconstrição, secreção de muco e proliferação celular, bem como ações inflamatórias (KOJIMA et al., 1992; DRUML et al., 1993; STEINHORN et al., 1995; FAGAN et al., 2001; BLOUQUIT et al., 2003). Conforme sua interação com outros mediadores e ligação aos receptores, pode provocar, inclusive, vasodilatação (LEVIN, 1995). Uma das ações mais importantes da ET-1 – e motivo de interesse para o presente estudo – é sua potente ação vasoconstritora pulmonar (LERMAN et al., 1990; DRUML et al., 1993; MICHAEL e MARKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002; MICHEL et al., 2003; PERREAULT e COCEANI, 2003).

Há estudos experimentais sugerindo que a ET-1 possa ter um papel fundamental na reatividade vascular pulmonar em recém-nascidos com DMH (IVY et al., 1998; VROOMEN et al., 2001). Há relato de aumento dos níveis da ET-1 em aspirado traqueal (AT) de recém-nascidos com DMH (ANDERSSON et al., 1997). Foram também constatados níveis séricos elevados da ET-1 na sepse neonatal (FIGUERAS-ALOY et al., 2003), asfixia perinatal (LAFORGIA et al., 2001), hérnia diafragmática congênita (KOBAYASHI e PURI, 1994), hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (WALTHER et al., 1992; ROSENBERG et al., 1993; KUMAR et al., 1996; FINEMAN et al., 1999; TRUOG et al., 2002; PERREAULT e COCEANI, 2003) e na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)

em crianças (DOBYNS et al., 1999). Além disso, é um potente mediador das alterações hemodinâmicas da transição do nascimento (STEINHORN et al., 1995; ENDO et al., 2000; TSUKAHARA et al., 2002; MILDENBERGER et al., 2003).

O papel da endotelina-1 na patogênese da disfunção respiratória precoce do neonato e da displasia broncopulmonar ainda não é bem conhecido, o que desperta o interesse em estudos com esse mediador em RNPT.

Este estudo tem o objetivo de avaliar as concentrações plasmáticas da endotelina-1 em recém-nascidos pré-termo com doença da membrana hialina comparando com as concentrações da endotelina-1 em prematuros sem doença da membrana hialina, ou seja, com algum desconforto respiratório leve transitório ou ausente. Verificando ainda, a associação entre os níveis da endotelina-1 no sangue de cordão umbilical e nas primeiras 12 a 48 horas de vida de recém-nascidos pré-termo com o desenvolvimento da doença da membrana hialina.

Inicialmente, realizar-se-á uma descrição resumida da DMH e dos fatores envolvidos no controle do tônus vascular pulmonar do feto e do recém-nascido, seguida de uma revisão da literatura sobre a endotelina, apresentação dos objetivos e metodologia da pesquisa, bem como o artigo científico redigido em português, a ser publicado, e, finalizando, algumas considerações.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Doença da Membrana Hialina

A doença da membrana hialina (DMH) ou síndrome do desconforto respiratório afeta recém-nascidos pré-termo e se caracteriza por uma imaturidade pulmonar estrutural e funcional (IVY et al., 1998). Usaremos o termo doença da membrana hialina por ser esta a terminologia classicamente conhecida. Na DMH ocorre deficiência na produção de surfactante pulmonar, o que resulta em microatelectasias disseminadas em ambos os pulmões.

A DMH é uma importante causa de morbidade e mortalidade em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal. A incidência e gravidade dos quadros geralmente aumentam com a diminuição da idade gestacional ao nascimento, e a evolução é mais desfavorável em recém-nascidos do sexo masculino (KIRKPATRICK et al., 1997; WHITSETT et al., 1999). Alguns fatores podem predispor ao aparecimento da DMH, como: diabetes melito materno, cujo hiperinsulinismo fetal atrasa o amadurecimento pulmonar, e asfixia perinatal, onde a acidose inibe a produção de surfactante pulmonar (PROCIANOY, 1997).

Aproximadamente 50% dos RNPT com 26 a 28 semanas de idade gestacional (IG) desenvolvem DMH, já entre aqueles com 30 a 31 semanas de IG, 20 a 30% terão esta doença (WHITSETT et al., 1999). Há algumas décadas, a taxa de mortalidade atingia 80%; atualmente, com os avanços nos cuidados intensivos neonatais e melhorias nas técnicas de suporte vital, a taxa global de mortalidade devida à DMH é cerca de 10 a 15%. No entanto, nos RNPT de extremo baixo peso (< 750 gramas), as taxas ainda são muito elevadas, podendo

atingir entre 40 a 50% dos casos (KIRKPATRICK et al., 1997).

2.1.1 - Fisiopatologia

A causa primária da DMH é a deficiência de surfactante pulmonar. O surfactante pulmonar é composto principalmente de fosfolipídios, fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol. É sintetizado e secretado pelos pneumócitos tipo II, que recobrem os espaços alveolares (WHITSETT et al., 1999). Esta substância tem a propriedade de reduzir a tensão superficial alveolar, impedindo o colapamento dos alvéolos no final da expiração (PROCIANOY, 1997). Com a produção insuficiente de surfactante pulmonar, ocorre redução na complacência pulmonar, com progressiva formação de atelectasias e conseqüente redução da capacidade residual funcional e algum grau de aumento na RVP. Ocorre, então, um desequilíbrio na relação ventilação-perfusão pulmonar, com *shunt* direito-esquerdo intrapulmonar (KÄÄPÄ et al., 1993; KIRKPATRICK et al., 1997; PROCIANOY, 1997; WHITSETT et al., 1999).

O tratamento com surfactante exógeno melhorou a sobrevivência dos RNPT com DMH, porém mais de 50% tem resposta sub-ótima, sugerindo que outros problemas da prematuridade, como a alteração na resposta a estímulos vasodilatadores, podem contribuir para esta falha na adaptação pós-natal (WOHL, 1997; IVY et al, 1998).

Há múltiplos fatores que contribuem para a dificuldade respiratória encontrada no RNPT com DMH. A imaturidade anatômica dos pulmões e a parede torácica pouco desenvolvida podem dificultar uma adequada troca gasosa. Há ineficiente absorção do líquido pulmonar devido ao extenso tecido intersticial dos pulmões imaturos, que agem como se fossem uma “esponja”. Este edema do interstício pulmonar é um fator complicante significativo, devido ao aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar. O edema pulmonar pode ser acentuado pela presença de canal arterial patente com *shunt* esquerda-

direita, o que ocasiona um acúmulo adicional de líquidos. Os RNPT apresentam, ainda, um pobre desenvolvimento do centro respiratório e dos músculos respiratórios, podendo levar a um esforço respiratório ineficiente (KIRKPATRICK et al., 1997).

A elevada RVP juntamente com uma redução na pressão arterial sistêmica e um grande *shunt* direita-esquerda intra e extrapulmonar são fatores que contribuem para a fisiopatologia da DMH (KÄÄPÄ et al., 1993). Frequentemente, recém-nascidos com DMH grave apresentam hipertensão pulmonar e hipoxemia importante (SKINNER et al., 1992; WALTHER et al., 1992; KÄÄPÄ et al., 1993; WOHL, 1997; IVY et al., 1998; VROOMEN et al., 2001). Os mecanismos que causam o aumento da RVP e o papel da hipertensão pulmonar na evolução da DMH ainda são incertos (IVY et al., 1998; VROOMEN et al., 2001).

Diversos estudos têm evidenciado a presença de *shunt* direita-esquerda, hipertensão pulmonar e hipoperfusão pulmonar em RNPT com DMH (SKINNER et al., 1992; WALTHER et al., 1992; KÄÄPÄ et al., 1993; VROOMEN et al., 2001). Walther et al., determinaram a correlação da gravidade da DMH com a presença de hipertensão pulmonar persistente ou hipoperfusão pulmonar. Encontraram níveis mais elevados de pressão na artéria pulmonar (PAP) e velocidade de fluxo sanguíneo pulmonar mais baixa em RNPT com DMH grave ou fatal nas primeiras 24 a 36 horas de vida, quando comparados com recém-nascidos a termo sem DMH ou com DMH leve. É possível que a imaturidade pulmonar estrutural e funcional, resultando em baixa complacência pulmonar e necessidade de altas pressões médias de vias aéreas, contribua para ocorrência de hipertensão pulmonar e hipoperfusão pulmonar comum em RNPT com DMH grave (WALTHER et al., 1992).

Kaapa et al., 1993, administraram surfactante sintético em RNPT com DMH e encontraram rápida e efetiva redução na RVP, resultando em diminuição na PAP nestes recém-nascidos (KÄÄPÄ et al., 1993).

Os achados patológicos da DMH, mesmo precoces, incluem atelectasia, edema pulmonar, congestão vascular, hemorragia pulmonar e evidências de injúria direta ao endotélio (JEFFERIES et al., 1984; WHITSETT et al., 1999). Os achados histológicos são a presença de membranas hialinas, um característico material eosinofílico derivado da injúria a células epiteliais brônquicas e bronquiolares (WHITSETT et al., 1999). Os espaços alveolares geralmente não estão inflados. A infiltração de leucócitos não costuma ocorrer de forma importante nas fases iniciais, exceto na presença de infecção associada. Edema pulmonar, capilares congestos e hemorragia pulmonar são achados comuns da DMH, principalmente na presença de complicações como persistência do canal arterial e insuficiência cardíaca congestiva que podem ocorrer na evolução do quadro (JEFFERIES et al., 1984; KIRKPATRICK et al., 1997; WHITSETT et al., 1999).

2.1.2 - Quadro Clínico e Tratamento

A DMH se caracteriza por quadro precoce de disfunção respiratória, com taquipnéia, batimentos de asas do nariz, gemido expiratório, tiragem subcostal, supra-esternal e cianose (PROCIANOY, 1997; WHITSETT et al., 1999). O gemido expiratório é característico no recém-nascido que tenta manter o volume alveolar aumentando a pressão expiratória, com uma expiração forçada, contra uma glote parcialmente fechada, gerando o gemido audível (WHITSETT et al., 1999). O quadro evolui com piora progressiva da dificuldade respiratória, necessidades crescentes de oxigênio, apnéia e falência respiratória (KIRKPATRICK et al., 1997).

Radiologicamente, observa-se um pulmão com volume aéreo menor do que o normal, presença de um infiltrado reticulogranular disseminado em ambos pulmões associado a broncograma aéreo (PROCIANOY, 1997; WHITSETT et al., 1999). A diminuição no volume

pulmonar pode não ser notada quando o recém-nascido está em ventilação mecânica ou com pressão positiva e contínua em vias aéreas com dispositivo nasal (CPAPnasal). O quadro radiológico pode ser variável e não refletir a gravidade do comprometimento respiratório (WHITSETT et al., 1999).

Caracteristicamente, a DMH tende a piorar nas primeiras 24 a 48 horas, com lenta recuperação ao longo de alguns dias. O curso clínico depende da gravidade da doença e características do recém-nascido, podendo haver melhora em uma semana ou evoluir com complicações, prolongando o quadro (WHITSETT et al., 1999).

O tratamento consiste na administração de surfactante exógeno natural ou sintético diretamente na traquéia e terapia de suporte ventilatório, além de ajustes no equilíbrio hídrico-metabólico, bem como monitorização e tratamento de infecção quando presente. O uso de surfactante pulmonar exógeno altera a evolução natural da DMH. O mesmo pode ser empregado de forma terapêutica, ao ser administrado no momento do diagnóstico da doença, ou de forma profilática, ainda na sala de parto, quando o recém-nascido apresenta imaturidade importante que represente um grande risco para apresentar a DMH. A intensidade no tratamento dependerá do quadro clínico apresentado pelo RNPT.

2.1.3 – Complicações

As complicações mais frequentes da DMH são: pneumotórax, persistência do canal arterial, hemorragia intraventricular e infecções (PROCIANOY, 1997; WHITSETT et al., 1999). O RNPT com DMH pode apresentar melhora do quadro agudo inicial, mas ficar com seqüelas pulmonares, evoluindo para a presença de doença pulmonar crônica chamada de displasia broncopulmonar (DBP).

A DBP é de etiologia multifatorial (JEFFERIES et al., 1984; STENMARK et al.,

1987). Os principais fatores de risco são: imaturidade pulmonar, barotrauma e volutrauma, toxicidade do oxigênio, infecções pré-natais e nosocomiais, bem como aumento do fluxo pulmonar secundário à persistência do canal arterial (JEFFERIES et al., 1984). Acredita-se que a DBP inicia com uma injúria pulmonar aguda, levando a potente resposta inflamatória (JEFFERIES et al., 1984; GRONECK et al., 1996). O aumento no tônus vascular pulmonar, observado na injúria pulmonar aguda, pode participar no desenvolvimento da DBP (GRONECK et al., 1996). Os achados patológicos na DBP são consistentes com um processo de inflamação pulmonar prolongada (KIRKPATRICK et al., 1997). A inflamação pulmonar é caracterizada pelo acúmulo de células e de mediadores inflamatórios, os quais contribuem para o aumento da permeabilidade microvascular e dano pulmonar (JEFFERIES et al., 1984).

Em recém-nascidos com DMH e em animais com injúria pulmonar aguda induzida experimentalmente, ocorre um rápido influxo de neutrófilos nos pulmões durante as primeiras 48 a 96 horas após a lesão inicial; na seqüência, há um aumento dos macrófagos alveolares, com subsequente resolução da inflamação das vias aéreas. Em contraste, nos recém-nascidos que desenvolvem DBP, o influxo de neutrófilos é prolongado e a entrada de macrófagos alveolares é retardada e diminuída. Essas diferenças no recrutamento e ativação de células inflamatórias podem contribuir na patogênese da DBP em prematuros suscetíveis (BAGCHI et al., 1994).

Os mecanismos que regulam a injúria pulmonar nos pacientes com DBP ainda não foram completamente elucidados. Anormalidades bioquímicas têm sido descritas na DBP, incluindo um desbalanço do inibidor da elastase α -1 proteinase, um aumento nos níveis do fator ativador plaquetário (PAF) e uma redução da fibrinólise alveolar. Há consideráveis evidências experimentais de que a cascata inflamatória iniciada por uma injúria pulmonar aguda em adultos é mediada pela liberação de citocinas (BAGCHI et al., 1994). As citocinas são proteínas semelhantes a hormônios, desempenhando ações autócrinas, parácrinas e

endócrinas. Têm a capacidade de modificar o comportamento das células adjacentes através de suas ações parácrinas. As curtas distâncias extracelulares pelas quais as citocinas viajam antes de interagir com os receptores de superfície é fator de distinção dos hormônios endócrinos circulantes (KELLEY, 1990). As citocinas interagem entre si, numa rede de auto-estimulação, após o gatilho inicial. Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além de um aumento no influxo de neutrófilos nas vias respiratórias no curso precoce da DMH, já foram previamente demonstrados em AT de recém-nascidos que subsequente desenvolveram DBP (NIU et al, 1998; SPEER, 1999).

Bagchi et al., 1994, avaliaram os níveis do TNF- α no lavado traqueal de RNPT, e encontraram concentrações do TNF- α semelhantes no 1º dia de vida nos pacientes com e sem DBP, mas significativamente maiores no 14º e 28º dias, parecendo que o TNF- α é um marcador mais tardio da DBP. O aumento da atividade da IL-6 nos pacientes com DBP e com doença pulmonar aguda nas primeiras duas semanas de vida (sem posterior desenvolvimento de DBP) e sua queda significativa no 28º dia parece relacionar a IL-6 com a resposta à injúria inicial, caracterizando-a como um marcador mais precoce do evento inflamatório (BAGCHI et al., 1994).

Watterberg et al., 1996, estudaram RNPT que desenvolveram DBP evidenciando um aumento da exposição pré-natal à inflamação com corioamnionite neste grupo, ou seja, a corioamnionite poderia acelerar a maturação pulmonar, mas também causar inflamação e subsequente injúria pulmonar em pacientes em ventilação mecânica (WATTERBERG et al., 1996).

Groneck et al., 1994, demonstraram níveis elevados da IL-8 no 5º e no 15º dias de vida nos pacientes com DBP, enquanto naqueles sem DBP foi observado somente o primeiro pico da IL-8 (GRONECK et al., 1994). Foi mostrado, também, que a concentração da IL-1 β

no AT no 1º dia de vida pode ser um marcador de colonização perinatal das vias respiratórias pelo *Ureaplasma urealyticum* (GRONECK et al., 1996).

A seqüência do aparecimento das citocinas no lavado broncoalveolar sugere que a IL-1 β seja o fator central para super-regulação do TNF- α e da IL-8. Em adição, a IL-1 β pode ter um papel principal na resposta à infecção e à inflamação, assim como exercer muitas das ações do TNF- α . Entretanto, a administração sistêmica experimental do TNF- α em animais induz uma injúria pulmonar mais grave e extensa do que com a infusão da IL-1 β . Este fato demonstra a potente ação pró-inflamatória alveolar do TNF- α (SPEER, 1999).

Estudos com AT de RNPT com DMH mostram resultados controversos quanto aos valores da ET-1 (NIU et al., 1998; AMBALAVANAN e NOVAK, 2003). O papel da endotelina na patogênese da displasia broncopulmonar necessita ser melhor avaliado.

2.2 - Controle do Tônus Vascular Pulmonar no Feto e no Recém-Nascido

Há diversos fatores envolvidos no controle da RVP no feto e no recém-nascido, muitos ainda não estabelecidos. Mudanças dramáticas ocorrem na RVP do período fetal para o pós-natal imediato. A seguir, apresentamos uma breve descrição do desenvolvimento pulmonar, circulação fetal, transicional e pós-natal e, mais detalhadamente, uma revisão dos fatores reguladores do tônus no leito vascular pulmonar.

2.2.1 - Desenvolvimento Pulmonar

O início da formação do trato respiratório ocorre com aproximadamente 4 semanas de

vida embrionária, quando surge o divertículo respiratório, que aparece como uma evaginação da parede ventral do intestino anterior. O epitélio do revestimento interno da laringe, traquéia e brônquios, assim como o dos pulmões, é de origem endodérmica, enquanto o componente cartilaginoso e muscular da traquéia e dos pulmões deriva do mesoderma esplâncnico que envolve o intestino anterior (SADLER, 1997).

O desenvolvimento do pulmão humano pode ser dividido em 5 estágios de organogênese (SADLER, 1997):

1) Período embriônico precoce: 3 a 7 semanas IG - início do desenvolvimento pulmonar e formação das vias aéreas maiores;

2) Período pseudoglandular: 5 a 17 semanas de IG - desenvolvimento da porção brônquica dos pulmões, formação da árvore brônquica e túbulos acinares. Com mais ou menos 17 semanas, o número total de gerações das vias aéreas já está estabelecido. Os elementos envolvidos na troca gasosa ainda não estão desenvolvidos;

3) Período canalicular: 16 a 26 semanas de IG- vascularização do mesênquima pulmonar com a formação de barreiras sangue-ar e início da cito-diferenciação das células epiteliais bronquiolares e alveolares;

4) Período sacular: 24 a 38 semanas de IG – alargamento do espaço de ar periférico, resultando em formação do alvéolo primitivo e do septo fino interalveolar;

5) Período alveolar: 36 semanas de IG até os 3 anos de idade pós-natal - formação do septo alveolar fino secundário e início do remodelamento do leito capilar, dando origem à organização alveolar do pulmão adulto.

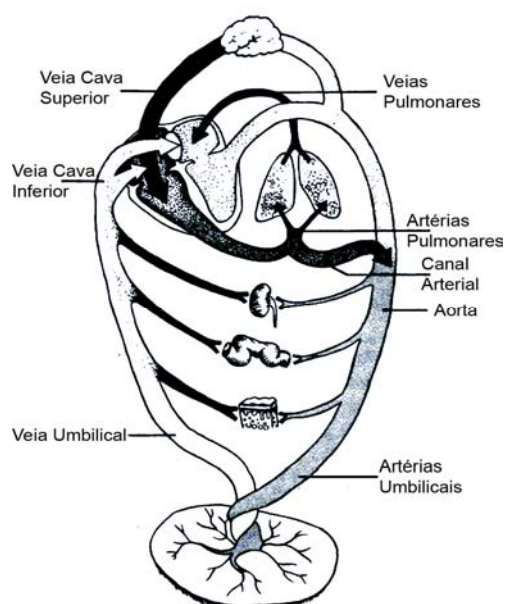
2.2.2 - Circulação Fetal

Durante a vida fetal, a placenta é o órgão responsável pelas trocas gasosas, e os

pulmões ainda não têm a função de oxigenação do sangue. A circulação pulmonar fetal é um sistema de alta resistência e de baixo fluxo, recebendo menos de 10% do débito cardíaco (ZIEGLER et al., 1995). Neste período fetal, o principal interesse é a perfusão dos órgãos fetais nobres: cérebro e coração (LYRENE e PHILIPS, 1984; ZIEGLER et al., 1995).

A RVP é maior que a resistência vascular sistêmica (RVS), com isso o ventrículo direito é dominante e ejeta cerca de $2/3$ do débito cardíaco (LYRENE e PHILIPS, 1984; WHITSETT et al., 1999).

Esta fase intra-útero da circulação fetal tem como característica as pressões do lado direito do coração (átrio e ventrículo direito) suplantando as pressões do lado esquerdo (WHITSETT et al., 1999). Como resultado deste diferencial de pressões, mais de $1/3$ do sangue oxigenado que retorna da placenta pela veia cava inferior atravessa o forame oval e chega ao lado esquerdo do coração, perfundindo coração e cérebro, os órgãos fetais com maiores necessidades. O sangue remanescente da veia cava inferior e todo o sangue da veia cava superior é liberado para o ventrículo direito e, deste, para as artérias pulmonares (LYRENE e PHILIPS, 1984; WHITSETT et al., 1999). Uma pequena quantidade desse sangue não oxigenado perfunde os pulmões. Devido à elevada RVP, aproximadamente 85 a 90% do sangue ejetado pelo ventrículo direito vai para a circulação sistêmica através do canal arterial e mistura-se ao sangue na aorta descendente. Desta forma, a porção inferior do corpo é perfundida por sangue menos oxigenado que a porção superior. Metade deste sangue pobremente saturado perfunde a placenta, onde ocorre a oxigenação (LYRENE e PHILIPS, 1984) (figura 1).



Fonte: Lyrene RK e Philips JB. Control of Pulmonary Vascular Resistance in the Fetus and Newborn. Symposium on Neonatal Pulmonary Hypertension 1984 Oct;11(3):55164.

Fig. 1 – Desenho esquemático da circulação fetal, com as áreas mais escuras demonstrando as zonas de menor oxigenação.

Há muitas razões para a elevada RVP fetal. As artérias pulmonares têm camadas médias com maiores espessuras no feto do que no adulto. Pode-se obter um índice do grau de desenvolvimento da camada muscular média dos vasos comparando-se a razão da espessura da camada média com o diâmetro externo do vaso. Esta razão é maior no feto que no adulto, principalmente nas artérias musculares menores. A exposição dos vasos pulmonares ao sangue dessaturado, causando vasoconstrição ativa, é outra possível explicação. A pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2) pulmonar durante a vida fetal é de somente 18 a 21 Torr., e pequenos decréscimos na PaO_2 abaixo destes valores promovem elevação no tônus vascular pulmonar. Acredita-se, ainda, que a queda na RVP com o avanço da IG é primariamente devido ao aumento do número total de vasos pulmonares, com redistribuição do leito vascular (LYRENE e PHILIPS, 1984).

2.2.3 - Circulação Transicional

No momento do nascimento ocorrem inúmeras transformações no tônus vascular. Com o início da ventilação, o fluido pulmonar fetal é absorvido rapidamente, ocorre expansão do pulmão atelectásico e, com isso, há queda da RVP e um aumento de 5 a 10 vezes no fluxo sanguíneo pulmonar (LYRENE e PHILIPS, 1984; KIRKPATRICK et al., 1997; RINGER, 2003).

Há vários estímulos responsáveis pela primeira respiração, como a queda da PaO_2 e do pH e a elevação da pressão parcial de gás carbônico arterial (PaCO_2) em virtude da interrupção da circulação placentária, da redução da temperatura corporal e uma variedade de estímulos táteis (RINGER, 2003). Com a respiração, na seqüência, ocorre uma elevação da PaO_2 e uma redução da PaCO_2 (LYRENE e PHILIPS, 1984).

Ao nascimento ocorre um rápido aumento da RVS promovido pelo clampeamento do fluxo arterial umbilical pela placenta, com remoção da circulação placentária, que por sua vez, funcionava sob baixa resistência (LYRENE e PHILIPS, 1984; RINGER, 2003).

O aumento da RVS associado à redução da RVP promovem a inversão do fluxo sanguíneo através do canal arterial e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo pulmonar. O aumento do retorno sanguíneo ao átrio esquerdo pelas veias pulmonares causa elevação nas pressões diastólicas finais no ventrículo esquerdo e pressões no átrio esquerdo superiores às do átrio direito, o que leva ao fechamento funcional do forame oval (LYRENE e PHILIPS, 1984). Além disso, o sangue oxigenado através do canal arterial causa a sua constrição e fechamento funcional (LYRENE e PHILIPS, 1984; RINGER, 2003).

As circulações pulmonar e sistêmica deixam de funcionar como um circuito paralelo para trabalhar em série, com o sangue venoso insaturado chegando ao lado direito do coração

e sendo oxigenado no circuito pulmonar para, após, rico em oxigênio, retornar ao coração pelo lado esquerdo, e, daí, seguir para a circulação sistêmica, suprindo diversos órgãos e sistemas (LYRENE e PHILIPS, 1984; RINGER, 2003).

2.2.4 - Circulação Pós-Natal

Nas primeiras 12 a 24 horas após o nascimento ocorre a maior queda na RVP, com a liberação de substâncias vasodilatadoras como prostaciclina (PGI₂) e NO (WHITSETT et al., 1999). O forame oval, conforme mencionado previamente, fecha logo após o nascimento devido a mudanças de pressão que ocorrem ao nascimento com o coração fetal; já o canal arterial fecha com 16 a 20 horas de vida. Nenhum dos dois está permanentemente fechado, podendo reabrir caso a seqüência normal de modificações não ocorra, como é o caso da asfixia perinatal (LYRENE e PHILIPS, 1984).

A PAP é aproximadamente metade da pressão sistêmica no final do primeiro dia de vida e persiste em queda além do primeiro dia, atingindo os valores correspondentes à vida adulta ao final do primeiro mês de vida. A redução na RVP imita as mudanças nas pressões e é secundária à involução da camada muscular média. O sistema circulatório passa por um notável remodelamento anatômico e fisiológico durante a fase fetal e vida neonatal precoce (LYRENE e PHILIPS, 1984). No pulmão já integralmente muscularizado, as artérias pré-acinares espessas estendem-se ao nível dos bronquíolos terminais. As artérias intra-acinares e as alveolares não são vascularizadas. Uma hipóxia ao nascimento inibe o remodelamento e regressão fisiológica do músculo liso das artérias bronquiolares pré-acinar, o que explica a relação da hipertensão pulmonar persistente (HPP) do recém-nascido com os quadros de asfixia perinatal (WHITSETT et al., 1999).

2.2.5 - *Reguladores da Resistência Vascular Pulmonar: Mediadores*

Os mecanismos que contribuem para manutenção do elevado tônus vascular pulmonar na vida fetal não estão bem estabelecidos, mas incluem fatores mecânicos como: ausência da interface ar-líquido e falta de distensão rítmica dos pulmões, a presença de baixas tensões de oxigênio alveolar e arteriolar e um balanço diferente, comparado ao do pulmão pós-natal, entre mediadores vasoconstritores e vasodilatadores. Um segundo aspecto característico da circulação fetal pulmonar é a sua capacidade de auto-regulação. Com a exposição a fatores vasodilatadores como oxigênio, estresse oxidativo e agentes farmacológicos, a vasculatura pulmonar fetal inicialmente responde com vasodilatação e, em seguida, retorna à resistência vascular prévia, mesmo que o estímulo persista. Este tempo limitado de vasodilatação previne um excessivo fluxo pulmonar que poderia trazer desvantagens à manutenção da perfusão placentária. Fatores que agem diretamente no músculo liso vascular, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) causam vasodilatação sustentada no pulmão fetal (ZIEGLER et al., 1995).

Vários mediadores do tônus vascular têm sido citados como participantes deste processo transicional de adequação à vida pós-natal. A seguir descrevem-se alguns desses mediadores:

- **Oxigenação** - A hipoxemia é o estímulo mais consistente para vasoconstrição pulmonar. A vasoconstrição em resposta à hipóxia é relativamente fraca em fetos imaturos, mas é mais expressiva com o avanço da maturidade fetal. É uma ação local, que inicia e termina nos pulmões. O mais forte argumento para confirmar a ação local é a demonstração de que a hipóxia aguda causa vasoconstrição pulmonar em preparações sem nervos autonômicos ou em preparações depletadas de agonistas adrenérgicos. Um estudo com fetos

de ovelhas intra-útero mostrou que a vasoconstrição pulmonar em resposta à hipóxia não é alterada por bloqueio farmacológico dos receptores beta-adrenérgicos com propanolol, dos receptores alfa-adrenérgicos com fentolamina ou da atividade parassimpática com atropina. A inibição da síntese de prostaglandina potencializa a vasoconstrição pulmonar devido à hipóxia. A hipóxia pode afetar diretamente o músculo liso vascular pulmonar, sem a necessidade de intermediário bioquímico e mecanismos que controlem a excitação de membrana. A hipóxia provoca um aumento na produção do trifosfato de adenosina (ATP) no músculo liso vascular pulmonar e no influxo transmembrana de cálcio. O bloqueio destes canais de cálcio pode reduzir, contudo não impede, a vasoconstrição pulmonar em resposta à hipóxia em fetos de ovelhas. São necessários estudos mais detalhados para entendermos o mecanismo pelo qual a hipóxia leva à vasoconstrição pulmonar (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Balanco ácido-base** - A acidemia intensifica a resposta vasoconstritora pulmonar à hipóxia. Os efeitos da alcalose na resistência vascular pulmonar são bem menos estudados. Lyrene e Philips, 1994, evidenciaram que a alcalose, metabólica ou respiratória reduz, mas não elimina, a vasoconstrição pulmonar produzida pela hipóxia (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Adrenalina e Noradrenalina** - O músculo liso vascular pulmonar tem receptores alfa e beta-adrenérgicos. Os receptores alfa-adrenérgicos são predominantes, favorecendo a vasoconstrição em resposta a substâncias como a adrenalina, que estimula os dois tipos de receptores. Há uma relação linear entre a dose de adrenalina e de noradrenalina com o aumento da RVP. O uso de bloqueadores dos receptores alfa-adrenérgicos, como fenoxibenzamina e fentolamina, inibe completamente o efeito vasoconstritor da noradrenalina e converte a ação vasoconstritora da adrenalina em ação vasodilatadora (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Acetilcolina** - Os efeitos da acetilcolina na circulação dependem do tônus vascular pulmonar de repouso. Em condições normais, uma leve vasodilatação é produzida pela infusão da acetilcolina. Quando o tônus basal encontra-se elevado, a acetilcolina causa uma vasodilatação importante. Este efeito é mais evidente nos fetos maduros do que nos imaturos. Quando o pulmão está inflado de ar, a resposta dilatadora à acetilcolina é marcadamente acentuada. Em animais, a atropina, um agente anticolinérgico, não produz mudanças no tônus vascular de repouso, mas bloqueia os efeitos de acetilcolina exógena. A acetilcolina não interfere na vasoconstrição pulmonar causada pela hipóxia (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Bradicinina** - O papel da bradicinina na circulação pulmonar normal é desconhecido. Na maioria das espécies animais, age como substância vasodilatadora. Com o início da ventilação e aumento da PaO₂, os níveis sistêmicos de bradicinina elevam-se, enquanto os níveis dos seus precursores caem. A concentração de bradicinina declina dentro de uma hora após o nascimento (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Angiotensina II** - A enzima conversora da angiotensina que existe nas células endoteliais pulmonares converte a angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II causa vasoconstrição provavelmente por ação direta no músculo liso vascular. Bloqueadores alfa e beta-adrenérgicos produzem pequenas mudanças na resposta à angiotensina II, sugerindo que uma pequena ação da angiotensina II é mediada por receptores adrenérgicos (LYRENE e PHILIPS, 1984).

- **Serotonina** - O papel fisiológico da serotonina na circulação pulmonar normal é incerto. Sabe-se que sua infusão na circulação pulmonar causa um efeito vasoconstritor

(LYRENE e PHILIPS, 1984).

• **Prostaglandinas**- São os mediadores mais investigados do período de transição que ocorre ao nascimento. A enzima ciclo-oxigenase, responsável por converter o ácido araquidônico em prostaglandina e tromboxano, é especialmente abundante nos pulmões (STEINHORN et al., 1995).

Medicamentos bloqueadores da síntese de prostaglandinas, como a indometacina, diminuem a queda na resistência vascular e parecem bloquear o componente de dilatação que ocorre secundário à distensão rítmica dos pulmões, não afetando a dilatação causada pelas mudanças da oxigenação (STEINHORN et al., 1995). Hipertensão pulmonar persistente pode ocorrer em recém-nascidos de mães que receberam aspirina ou outros anti-inflamatórios não-esteróides que inibem a atividade da ciclooxigenase. (WHITSETT et al., 1999). A PGI₂ parece ser a responsável por estes efeitos. Alguns estudos indicam uma produção deste mediador pelos pulmões ao nascimento, não estando, ainda, definida a sua função. A produção de PGI₂ reduz após o nascimento. O aumento na RVP causado pela inibição da síntese de prostaglandinas também declina prontamente (STEINHORN et al., 1995).

A PGI₂ é produzida no pulmão neonatal em resposta à distensão rítmica dos pulmões (STEINHORN et al., 1995; WHITSETT et al., 1999). Contudo, sua produção é transitória e não participa da vasodilatação pulmonar que ocorre em resposta ao aumento do oxigênio. Da mesma forma, a indometacina não reverte a diminuição da RVP causada por oxigênio hiperbárico (WHITSETT et al., 1999).

O papel da síntese de prostaglandina parece ser modesto; é possível a existência de outros mecanismos de vasodilatação que ocasionem a redução da RVP simultaneamente ao nascimento. O papel das prostaglandinas na redução da resistência vascular com a primeira ventilação parece ser mais importante em fetos pré-termo, provavelmente pela queda

progressiva na atividade da adenilciclase conforme o feto atinge o termo, mecanismo efetor que produz a vasodilatação pelas prostaglandinas (STEINHORN et al., 1995).

- **Leucotrienos** – Os leucotrienos são potentes vasodilatadores, porém a sua produção pelos pulmões durante o início da ventilação não está definida (WHITSETT et al., 1999).

- **Óxido nítrico** - O NO, inicialmente conhecido como fator relaxante derivado do endotélio, é um importante regulador do tônus vascular. É sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase a partir da l-arginina (SMYTH, 2000). É produzido no endotélio vascular e difunde-se pelo músculo liso vascular onde ativa a enzima guanilato-ciclase, levando à produção do GMPc (ENDO et al., 2000; SMYTH, 2000). O aumento do GMPc ativa uma quinase que diminui o cálcio intracelular, seguido de relaxamento da célula do músculo liso. Os efeitos vasculares do NO são específicos e localizados devido a sua grande afinidade pela hemoglobina, especialmente desoxihemoglobina. Desta forma, o NO inalado causa vasodilatação pulmonar sem hipotensão sistêmica (WHITSETT et al., 1999).

Tem sido sugerido que a melhora na oxigenação induzida pelo NO ocorre por dois mecanismos principais (SMYTH, 2000):

1. redução na RVP, revertendo o *shunt* extrapulmonar através de uma vasodilatação pulmonar seletiva;
2. reversão do *shunt* intrapulmonar por redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar, melhorando a relação ventilação/perfusão.

Acredita-se que o NO e as prostaglandinas, a PGI₂ em particular, são os principais agentes responsáveis pela diminuição da RVP na rápida fase de transição pós-nascimento (WHITSETT et al., 1999).

• **Endotelina** - Descrita em 1988, a endotelina-1 é uma potente mediadora da transição do nascimento (STEINHORN et al.,1995). Os níveis de ET-1 estão elevados na circulação fetal, principalmente no período de 18 a 24 semanas, em relação aos níveis maternos (IVY et al., 1998). Apresenta múltiplos efeitos nos vasos, coração e pulmões. Promove contração isolada das veias pulmonares e mitogênese do músculo liso vascular; no coração, induz hipertrofia de células miocárdicas e tem efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos; no pulmão, tem propriedades broncoconstritoras (STEINHORN et al.,1995).

A endotelina será amplamente revisada na seqüência desta dissertação.

• **Histamina** – Em modelos experimentais a histamina mostrou ter ação vasoconstritora pulmonar. A ação da histamina pode verificar-se por intermédio dos seguintes receptores (LYRENE e PHILIPS, 1984):

1. alfa adrenérgicos, visto que o bloqueio destes receptores quase elimina os efeitos da histamina, e os bloqueadores beta adrenérgicos aumentam seus efeitos;

2. específicos de histamina (H1 e H2), presentes nos vasos pulmonares. Os receptores H1 promovem a vasoconstrição, e os H2 a vasodilatação. A vasoconstrição pulmonar causada pela hipóxia, em adultos, é diminuída com o uso de bloqueadores dos receptores de histamina e potencializada por inibidores da histaminase. Em contraste à ação da histamina em adultos, os receptores H1, em experimentos com cordeiros recém-nascidos e juvenis, medeiam a vasodilatação pulmonar. Este efeito é bloqueado com o uso de um antagonista específico H1, como a difenidramina. Esta evidência torna improvável que a histamina seja importante como mediador de vasoconstrição pulmonar hipóxica em neonatos.

Apesar da rápida evolução, a fase de transição pós-nascimento envolve um mecanismo complexo, com potenciais riscos para problemas decorrentes de prematuridade, hipóxia,

doença parenquimatosa ou malformações, dando curso ao desbalanço entre os mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, com repercussões importantes no recém-nascido. À medida que novos estudos são desenvolvidos com o intuito de esclarecer a fisiopatologia desse momento, será possível o entendimento das patologias e maior efetividade nas formas de tratamento.

2.3 - Endotelina

Nas últimas décadas, o endotélio tem sido reconhecido como uma importante unidade funcional envolvida na regulação do tônus do músculo liso vascular (YANAGISAWA et al., 1988). O papel das células endoteliais nesta função tem sido intensamente estudado. Em 1976, foi descrita a existência da PGI₂, uma prostaglandina com atividade vasodilatadora, na parede dos vasos sanguíneos (MONCADA et al., 1976). A seguir, Furchgott e Zawadzki, 1980, descreveram a vasodilatação dependente do endotélio (FURGHGOTT e ZAWADZKI, 1980), e, em 1985, o papel do endotélio como vasoconstritor também foi descrito. Rubanyi e Vanhoutte, 1985, descreveram que a hipóxia e a anóxia causam a liberação de uma ou mais substâncias das células endoteliais com ação vasoconstritora (RUBANYI e VANHOUTTE, 1985). Em estudo realizado com cultura de células endoteliais foi demonstrado um aumento progressivo, dose dependente, na tensão das artérias coronárias de porcos, bovinos e cães. Esta vasoconstrição necessita de cálcio extracelular e não é alterada por inibidores da ciclooxigenase e lipooxigenase, ou por antagonistas dos receptores alfa ou beta adrenérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos ou colinérgicos (HICKEY et al., 1985).

Apenas 3 anos após, em 1988, foi isolada uma proteína com potente ação vasoconstritora originada do endotélio. Yanagisawa e colaboradores, 1988, isolaram esta

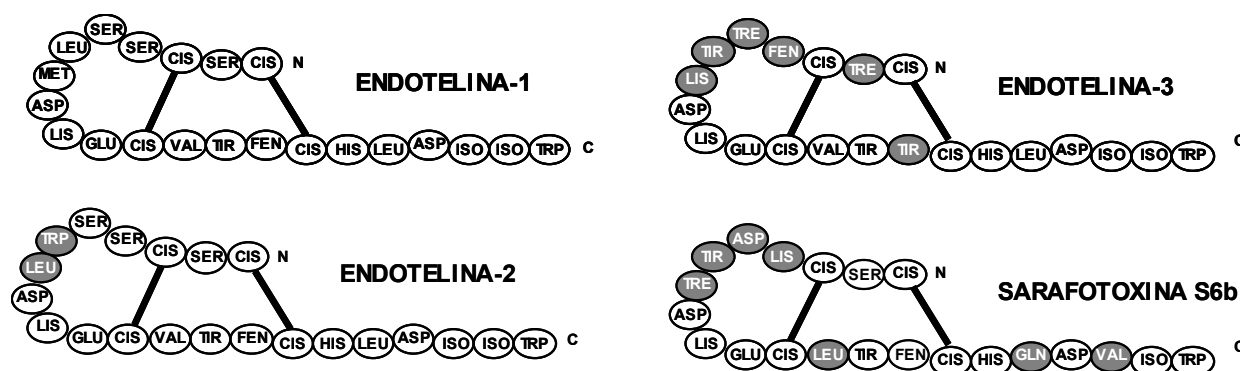
proteína da cultura do sobrenadante de células endoteliais da aorta de porcos e a chamaram de endotelina (ET) (YANAGISAWA et al., 1988).

Desde então, inúmeros estudos têm sido publicados envolvendo a ET. Originalmente foi conhecida como fator vasoconstritor; posteriormente descobriram-se outras funções biológicas no leito vascular e farta distribuição em outros tecidos. Já foram descritas suas ações broncoconstritora, mitogênica, inflamatória e até mesmo vasodilatadora (GRONECK et al., 1994; GRONECK et al., 1996; FAGAN et al., 2001).

2.3.1 - Estrutura da Endotelina

A endotelina é uma proteína composta por uma cadeia de 21 aminoácidos com duas pontes dissulfito ligando os aminoácidos cisteína 1 ao 15 e 3 ao 11 e uma longa alfa hélice carboxil terminal hidrofóbica (LERMAN et al., 1990; GORACA, 2002). Há três isoformas: ET-1, ET-2 e ET-3. As proteínas ET-2 e ET-3 diferem da ET-1 por dois e seis aminoácidos, respectivamente (MASAKI et al., 1991; MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001). A ET-1 é a isoforma mais abundante e estudada (FAGAN et al., 2001). As endotelinas têm alto grau de homologia com as sarafotoxinas (sarafotoxinas de a-e), que são proteínas cardiotoxinas isoladas do veneno da cobra *Atractaspis engaddensis* e também presentes em venenos de outras cobras e escorpiões (MASAKI et al., 1991; MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; GORACA, 2002). Todas as endotelinas e sarafotoxinas contêm 21 aminoácidos e têm identidade completa em nove aminoácidos, incluindo quatro resíduos cruciais de cisteínas que formam as ligações dissulfito intracadeia (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996). Além disso, as endotelinas compartilham os mesmos seis aminoácidos na alfa hélice carboxil terminal (MASAKI et al., 1991; MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996). A homologia de seqüências entre as endotelinas e sarafotoxinas e entre os isopeptídeos de endotelinas nos mamíferos confirma

que os genes das endotelinas evoluíram sobre grande pressão para manter sua estrutura e função com alto grau de conservação gênica (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996) (figura 2).



Fonte: Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB, O'Murchu B, Perrella MA, Heublein DM, et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. Mayo Clin Proc 1990;65:1441-55.

Fig. 2 – Estrutura das endotelinas-1,2 e 3 e da similar sarafotoxina S6b. ET-2 e ET-3 diferem da ET-1 por dois e seis aminoácidos respectivamente, enquanto a sarafotoxina difere em sete aminoácidos. Os aminoácidos diferentes estão destacados. ASP= ácido aspártico, CIS= cisteína, GLN=glutamina, GLU=ácido glutâmico, HIS=histidina, ISO= isoleucina, LEU= leucina, LIS=lisina, MET= metionina, FEN= fenilalanina, SER= serina, TRE= treonina, TRP= triptofano, TIR= tirosina, VAL= valina.

2.3.2 - Síntese e Degradação

Cada endotelina é produzida por um gene separado (LEVIN, 1995). O gene da ET-1 encontra-se no cromossoma 6, o da ET-2, no cromossoma 1, e o da ET-3, no cromossoma 20 (YANAGISAWA et al., 1988; MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001).

Todas as endotelinas são produzidas na forma de pré-pró-hormônios, atingindo, por fim, a condição de proteínas ativas (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001). A ET-1 é bem conhecida e provém de uma proteína de 212 aminoácidos chamada de pré-pró-endotelina-1 (preproET-1) (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002). A preproET-1 é clivada por endopeptases e, após, uma carboxipeptidase corta dois aminoácidos do carboxil terminal para produzir a *big* ou pró-endotelina-1 (proET-1) com 39 aminoácidos (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001; GORACA,

2002). A enzima conversora da endotelina-1 (ECE-1), por sua vez, cliva a proET-1 à proteína de 21 aminoácidos ET-1 que é 100 vezes mais potente que a proET-1 (LEVIN, 1995; MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; , FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002).

Em humanos, há 2 tipos da ECE-1: a ECE-1 alfa (ECE-1 α) e a ECE-1 beta (ECE-1 β), sendo a ECE-1 α a isoforma predominante. As células do endotélio vascular expressam a ECE-1 α (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996). Nos pulmões, a ECE-1 α é encontrada em muitos tipos de células, incluindo endotélio, epitélio e macrófagos alveolares (FAGAN et al., 2001).

Um processo similar converte a pré-pró-endotelina-2 e a pré-pró-endotelina-3 nas suas formas ativas (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996).

A ET-1 é processada e transportada na célula em vesículas (STEINHORN et al., 1995; SCHEARS e COSTARINO, 1999; FAGAN et al., 2001). Nas células endoteliais a maior parte da ET-1 (65 a 80% em células epiteliais cultivadas) é secretada na superfície não-luminal, podendo ligar-se aos receptores nas células musculares, levando à vasoconstrição (LEVIN, 1995; SCHEARS e COSTARINO, 1999). Nas células epiteliais, mais de 95% da ET-1 é liberada no lado submucoso, saindo da superfície luminal da via aérea (STEINHORN et al., 1995; FAGAN et al., 2001). Devido a esta secreção direcionada, a ET-1 age de uma forma parácrina ou autócrina na circulação, concedendo à ET-1 uma ação semelhante aos hormônios (FAGAN et al., 2001). É pouco provável que esta forma de secreção contribua para a concentração plasmática da ET-1 (LEVIN, 1995). As concentrações plasmáticas da ET-1, entretanto, têm-se mostrado úteis, correlacionando-se com a gravidade de doenças como insuficiência cardíaca congestiva, podendo ter valor diagnóstico e prognóstico (LEVIN, 1995).

A endotelina não é armazenada nas células, porque as células endoteliais não têm número substancial de grânulos secretores para possibilitar o armazenamento. Estudos

mostraram que lisado de células endoteliais, que secretam proteínas vasoconstritoras, apresentam mínima atividade de vasoconstrição, confirmando o pouco armazenamento intracelular (YANAGISAWA et al., 1988). Já alguns autores referem a presença de certa quantidade, ainda que limitada, da ET-1 pré-formada na célula endotelial que, se estimulada, levaria à imediata liberação da ET-1 (STEINHORN et al., 1995).

Algumas evidências sugerem que a ET é liberada da célula endotelial após processo intracelular, e que a secreção e a produção da ET devem ser reguladas ao nível de transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) (YANAGISAWA et al., 1988). Uma variedade de fatores de crescimento e de proteínas vasculares pode modular a transcrição do gene da ET-1. Estas substâncias podem também regular a tradução da ET-1 RNAm. A meia-vida do RNAm é de 15 a 20 minutos, e no plasma a meia-vida da ET-1 é de aproximadamente 4 a 7 minutos (LEVIN, 1995). Desta forma, as células endoteliais podem rapidamente ajustar a produção da ET-1 necessária para regulação do tônus vascular (LEVIN, 1995; GORACA, 2002).

Os pulmões são os responsáveis pela eliminação de cerca de 90% da endotelina circulante, o restante é depurado pelos rins e em menores proporções pelo fígado (LEVIN, 1995; SCHEARS e COSTARINO, 1999; GORACA, 2002). Na doença pulmonar, como na SARA em adultos, pode ocorrer redução na depuração pulmonar, liberando a ET-1 na circulação e induzindo um ciclo vicioso de dano microvascular (DRUML et al., 1993).

2.3.3 - Receptores e Mecanismo de Ação

A resposta contrátil é diferente a cada isoforma da ET (ET-2>ET-1>ET-3), sugerindo a existência de diferentes subtipos de receptores (LERMAN et al., 1990). Sabe-se da existência de dois tipos de receptores para endotelina nos mamíferos: tipo A e tipo B (ETA e ETB) (LERMAN et al., 1990; LEVIN, 1995; FAGAN et al., 2001). São receptores da

superfamília dos receptores acoplados a proteínas G (FAGAN et al., 2001). Os genes dos receptores ETA e dos ETB estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 4 e 13 (MICHAEL e MAEKEWITZ, 1996; FAGAN et al., 2001). A estrutura de aminoácidos dos dois tipos de receptores é cerca de 50% idêntica, e cada tipo é altamente conservado através das espécies de mamíferos - 85 a 90% (LEVIN, 1995). Existe ainda um terceiro subtipo de receptor, o tipo C, que possui alta afinidade pela ET-3. Este receptor foi isolado das glândulas cutâneas de um tipo de sapo africano, o *Xenopus laevis* (FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002).

O número de receptores ETA e de ETB é específico para cada célula e é regulado por uma variedade de fatores de crescimento (FAGAN et al., 2001). Abordaremos, a seguir, os receptores ETA e ETB individualmente.

2.3.3.1 - Receptores tipo A das endotelinas

Os receptores ETA têm 10 vezes mais afinidade pela ET-1 do que pela ET-3 e são abundantes nas células do músculo liso vascular e nos miócitos cardíacos (LEVIN, 1995; FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002).

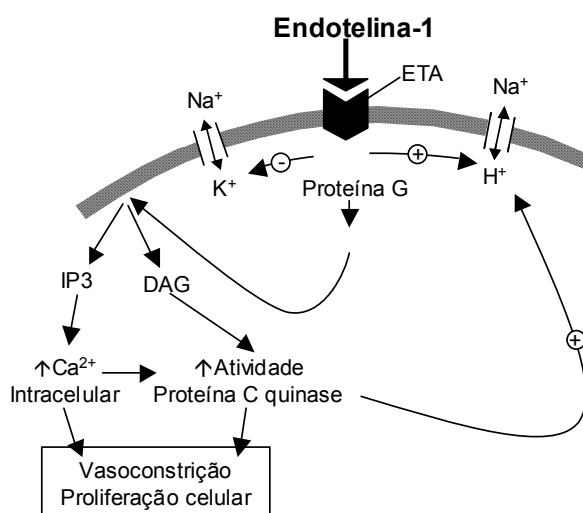
No pulmão normal, os receptores ETA são encontrados em maior quantidade no músculo vascular liso do que nas vias aéreas, sendo os predominantes na vasculatura pulmonar neonatal (LAKSHMINRUSIMHA e STEINHORN, 1999).

Os receptores ETA podem ser subclassificados em: tipo A₁ e tipo A₂, em função da suscetibilidade ao antagonista de receptor da endotelina tipo A, BQ-123, ao qual o receptor ETA₁ é sensível, e o ETA₂ é resistente (GORACA, 2002).

As funções mitogênica e inflamatória da endotelina são mediadas primariamente pelos receptores ETA (FAGAN et al., 2001). Estes receptores também medeiam a ação de vasoconstrição da endotelina-1, juntamente com os receptores ETB que contribuem para esta

ação em muitos leitos vasculares (LEVIN, 1995).

A ação vasoconstritora ocorre mediante a ligação da endotelina ao receptor ETA da membrana do músculo liso, ativando a enzima fosfolipase C e produzindo inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (LEVIN, 1995; VANE e BOTTING, 1991; STEINHORN et al., 1995). O IP3 é o gatilho que promove a liberação das reservas intracelulares de cálcio. Há um influxo de cálcio (Ca^{2+}) através dos canais de membrana, e o aumento do cálcio intracelular induz a contração muscular (STEINHORN et al., 1995; GORACA, 2002). O DAG e o Ca^{2+} estimulam a proteína C quinase, que medeia a ação mitogênica da ET-1 (LEVIN, 1995). A proteína C quinase pode aumentar a responsividade do músculo liso vascular a outros agonistas e pode promover uma sub-regulação do receptor de endotelina. O mecanismo da contração vascular de músculo liso pela endotelina-1 deve-se à elevação do cálcio intracelular, interação do cálcio com a calmodulina e cadeia leve de miosina quinase, resultando em contração muscular (STEINHORN et al., 1995) (figura 3).



Fonte: Lyrene RK e Philips JB. Control of Pulmonary Vascular Resistance in the Fetus and Newborn. Symposium on Neonatal Pulmonary Hypertension 1984;11(3):55164.

Fig. 3 – Mecanismo da ação da ET-1 após ligação ao receptor de membrana ETA. ET-1 age estimulando a hidrólise da fosfolipase C, ativando-a, levando a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O IP3 mobiliza as reservas intracelulares de cálcio. O DAG e o cálcio estimulam a proteína C quinase, e estes eventos levam a alterações nas trocas iônicas, vasoconstrição e proliferação celular.

A vasoconstrição persiste mesmo após a ET ter sido removida do receptor, provavelmente porque a concentração intracelular do cálcio permanece elevada. O NO encurta a duração da vasoconstrição, acelerando o retorno do cálcio intracelular a níveis basais (pré-contratilidade) (LEVIN, 1995).

2.3.3.2 - Receptores tipo B das endotelinas

Os receptores ETB têm a mesma afinidade às três endotelinas (LEVIN, 1995; FAGAN et al., 2001). Há dois subtipos de receptores B: os ETB₁ que medeiam a vasodilatação, e os ETB₂, a vasoconstrição (LAKSHMINRUSIMHA e STEINHORN, 1999; GORACA, 2002; SPIROPOULOS et al., 2003)

Os receptores ETB aparecem predominantemente nas células endoteliais, promovendo vasodilatação, e, em menor número, nas células vasculares do músculo liso, onde produzem vasoconstrição (LEVIN, 1995; FINEMAN et al., 1999; FAGAN et al., 2001). O estímulo dos receptores ETB localizados nas células endoteliais promovem vasodilatação por aumento na produção do NO (FAGAN et al., 2001).

Os receptores do tipo ETB₁ e ETB₂ também estão presentes na vasculatura pulmonar neonatal, apesar dos ETA serem os predominantes (LAKSHMINRUSIMHA e STEINHORN, 1999).

Os efeitos da ativação dos receptores ETB são similares àqueles da ativação dos receptores ETA. Provocam a ativação da fosfolipase C com geração de IP₃ e DAG e mobilização de cálcio. Entretanto, os receptores ETB podem ser acoplados a proteína G inibitória e, quando acionados, diminuem a síntese de adenosina monofostato cíclica (AMPC) e propiciam a ativação da bomba de sódio/hidrogênio (LEVIN, 1995).

Com a ligação da ET-3 aos receptores ETB pode ocorrer uma vasodilatação

transitória, provavelmente causada por aumento na produção de NO e de PGI₂ e ativação dos canais de potássio (LEVIN, 1995).

Esse processo de ativação dos receptores ETB pela ET-3 é importante no desenvolvimento normal das células derivadas dos precursores da crista neural na fase embrionária. Os melanócitos epidérmicos e os neurônios gangliônicos no intestino não se desenvolvem quando os receptores ETB funcionam inadequadamente, ou quando a ET-3 não é produzida. Ratos com uma mutação que inativa o gene dos receptores ETB apresentam megacolon agangliônico e extensas manchas brancas na pelagem. Uma forma hereditária de Doença de Hirschsprung em humanos tem mostrado associação com uma mutação do gene para receptores ETB que reduz a mobilização de cálcio (LEVIN, 1995).

2.3.4 – Síntese da Endotelina: Regulação e Expressão de seus Receptores

Os fatores que estimulam a produção da endotelina incluem: estimulação mecânica do endotélio, trombina, íons cálcio, epinefrina, angiotensina II, vasopressina, dopamina, eritropoetina, citocinas como a IL-1, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , diversos fatores de crescimento e endotoxinas, lipídios como lipoproteínas de baixa densidade e de alta densidade e situações de estresse (LEVIN, 1995; STEINHORN et al., 1995; FAGAN et al., 2001; GORACA, 2002). Alguns estímulos podem promover uma maior estabilidade da pré-pró-endotelina RNAm levando a um aumento da endotelina-1 (FAGAN et al., 2001). A hipóxia é um importante estímulo para a produção da endotelina-1 (SPIROPOULOS et al, 2003).

As substâncias que inibem a síntese de endotelina são NO, GMPc, ANP, PGI₂ e bradicinina (GORACA, 2002).

A PGI₂ e o NO inibem a produção da ET-1 através de um mecanismo comum que envolve a produção de GMPc (LEVIN, 1995). Agentes que aumentam as concentrações de

GMPC por diferentes mecanismos, como superóxido desmutase, vários nitrovasodilatadores e ANP previnem a liberação da endotelina-1 induzida por trombina (STEINHORN et al, 1995). O NO tem um papel importante não apenas na regulação da síntese da ET-1 como também na sua atividade. O NO é capaz de suprimir a ação da ET-1 de forma independente do GMPC, através da redução da afinidade dos receptores ETA à ET-1. Além disso, o NO modula um fenômeno pós-receptor causado pela ET-1, reduzindo o aumento do cálcio intracelular (MICHAEL e MARKEWITZ, 1996). A liberação do NO pelo endotélio exerce o conhecido mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo, com conseqüente produção da ET-1, e esta, por sua vez, pode estimular a liberação do NO e da PGI2 quando ligada ao receptor ETB nas células endoteliais. Isto pode explicar a vasodilatação transitória que ocorre com baixas concentrações da proteína, e é seguida pela contração sustentada, com elevadas concentrações de receptores ETA (STEINHORN et al, 1995).

Adrenalina, angiotensina II, trombina, algumas citocinas e outros componentes estimulam a expressão de pró-endotelina RNAm (STEINHORN et al, 1995). Dschietzig et al., 2000, em estudo experimental, evidenciaram aumento da ET-1, principalmente na sepse, após administração de antitrombina III (DSCHIETZIG et al., 2000). A ET-1 em baixas concentrações também potencia a contração devido a outros hormônios vasoconstritores, como a epinefrina exógena (STEINHORN et al, 1995).

A endotelina aumenta a liberação de inúmeras substâncias como: aldosterona, catecolaminas, vasopressina, ANP, angiotensina II, hormônio liberador de gonadotrofina, substância P e hormônio do crescimento. Além disso, tem um efeito direto no músculo liso arterial, uma vez que o bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos, serotoninérgicos e muscarínicos, bem como das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, não são suficientes para impedir sua ação vasoconstritora (GORACA, 2002).

Após a descoberta da endotelina, vários estudos têm sido realizados para esclarecer o

comportamento deste importante regulador do tônus vascular.

Ekblad et al., 1993, dosaram a ET-1 por radioimunoensaio (RIE) em pacientes de diferentes faixas etárias a fim de conhecer o seu perfil, no entanto a amostra era pequena e heterogênea. Estes autores encontraram níveis da ET-1 elevados em RNPT ($7,8 \pm 4,5$ pmol/L), intermediários em crianças com 13 a 24 meses ($3,7 \pm 1,1$ pmol/L) e menores em adultos ($0,6 \pm 4,9$ pmol/L), demonstrando um decréscimo nos níveis da ET-1 com o avanço da idade (EKBLAD et al., 1993).

Kuo et al., 2001, observaram que a concentração plasmática da ET-1 é similar entre RNPT saudáveis e recém-nascidos a termo ($3,92 \pm 0,88$ pg/mL e $3,56 \pm 1,98$ pg/mL; $p=0,606$) (KUO et al., 2001).

Kanai et al., 1996, não encontraram diferença no nível plasmático e na taxa de excreção urinária da ET-1 em adultos jovens saudáveis com o passar do dia nem relação com exercício leve. Este estudo avaliou 13 adultos jovens saudáveis com dosagens da ET-1 durante o dia e após uma hora de caminhada, sem diferenças significativas (KANAI et al., 1996).

Como a produção da ET-1 e a expressão de seus receptores são influenciadas por diversos mecanismos, tem sido muito difícil determinar o papel da ET-1 nos diferentes estados patológicos (FAGAN et al., 2001).

2.3.5 - Ações das Endotelinas

A endotelina-1 é o único membro produzido pelas células endoteliais e é a mais estudada do grupo, com uma potente ação vasoconstritora. É produzida principalmente pelas células endoteliais e pelas células do músculo liso vascular, como também por astrócitos e neurônios no sistema nervoso central, células endometriais, células epiteliais nas mamas,

células de Sertoli, células mesangiais nos rins e hepatócitos (LEVIN, 1995; GORACA, 2002). A síntese da ET-1 nos pulmões ocorre no epitélio alveolar, endotélio, macrófagos e células neuroendócrinas (SCHEARS e COSTARINO, 1999; FAGAN et al., 2001). Estudos mostraram que a endotelina é um potente mediador da transição do nascimento (STEINHORN et al, 1995).

A ET-1 tem importantes efeitos pró-inflamatórios, incluindo o estímulo à expressão de moléculas de adesão do endotélio e neutrófilos, promovendo a adesão e a transmigração através da parede vascular, estimulando a liberação do ácido aracdônico e a produção de radicais livres de oxigênio pelos macrófagos e monócitos circulantes e estimulando a produção de elastase pelos neutrófilos. Parece, também, estimular a produção de monócitos e de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (SCHEARS e COSTARINO, 1999).

A ET-2 é produzida predominantemente nos intestinos e nos rins, e em menor quantidade no miocárdio, na placenta e no útero, mas sua origem celular ainda não está definida. Não tem funções fisiológicas únicas como ocorre com a ET-1 (LEVIN, 1995; GORACA, 2002).

A ET-3 circula no plasma, da mesma forma que a ET-1 (LEVIN, 1995). Sua origem é desconhecida, sendo encontrada em altas concentrações no cérebro, onde provavelmente, está envolvida em funções de neuroregulação. Também pode ser encontrada no trato gastrointestinal, pulmões e rins (LEVIN, 1995; GORACA, 2002).

As concentrações da endotelina em fluidos corporais, especialmente saliva, leite, urina e líquido cefaloraquidiano são muitas vezes mais elevadas que as no plasma (GORACA, 2002).

2.3.5.1 - Endotelina-1 nas Vias Respiratórias

Nas vias respiratórias a ET-1 tem atividade de broncoconstrição, secreção de muco, proliferação celular e ações inflamatórias (DRUML et al., 1993; LEVIN, 1995; STEINHORN et al., 1995; FAGAN et al., 2001; BLOUQUIT et al., 2003).

As endotelinas promovem broncoconstrição em vias respiratórias intactas, porém o efeito da ET-1 é o mais potente, isto ocorre em função da modulação da ação da ET-1 pelo epitélio. A ET-1 tem efeitos na liberação de múltiplos mediadores, mas a ação broncoconstritora parece ser por efeito direto sobre o receptor da endotelina. A broncoconstrição é mais evidente com o uso de agonistas dos receptores ETB e não é inibida quando utilizados antagonistas dos receptores ETA, o que sugere que a broncoconstrição seja mediada pelos receptores ETB. O receptor ETA pode ter alguma ação modulando broncoconstrição quando ocorre lesão do epitélio brônquico. Em culturas de células epiteliais das vias aéreas, estas secretam iguais quantidades de ET-1 e ET-3 que têm afinidade equivalente pelo receptor ETB. Desta forma, acredita-se que a broncoconstrição nos humanos seja mediada por ambas as isoformas da endotelina (FAGAN et al., 2001).

Blouquit et al., 2003, investigaram os efeitos da ET-1 na absorção de sódio e excreção de cloro nas células epiteliais brônquicas humanas. Concluíram que a ET-1 é um secretagogo de cloro nas vias aéreas de humanos e age presumivelmente através dos receptores ETB, ativando a via do AMPc (BLOUQUIT et al. 2003).

A ET-1 tem sido implicada na patogênese das bronquiectasias e bronquiolite obliterante porque promove quimiotaxia, aderência e ativação de neutrófilos. Em transplantes de pulmões, há vários estudos mostrando a ET-1 como importante fator na injúria de isquemia reperusão no momento do transplante, assim como nas rejeições aguda e crônica do enxerto (FAGAN et al., 2001).

Pacientes com asma apresentam uma maior expressão da ET-1 nas células epiteliais

brônquicas (SPIROPOULOS et al., 2003). A ET-1 está elevada nas vias respiratórias de pacientes asmáticos, e os níveis circulantes estão aumentados em crianças com asma, causando broncoconstrição, aumentando a reatividade brônquica a antígenos inalados e maior fluxo de células inflamatórias, com a produção de citocinas, edema e remodelamento nas vias respiratórias em função da reação inflamatória (FAGAN et al., 2001; SPIROPOULOS et al., 2003). Esta reação inflamatória das vias respiratórias também promove maior produção da ET-1, perpetuando a inflamação e a broncoconstrição (FAGAN et al., 2001). A ET-1 produz uma contração potente e prolongada das vias respiratórias em animais e também em humanos. Acredita-se que os efeitos pró-inflamatórios nas vias aéreas sejam ambos quimioatrativos e autoreguladores de outros mediadores inflamatórios, como a IL-6 e a IL-8 (SPIROPOULOS et al., 2003).

Há evidências de níveis elevados da ET-1 no plasma e no lavado broncoalveolar de pacientes com crise aguda de asma, estes valores caíram com o tratamento da crise e se correlacionaram com a gravidade do quadro (SPIROPOULOS et al., 2003).

Na asma há um relativo aumento na expressão dos receptores ETB em relação aos receptores ETA, o que pode contribuir para a maior broncoconstrição (FAGAN et al., 2001).

Spiropoulos et al., 2003, encontraram níveis da ET-1 significativamente elevados em adultos com doença pulmonar obstrutiva crônica e mais hipoxêmicos do que nos com doença pulmonar obstrutiva crônica não hipoxêmicos. Os níveis da ET-1 também foram elevados nos adultos asmáticos durante o dia (SPIROPOULOS et al., 2003).

A SARA é uma doença caracterizada por hipóxia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado difuso no raio-x de tórax. As doenças que predispõem ao desenvolvimento da SARA geralmente são de duas categorias: condição inflamatória sistêmica, que envolve os pulmões, como na sepse, ou lesão primária dos pulmões que progride para SARA, como na pneumonia aspirativa ou infecciosa (SCHEARS e

COSTARINO, 1999).

A ET-1 pode agir como imunomodulador, por isso, um aumento nos níveis da ET-1 pode contribuir para a injúria pulmonar pela indução da expressão de citocinas, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-8, que podem estimular a produção de muitos outros mediadores inflamatórios. A ET-1, também pode, de forma direta, ativar e aumentar a migração dos neutrófilos e o alçaponamento de ar nos pulmões (FAGAN et al., 2001).

Druml et al., 1993, compararam os níveis plasmáticos da ET-1 em 14 pacientes com SARA que apresentavam trocas gasosas muito comprometidas com sete pessoas saudáveis. Estes autores demonstraram uma redução na depuração da ET-1 pelos pulmões nos pacientes com SARA quando comparado com os controles, sugerindo que na SARA ocorre não somente um aumento na produção de ET-1, como também diminuição na depuração da ET-1 pelos pulmões (DRUML et al, 1993).

Langleben et al., 1993, estudando pacientes com SARA, não encontraram diferenças nos níveis da ET-1 no início da evolução da doença entre os sobreviventes e os não sobreviventes (LANGLEBEN et al., 1993).

Dobyns et al., 1999, descreveram um aumento significativo nos níveis da ET-1 plasmática em crianças com SARA e consideraram que estes níveis podem servir como um marcador precoce de evolução desfavorável. Estudaram 23 crianças com SARA nos primeiros sete dias de evolução e tiveram como grupo controle 9 crianças intubadas para realizar cirurgias cardíacas. Os níveis da ET-1 (*R&D systems*) foram maiores no grupo doente do que no controle ($6,6 \pm 2,4 \text{ pg/mL}$ e $\leq 1,2 \text{ pg/mL}$; $p < 0,05$). Ao avaliarem apenas os pacientes com SARA, encontraram, no grupo que sobreviveu, níveis da ET-1 menores na dosagem inicial ($3,5 \pm 0,8 \text{ pg/mL}$ e $13,7 \pm 6,7 \text{ pg/mL}$; $p < 0,05$) e na dosagem com 24 horas de evolução ($2,2 \pm 0,2 \text{ pg/mL}$ e $12,4 \pm 6,3 \text{ pg/mL}$; $p < 0,05$). Nas 72 horas não houve diferença entre os grupos de sobreviventes e não sobreviventes. Os níveis da ET-1 diminuíram ao longo do tempo, mas

sempre foram mais elevados no grupo com SARA do que no controle. Na fisiopatologia da SARA há edema pulmonar grave, hipertensão pulmonar, perda de volume pulmonar e redução da complacência pulmonar e nas trocas gasosas. Os mecanismos que determinam a gravidade da SARA não estão completamente esclarecidos, mas incluem: súbita ruptura das barreiras epitelial e endotelial, inflamação pulmonar progressiva, definida por ativação e acúmulo de neutrófilos, e aumento da liberação de diversas citocinas e mediadores vasoativos (DOBYNS et al., 1999).

2.3.5.2 – Endotelina-1 no Sistema Cardiovascular

A ET-1 induz contração isolada das veias pulmonares e mitogênese do músculo liso vascular (STEINHORN et al., 1995). Os seus receptores ETA e ETB são os responsáveis pela manutenção do tônus basal do músculo liso vascular. Os receptores ETB₁, localizados no endotélio vascular, junto com o NO, promovem vasodilatação, enquanto os receptores ETA e os ETB₂, localizados no músculo liso vascular, medeiam vasoconstrição. *In vivo*, a ET-1 estimula a síntese de prostaglandinas, que exerce um efeito vasodilatador, mas não influencia na produção do mais potente vasodilatador que é o NO. O NO, o ANP e outros vasodilatadores aumentam os níveis celulares de GMPc, e este último reduz a liberação da ET-1. A ação vasoconstritora da ET-1 é dependente da sua concentração e da integridade do endotélio vascular. Quando os níveis da ET-1 estão baixos num endotélio intacto, o estímulo do sistema simpático aumenta a resposta de vasoconstrição provocada pela endotelina. O seu efeito vasoconstritor é marcadamente aumentado quando se sobrepõe ao efeito da serotonina no endotélio lesado. A contração do músculo liso vascular é tão pronunciada, que a reação não pode ser aumentada pelo estímulo do sistema simpático (GORACA, 2002).

As ações da ET-1 via receptores ETA contribuem para o tônus vasoconstritor basal

coronariano e disfunção endotelial. Há pesquisas experimentais mostrando uma redução na incidência de morte súbita e na extensão do infarto agudo do miocárdio com o uso de bloqueadores da endotelina. Os antagonistas da endotelina são fármacos promissores no tratamento das doenças cardiovasculares (GORACA, 2002).

No coração, a ET-1 induz hipertrofia de células miocárdicas e tem efeitos inotrópico e cronotrópico positivos (STEINHORN et al., 1995; GORACA, 2002). Em miócitos ventriculares imaturos foi observado que causa efeito inotrópico negativo, com redução no fluxo de cálcio e leve acidose intracelular. O isoproterenol, um agonista adrenérgico, exerce um efeito inotrópico negativo, promovendo redução do cálcio intracelular (GORACA, 2002).

Além disso, a ET-1 é um potente fator de crescimento para cardiomiócitos, promove hipertrofia miocárdica e injúria celular em miócitos cardíacos, tanto que, na insuficiência cardíaca, a produção da ET-1 encontra-se aumentada e a sua administração provocou arritmia em estudos experimentais (GORACA, 2002).

Um aumento nos níveis da ET foi detectado na doença cardíaca isquêmica. Os pacientes com infarto agudo do miocárdio, especialmente quando complicado com falência circulatória e choque cardiogênico, os pacientes com defeitos cardíacos congênitos e adquiridos e os pacientes após transplante cardíaco, quando em uso de ciclosporina, apresentam elevados níveis da ET-1 (GORACA, 2002). A ET-1 também tem sido implicada como um dos fatores da lesão miocárdica de reperfusão após infarto agudo do miocárdio (LEVIN, 1995).

Os níveis da ET-1 estão elevados 2 a 4 vezes no plasma de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva moderada a grave, correlacionando-se com a gravidade da doença, independentemente da doença de base. A taxa de mortalidade um ano após infarto agudo do miocárdio está fortemente correlacionada com a concentração plasmática da ET-1 no 3º dia após o evento, evidenciando seu valor prognóstico (LEVIN, 1995).

A ET-1 causa um aumento, dose dependente, na pressão arterial. Um aumento de 2 a 3 vezes nos níveis séricos da ET-1 promove uma elevação na pressão arterial sanguínea de 19%. Imediatamente após administração da ET-1 pode ser observada uma queda na pressão arterial. Este efeito está associado a um aumento na liberação do NO ou do ANP. Em seguida, ocorre um marcado aumento na pressão arterial devido a um aumento na resistência vascular que persiste durante o efeito pressor prolongado, característico da ET-1. Esta ação não é dependente dos níveis séricos, mas da lenta dissociação da ET-1 de seus receptores. A ET-1 aumenta a sensibilidade da parede vascular a outras substâncias, como noradrenalina e serotonina, aumentando as reações pressoras a estas. Os níveis da ET-1 são significativamente mais altos nos pacientes hipertensos do que nos normotensos. Há estudos experimentais mostrando efeitos benéficos do uso de bloqueadores de receptores da ET-1 no manejo da hipertensão arterial (GORACA, 2002).

2.3.5.3 - Endotelina no Sistema Nervoso Central

A transcrição da ET-1 RNAm foi encontrada em vários tecidos, inclusive nos neurônios, sugerindo uma variedade de papéis fisiopatológicos da ET (LEVIN, 1995). A ET-1 é uma das substâncias que promovem vasoespasmo cerebral após hemorragia subaracnóide (LEVIN, 1995; GORACA, 2002).

A concentração da ET-1 está muito elevada após infarto cerebral isquêmico, e a aplicação tópica da ET-1 em vasos sanguíneos cerebrais induz, *in vitro*, ao vasoespasmo. A ET-1 pode contribuir para a lesão isquêmica secundária à lesão hipóxica do endotélio vascular cerebral que ocorre após trombose ou infarto cerebral, comprometendo o parênquima cerebral da mesma forma que ocorre nos rins e no coração (LEVIN, 1995).

A ET-1 e a ET-3 são as únicas proteínas conhecidas que ativam a bomba de sódio-potássio-cloreto nas células capilares endoteliais cerebrais; desta forma, exercem função de regulação da permeabilidade da barreira hemato-cefálica, mantendo o nível de potássio baixo dentro do sistema nervoso central, o que é importante na manutenção da despolarização neuronal e subsequente controle da condução do impulso nervoso (LEVIN, 1995).

2.3.5.4 - Endotelina nos Rins

A ET controla múltiplos aspectos da função renal (GORACA, 2002). Nos rins, a produção da ET-1 não é restrita ao endotélio vascular, depende também de células epiteliais derivadas de diferentes segmentos do néfron e de células mesangiais (RASCHER et al., 1994; MATTYUS et al., 1994; SULYOK et al., 1993). A produção local da ET-1 age de forma parácrina e autócrina para modular o processo de transporte tubular renal, incluindo reabsorção de sódio e água (RASCHER et al., 1994).

Os receptores ETA são predominantes nas veias retas e nas artérias arqueadas dos rins, enquanto os receptores ETB são encontrados predominantemente nos ductus coletores, sugerindo diferentes papéis na modulação da reabsorção de sal e água (LEVIN, 1995). Ambos os receptores são encontrados no glomérulo renal (LEVIN, 1995).

A ET-1 aumenta a resistência vascular renal, diminui o fluxo renal e a filtração glomerular mesmo com altas concentrações do ANP (LERMAN et al., 1990; LEVIN, 1995; GORACA, 2002). Ocorre vasoconstrição das arteríolas renais aferentes e eferentes, assim como das artérias arqueadas e intertubulares (LEVIN, 1995). A ET-1 age sobre a excreção de H⁺ no túbulo proximal e reduz a produção de renina, *in vitro*, em células justaglomerulares. A endotelina reduz a excreção de sódio potássio e de proteínas na urina. O uso de bloqueadores da endotelina, como o bosentan, previne o aumento na resistência vascular renal e leva a um

significante aumento no fluxo sanguíneo renal, resultando em diminuição da fração de excreção e em aumento na excreção de sódio urinário. A ET também estimula a liberação de inúmeras outras substâncias ativas nos rins, como aldosterona e angiotensina II (GORACA, 2002).

As concentrações séricas da ET-1 não têm correlação com a taxa de filtração glomerular ou com sua excreção renal. Desta forma, tem sido sugerido que a excreção renal da ET-1 reflete o nível intrarenal, em particular dos ductos coletores da camada íntima, e não a filtração glomerular e a reabsorção tubular (MATTYUS et al., 1994). Portanto, a excreção urinária da ET-1 reflete sua síntese renal e pode ser usada como estimativa da sua produção renal (SULYOK et al., 1993).

Berbinschi et al., 1989, estudaram 37 adultos saudáveis e descreveram que as concentrações da endotelina-1 imunorreativa (irET-1) na urina são cerca de seis vezes maiores que as encontradas na circulação, independente do sexo (BERBINSCHI et al., 1989).

Mattyus et al., 1994, mostraram que a excreção renal da ET-1 aumenta com a idade, mas esta diferença desaparece quando é feita uma correção pela superfície corporal. Em RNPT, a concentração urinária da ET-1 se correlacionou positivamente com a IG. A excreção diária da ET-1 corrigida pela superfície corporal é maior em RNPT e, nos recém-nascidos a termo, cai a valores não significativamente diferentes daqueles encontrados em crianças mais velhas. É possível que os maiores níveis dos RNPT sejam explicados por serem estes mais doentes, com disfunção respiratória e em uso de ventilação mecânica (MATTYUS et al., 1994).

A ação de vasoconstrição renal da ET-1 explica seu envolvimento na insuficiência renal aguda (VANE e BOTTING, 1991). Níveis plasmáticos elevados da ET-1 têm sido descritos em pacientes com insuficiência renal, especialmente nos estágios mais avançados de uremia, nos pacientes em hemodiálise e ainda nos transplantados renais (VANE e BOTTING,

1991; GORACA, 2002). Possíveis explicações são uma redução na eliminação da ET-1 ou um aumento na sua síntese pelo tecido renal (VANE e BOTTING, 1991). A nefrotoxicidade da ciclosporina pode ser causada, pelo menos em parte, pelo aumento nos níveis da ET-1. Em estudo experimental, com artérias renais de ratos, observaram que a inibição da ação da ET previne os efeitos vasoconstritores da ciclosporina (LEVIN, 1995).

2.3.5.5 - Endotelina em Doenças Malignas

Os efeitos mitogênicos da ET-1 podem ter papel no desenvolvimento de câncer de pulmão e nas metástases. Muitas linhas de células tumorais produzem ET-1, como próstata, mama, estômago, ovário e cólon. Há estudos mostrando modificações no crescimento de tumores com o uso de antagonistas de receptores da ET-1 (FAGAN et al., 2001).

2.3.5.6 - Endotelina-1 na Gestação e no Parto

Os estudos que envolvem níveis da ET-1 e a evolução da gestação são controversos, alguns demonstram correlação com níveis mais altos na medida em que se aproxima o termo e outros não encontram essa relação (HAKKINEN et al., 1992; RADUNOVIC et al., 1995; ORBAK et al., 1998).

Hakkinen et al., 1992, observaram elevação no nível sérico materno da ET-1 com o avanço da gestação até o parto ($1,2 \pm 0,13$ pmol/L com 32-34 semanas de gestação; $2,4 \pm 0,2$ pmol/L com 38-41 semanas de gestação e $3,4 \pm 0,3$ pmol/L durante o parto). As concentrações da ET-1 no sangue de cordão umbilical foram maiores no parto vaginal do que no cesário sem trabalho de parto ($52,9 \pm 11,4$ pmol/L e $9,0 \pm 1,1$ pmol/L; $p < 0,001$). Os níveis no cordão umbilical e sangue retroplacentário foram mais altos do que em qualquer outra

condição fisiológica, sugerindo que este aumento na liberação da ET-1 durante o parto seja responsável pela constrição dos vasos sanguíneos do cordão umbilical e do leito placentário (HAKKINEN et al., 1992).

Já Radunovic et al., 1995, não encontraram correlação entre os níveis maternos da ET-1 e a evolução da gestação, nem com os níveis da ET-1 no feto. O nível da ET-1 no feto é maior que na mãe e eleva-se ao nascimento (2,5pg/mL (0,9 a 5,7pg/mL), 1,3pg/mL (0,8 a 3,2pg/mL) e 15,7pg/mL (8,1 a 19,6pg/mL)) (RADUNOVIC et al., 1995).

Orbak et al., 1998, também não encontraram correlação entre os valores maternos da ET-1 com idade gestacional (ORBAK et al., 1998).

Os níveis da ET-1 são maiores em gestantes com pré-eclâmpsia e eclâmpsia e o tratamento da hipertensão, com sulfato de magnésio, reduz os níveis da ET-1 no plasma materno (LEVIN, 1995; GAO et al., 1996; WOLFF et al., 1996; BUSSEN et al., 1999; KHEDUN et al., 2002; SLOWINSKI et al., 2002; SAGSOZ e KUCUKOZKAN, 2003). A ET-1, juntamente com a diminuição na produção de PGI₂ e NO, podem contribuir para a hipertensão que caracteriza a pré-eclâmpsia (LEVIN, 1995). Os níveis da ET-1 no sangue de cordão umbilical não foram diferentes entre os filhos de mães com e sem pré-eclâmpsia e eclâmpsia (WOLFF et al., 1996).

2.3.5.7 - Endotelina-1 na Adaptação Circulatória Pós-Nascimento

Os níveis da ET-1 no sangue do cordão umbilical são mais elevados do que no plasma materno (ORBAK et al., 1998; BUSSEN et al., 1999; WOLFF et al., 1996).

Endo et al., 2000, estudaram os níveis da ET-1 e do NO_x (metabólitos do óxido nítrico, nitritos e nitratos) em 14 recém-nascidos a termo saudáveis, sem sintomas respiratórios na primeira semana de vida, dosaram a ET-1 por RIE com 0 a 6 horas, 24 horas e

5 dias de vida, evidenciando uma redução na concentração plasmática da ET-1 com o passar do tempo. Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis da ET-1 com 0 a 6 horas ($8,8 \pm 2,5 \text{ pg/mL}$) e 24 horas de vida ($6,6 \pm 1,6 \text{ pg/mL}$), e com 24 horas e 5 dias de vida ($4,5 \pm 0,9 \text{ pg/mL}$). A razão NOx/ET-1 também cai e tem relação inversa com a pressão média estimada da artéria pulmonar verificada por ecocardiografia ($r=0,6$). A razão NOx/ET-1 é utilizada como índice da potência relativa do NO e da ET-1, com uma razão elevada indicando uma vasodilatação e, uma baixa, uma vasoconstrição (ENDO et al., 2000).

Os efeitos da ET-1 na RVP no feto normal são mediados pelos receptores ETA e ETB. O receptor ETA é localizado na célula do músculo liso vascular, contribuindo para vasoconstrição, e o receptor ETB está presente nas células endoteliais, promovendo vasodilatação através da liberação do NO. A ET-1 RNAm foi isolada de vasos sanguíneos no pulmão perinatal e os níveis circulantes da ET-1 imunorreativa são elevados nas circulações fetal e transicional. Apesar do papel fisiológico do receptor ETB no pulmão fetal e neonatal não ter sido completamente explicado, é provável que a ET-1 seja uma importante moduladora do tônus vascular pulmonar fetal. A redução dos níveis endógenos da ET-1 provavelmente contribui para a queda da RVP na circulação transicional. As mudanças na concentração da ET-1 mostradas no estudo de Endo et al., 2000, concordam com outros estudos e sugerem que a ET-1 é um contribuinte mais importante para vasodilatação pulmonar precoce do que o NO. A ET-1, induzindo à vasoconstrição, pode ter influenciado, em parte, os valores da pressão pulmonar média. É possível que a liberação da ET-1 ao nascimento promova a produção do NO por estímulo do receptor ETB durante o período transicional. Diferenças nos tipos e densidade dos receptores no leito vascular podem explicar diferenças no efeito da ET-1 na circulação pulmonar (ENDO et al., 2000).

O NO exerce um *feedback* negativo na produção da ET-1 via GMPc. A ET-1 pode estimular a liberação do NO ao ligar-se aos receptores ETB nas células endoteliais (ENDO et

al., 2000).

Winters et al., 1996, avaliaram o papel da ET-1 no aumento do fluxo sanguíneo pulmonar e diminuição da RVP que ocorrem com o primeiro esforço respiratório ao nascer. Em um estudo experimental com fetos de ovelha ventilados e não ventilados intra-útero, com e sem bloqueador do receptor da ET-1, concluíram que a ET-1 não contribui de forma importante para a resposta de vasodilatação à ventilação com oxigênio intra-útero (WINTERS et al., 1996).

Tsukahara et al., 2002, estudaram o papel de mediadores vasoativos e natriuréticos na adaptação perinatal. Dosaram a ET-1, a adrenomedulina, a arginina vasopressina, os NOx, o peptídeo natriurético cerebral e o ANP no sangue de cordão umbilical de vinte e quatro bebês saudáveis nascidos de parto vaginal, encontrando valores da ET-1 em média de $7,7 \pm 0,7$ pg/mL e correlação positiva com o nível da adrenomedulina ($r=0,61$; $p<0,005$). Os níveis da arginina vasopressina, ET-1 e adremodulina foram maiores que os de adultos normais, enquanto os níveis dos NOx, ANP e peptídeo natriurético cerebral foram quase comparáveis aos valores de adultos. A adremodulina é uma proteína com uma importante ação vasodilatadora, sendo secretada principalmente pelo endotélio vascular e exercendo suas ações nos pulmões, rins e outros órgãos (TSUKAHARA et al, 2002).

Mildenberger et al., 2003, em estudo experimental concluíram que o óxido nítrico medeia a hiperpolarização hipóxica e a vasodilatação nas veias umbilicais, e a ET-1, via ativação do receptor ETB_1 nas células endoteliais, também contribui para este efeito (MILDENBERGER et al., 2003).

2.3.5.8 - Endotelina no Canal Arterial

A ET-1, uma vez localmente produzida, tem sido implicada no fechamento do canal

arterial ao nascimento (LEVIN, 1995). Em estudos experimentais com canal arterial isolado de fetos a termo de ovelhas, a ET-1 em baixas doses induziu uma constrição prolongada sob baixas concentrações de oxigênio. Somando ao fato de que há um aumento na concentração plasmática fetal da ET-1 próximo ao termo, estes resultados pressupõem um papel potencial da ET-1 no fechamento do canal arterial ao nascimento (MASAKI et al, 1991).

2.3.5.9 - Endotelina-1 na Sepsé Neonatal

A ET-1 está elevada no choque séptico (GORACA, 2002).

Figueras-Aloy et al., 2003, encontraram níveis elevados da ET-1 na sepsé neonatal com hemocultura positiva com pico nos dias 3 a 5 de evolução da sepsé, antes mesmo da elevação do Nox, cujo pico ocorre nos dias 7 a 9. Apenas recém-nascidos com sepsé grave têm significativos aumentos da ET-1 desde o início do processo. Não houve diferença no nível da ET-1 nas primeiras 48 horas do diagnóstico da sepsé entre os grupos de recém-nascidos saudáveis, com sepsé clínica mas sem hemocultura positiva e com sepsé de moderada gravidade com hemocultura positiva. Neste estudo foi observada uma correlação positiva entre o escore de SNAPPE-II e os níveis da ET-1 nos pacientes com sepsé ($r=0,29$; $p=0,03$) (FIGUERAS-ALOY et al., 2003).

A expressão da ET-1 RNAm é mais elevada após o tratamento das células endoteliais com citocinas, como TNF- α , ou com substâncias vasoativas usualmente necessárias ao tratamento do choque séptico. Durante a resposta inflamatória pós-sepsé, as endotelinas podem originar-se do endotélio lesado por isquemia ou da síntese de monócitos ou macrófagos. Inicialmente as endotelinas podem ser benéficas ao choque séptico, compensando a redução no tônus vascular; a vasoconstrição, entretanto, piora a perfusão dos órgãos isquêmicos, especialmente dos rins, o que pode levar a insuficiência renal aguda

(FIGUERAS-ALOY et al., 2003).

2.3.5.10 - Endotelina-1 na Asfixia Perinatal

Recém-nascidos asfixiados apresentam níveis da ET-1 no sangue de cordão umbilical mais elevados do que os não-asfixiados (KOJIMA et al., 1992; ROSENBERG et al., 1993; LAFORGIA et al., 2001). Laforgia et al., 2001, encontraram níveis mais elevados da ET-1 no sangue de cordão umbilical em recém-nascidos com escore de Apgar baixo no 5º minuto, sendo mais elevado nos com Apgar menor do que seis (LAFORGIA et al., 2001).

2.3.5.11 - Endotelina-1 na Hérnia Diafragmática Congênita

Kobayashi e Puri, 1994, estudaram 8 pacientes com hérnia diafragmática e insuficiência respiratória grave logo após o nascimento, comparando-os com 15 recém-nascidos sem doença pulmonar. A ET-1 dosada por imunocitoquímica no momento da admissão na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal nos casos e nos controles mostrou ser mais elevada no plasma dos pacientes com hérnia diafragmática congênita complicada por HPP. Os altos níveis são explicados pela maior produção local da ET-1 na vasculatura pulmonar dos pacientes com HPP, sugerindo que a ET-1 possa ser o mediador da hipertensão pulmonar em pacientes com hérnia diafragmática congênita (KOBAYASHI e PURI, 1994).

2.3.5.12 - Endotelina-1 na Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém-Nascido

A hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido está associada com muitas doenças do período neonatal que promovem a manutenção da vasoconstrição pulmonar, como

a asfíxia perinatal e a síndrome da aspiração de mecônio. A HPP é caracterizada por aumento da RVP e remodelamento vascular anormal. Os mecanismos fisiopatológicos para esta vasoconstrição nos recém-nascidos ainda não estão definidos (KUMAR et al., 1996).

Rosenberg et al., 1993, dosaram a irET-1 por RIE e mostraram que pacientes com HPP tem níveis mais elevados da irET-1 quando comparados aos valores de RNPT com DMH sem HPP ($27,6 \pm 3,6 \text{ pg/mL}$ e $11,8 \pm 1,2 \text{ pg/mL}$, respectivamente; $p < 0,01$). Encontraram uma correlação positiva com a gravidade da doença, visto que os recém-nascidos com HPP grave que necessitaram de ECMO (membrana de oxigenação extracorpórea) tiveram níveis mais altos da irET-1 do que os que não necessitaram deste suporte ($31 \pm 4,7 \text{ pg/mL}$ e $21,2 \pm 2 \text{ pg/mL}$; $p < 0,05$). Além disso, os pacientes que não fizeram uso de ECMO tiveram uma diminuição progressiva nos níveis da ET-1 com a melhora clínica da HPP, e aqueles que utilizaram ECMO permaneceram com níveis elevados da irET-1. Não houve relação entre valores da irET-1 pré-ECMO com o tempo de uso do ECMO. O nível persistentemente elevado da irET-1 durante a ECMO não está relacionado ao processo inicial que fez necessitar do suporte, e sim, deve-se ao baixo fluxo pulmonar durante a ECMO, que resulta em menor *clearance* ou maior ativação da sua síntese (ROSENBERG et al., 1993).

Kumar et al., 1996, dosaram a irET-1 em 40 recém-nascidos a termo, metade com diagnóstico de HPP e os outros saudáveis. Os níveis da irET-1 foram maiores no grupo de pacientes com HPP quando comparados aos controles ($2 \pm 0,3 \text{ pg/mL}$ e $1 \pm 0,3 \text{ pg/mL}$, respectivamente; $p = 0,02$). Estes autores observaram uma correlação entre os valores da irET-1 com a duração da ECMO ($r = 0,4$; $p = 0,05$) e com a pressão média das vias respiratórias ($r = 0,5$; $p = 0,02$). É possível que a ET-1 seja um marcador de gravidade da doença nestes recém-nascidos, em função da proximidade anatômica entre o sítio de produção (células endoteliais) e o sítio de ação (células do músculo liso vascular) da ET-1. É possível, também, que as concentrações da ET-1 na interface endotélio-células do músculo liso vascular sejam

muito maiores que as observadas na circulação. A elevada concentração da irET-1 em recém-nascidos com HPP pode estar relacionada a uma redução do fluxo sanguíneo pulmonar e a uma injúria vascular e do parênquima pulmonar (KUMAR et al., 1996).

Fineman et al., 1999, desenvolveram um modelo experimental de HPP com e sem lesão pulmonar aguda em filhotes de ovelha com 3 a 5 dias de vida e observaram que, na presença de lesão pulmonar, ocorria disfunção endotelial com redução da vasodilatação pulmonar dependente do endotélio, perda da vasodilatação mediada pelos receptores ETB e aumento da vasoconstrição pulmonar mediada pelos receptores ETA. Durante a HPP sem lesão pulmonar, os vasodilatadores dependentes do endotélio (acetilcolina e ATP) e os independentes (isoproterenol e nitroprussiato) reduziram PAP e a RVP. Já durante a HPP com lesão endotelial, os vasodilatadores dependentes do endotélio não alteraram a PAP, nem a RVP, enquanto os independentes do endotélio continuaram promovendo a redução da PAP e da RVP. Na presença de lesão endotelial, o agonista do receptor ETB não promoveu vasodilatação, evidenciando-se apenas a vasoconstrição do estímulo dos receptores ETA pela ET-1. A lesão nas células endoteliais pode reduzir densidade ou número de certos receptores de superfície celular, como acetilcolina, ATP e receptor ETB, alterar a função destes receptores, ou inibir a atividade da enzima óxido nítrico sintetase no endotélio. Estas ações têm como resultado final uma redução na produção do NO que é contrabalanceado por um aumento na vasoconstrição pulmonar mediada pelo receptor ETA (FINEMAN et al., 1999).

Endo et al., 2001, estudaram 5 recém-nascidos com HPP e 25 recém-nascidos a termo saudáveis, e obtiveram concentração plasmática da ET-1 por RIE maior nos pacientes com HPP nas primeiras 12 horas de vida, e semelhante entre os grupos nas dosagens com 24 horas e 5 dias de vida. Já as dosagens do NOx aumentaram com o tempo no grupo controle (ENDO, 2001).

Truog et al., 2002, dosaram a ET-1 em 21 recém-nascidos a termo com HPP, no

período antes e durante o tratamento com NO, e encontraram uma correlação inversa entre as mudanças plasmáticas da ET-1 e na PaO₂ entre as dosagens de base e durante 24 horas de tratamento com NO (TRUOG et al., 2002).

2.3.5.13 – Endotelina-1 na Doença da Membrana Hialina

O envolvimento da endotelina-1 na fisiopatologia da doença da membrana hialina não está definido. O potencial papel da ET-1 na DMH foi sugerido a partir da observação de níveis plasmáticos elevados desta proteína em RNPT doentes quando comparados com os RNPT saudáveis e com os recém-nascidos a termo (KÄÄPÄ et al., 1994; KUO et al., 2001).

No nosso meio não há estudos dosando a ET-1 nos RNPT com DMH; na literatura internacional há poucos estudos e com um número reduzido de pacientes, além de dados controversos.

Foi demonstrada a associação de níveis elevados da ET-1 no AT de recém-nascidos com DMH na fase inicial da doença com menor gravidade (ANDERSSON et al., 1997), já outro estudo não encontrou diferença nos níveis da ET-1 no AT em pacientes com e sem DMH (OLSEN et al., 2003).

Em modelos experimentais de DMH, foi encontrado uma correlação entre os níveis da ET-1 e a PAP (VROOMEN et al., 2001), além de um aumento da ET-1 na DMH grave e, com o uso de bloqueadores dos receptores ETA, houve uma melhora na PaO₂, no índice de oxigenação e redução na RVP (IVY et al., 1998).

Quanto às dosagens séricas da ET-1 em humanos, Kääpä et al., 1994, em estudo sem grupo controle, demonstraram níveis altos no início do quadro de DMH, e estes declinam durante as primeiras 48 horas de vida, sugerindo que estes níveis elevados da ET-1 na fase aguda da DMH refletiriam severidade da doença pulmonar (KÄÄPÄ et al., 1994). Parece que

a concentração plasmática da ET-1 no primeiro dia de vida é maior nos recém-nascidos com DMH do que nos com taquipnéia transitória do recém-nascido (TTRN), sugerindo que o nível plasmático da ET-1 pode ser útil no diagnóstico diferencial, conforme Kuo et al., 2001 (KUO et al., 2001). Kojima et al., 1992, obtiveram valores da ET-1 nos pacientes com DMH significativamente mais altos do que nos recém-nascidos a termo saudáveis na primeira semana de vida, e estes não diferiram dos níveis em RNPT saudáveis (KOJIMA et al., 1992). Encontrou-se apenas um estudo na literatura que compara as dosagens da ET-1 por RIE de RNPT com DMH e de RNPT saudáveis ou com doença leve. Nesse estudo, os níveis da ET-1 no 1º dia não diferiram entre os grupos, mas os valores no 4º dia foram significativamente menores no grupo sem a doença, e, em ambos os grupos, notou-se uma redução nos valores da ET-1 do 1º para o 4º dia de vida (MALAMITSI-PUCHNER et al., 1995).

Kojima et al., 1992, iniciando as investigações sobre a ET-1 nos recém-nascidos, fizeram dosagens por radioimunoensaio em um grupo heterogêneo de pacientes (5 com DMH, 3 com TTRN, 4 com asfixia perinatal e 5 com DBP, além de 7 RNPT saudáveis e 5 recém-nascidos a termo saudáveis). Com relação aos pacientes com DMH, observaram que os níveis da ET-1 neste grupo foram significativamente mais elevados do que nos recém-nascidos a termo saudáveis na primeira semana de vida (KOJIMA et al., 1992).

Kääpä et al., 1994, estudaram apenas 7 RNPT com DMH, sem grupo controle. Dosaram a ET-1 por RIE com 2, 24 e 48 horas de vida e encontraram valores da ET-1 inicialmente elevados e com declínio no decorrer das primeiras 48 horas de vida ($31,5 \pm 4,5$ pg/mL, $31,3 \pm 5,3$ pg/mL e $23,3 \pm 3,6$ pg/mL, respectivamente). A partir destes níveis elevados da ET-1 na fase aguda da DMH, foi sugerido que a ET-1 possa refletir a gravidade da doença pulmonar (KÄÄPÄ et al., 1994).

Malamitsi-Puchner et al., 1995, mediram a ET-1 por radioimunoensaio, comparando RNPT com DMH e RNPT saudáveis ou com doença leve. O problema deste estudo foi o

número reduzido de RNPT com DMH (8 recém-nascidos), onde 6 necessitaram de suporte ventilatório e 2 apenas CPAPn por mais de quatro dias. Os níveis da ET-1 no 1º dia não diferiram entre os grupos, mas no 4º dia foram significativamente menores no grupo controle em comparação com os casos ($12,9 \pm 4,6 \text{ pmol/L}$ e $16,2 \pm 5,4 \text{ pmol/L}$, respectivamente; $p=0,05$). Em ambos os grupos houve uma redução nos valores da ET-1 do 1º para o 4º dia de vida (casos: $21,8 \pm 5,9 \text{ pmol/L}$ para $16,1 \pm 5,4 \text{ pmol/L}$; $p=0,02$; e controles: $16,3 \pm 8,1 \text{ pmol/L}$ para $12,9 \pm 4,6 \text{ pmol/L}$; $p<0,01$) (MALAMITSI-PUCHNER et al., 1995).

Anderson et al., 1997, avaliaram a relação entre os níveis da ET-1 nas vias respiratórias e a presença de DMH em RNPT. Foram avaliados 11 RNPT com IG média de 28 semanas, acompanhados nos primeiros 7 dias de vida. Destes, 9 tiveram DMH, sendo 3 com quadro grave. Foram obtidos neste estudo, 60 AT, com uma média de 3 a 7 aspirados para cada paciente. A concentração da ET-1 nos AT variou de 6 a 2760 pg/mL com uma mediana de 293 pg/mL . A razão oxigenação arteriolar/alveolar nas primeiras três horas do nascimento, antes do uso de surfactante exógeno, apresentou correlação positiva com a média do logaritmo (log) da ET-1 nos AT no 1º dia de vida ($r=0,5$; $p=0,03$). Também foi observada correlação negativa entre a pressão média das vias aéreas e as médias do log da ET-1 no AT desses RNPT ($r=0,8$; $p<0,001$) e entre a média do log da ET-1 nos AT e a média da fração inspirada de oxigênio (FiO_2) neste período ($r=0,6$; $p<0,01$). Acredita-se que a ET-1 nas vias respiratórias dos RNPT possa ter origem do epitélio brônquico. As concentrações da ET-1 nos AT de RNPT são 1000 vezes mais altas do que aquelas descritas em lavados broncoalveolares de adultos com asma. Os possíveis mecanismos envolvidos podem ser modulados durante o desenvolvimento pulmonar do prematuro ou, como sugerido na asma, pode ser um processo inflamatório envolvendo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, que aumentam a síntese da ET-1 e estão presentes nas vias aéreas de RNPT que utilizaram ventilação mecânica durante o 1º dia de vida. Nos RNPT com DMH os níveis elevados da ET-1 nas vias aéreas

sugerem um indicativo de melhora no status pulmonar durante a fase inicial da doença, entretanto devido às propriedades pró-inflamatórias e pró-fibróticas, os efeitos a longo prazo da ET-1 nas vias aéreas dos RNPT devem ser melhor explicados (ANDERSON et al., 1997).

Ivy et al., 1998, desenvolveram um modelo experimental de DMH induzida em ovelhas pré-termo a fim de demonstrar os efeitos do bloqueador de receptores ETA, BQ123, na RVP. Observaram níveis mais elevados da ET-1 nos animais com DMH grave, e o uso do bloqueador dos receptores ETA provocou uma elevação da PaO₂ com 8 horas (174±71mmHg e 53 ±14mmHg), um menor índice de oxigenação com 3, 6 e 7 horas após início da ventilação mecânica e uma redução na RVP. Os níveis circulantes da ET-1 aumentaram no grupo controle durante as 8 horas de experimento (p<0,05), enquanto no grupo tratado com BQ123 não houve nenhum aumento nos níveis da ET-1 durante as primeiras 1 a 4 horas do estudo (inicial: 0,7±0,1pg/mL; 1h: 0,7±0,1pg/mL; 4h: 1,2±0,5pg/mL) (IVY et al., 1998).

Vroomen et al., 2001, em modelos de DMH em ovelhas, demonstraram aumento precoce na PAP durante o curso da DMH e observaram uma correlação positiva entre os valores da ET-1 com a medida da PAP (r=0,48, p=0,01) (VROOMEN et al., 2001).

Kuo et al., 2001, encontraram níveis plasmáticos da ET-1 no 1º dia de vida superiores nos recém-nascidos com DMH (n=22) quando comparados com aqueles com TTRN (n=13) (6,5±0,6pg/mL e 3,8±1,3pg/mL; p<0,001), sugerindo que a ET-1 pode ser útil no diagnóstico diferencial (KUO et al., 2001).

2.3.5.14 – Endotelina-1 na Displasia Brocopulmonar

A endotelina-1 é um agente pró-inflamatório, com ação na proliferação celular e edema durante a injúria aguda pulmonar como ocorre na DMH, além de ser um potente vasoconstritor. Essas ações contribuem significativamente para o mecanismo da doença

pulmonar crônica (JEFFERIES et al., 1984; GRONECK et al., 1996). Ainda não há consenso sobre a da ET-1 na DBP.

Kojima et al., 1992, estudaram um grupo heterogêneo de pacientes e, durante os primeiros dois meses de vida, os níveis plasmáticos da ET-1 nos bebês com DBP (n=5) foram mais elevados do que nos RNPT saudáveis (KOJIMA et al., 1992).

Niu et al., 1998, dosaram os níveis da ET-1 no AT de 34 RNPT com menos de 29 semanas de IG com DMH que necessitaram de suporte ventilatório, evidenciando uma concentração maior da ET-1 e da IL-8 no AT do 1º dia e durante a 1ª semana de vida nos pacientes que desenvolveram DBP, se comparados com aqueles que não apresentaram DBP. É possível que a ET-1 possa agravar a resposta inflamatória aguda durante os estágios precoces da injúria pulmonar, utilizando um mecanismo que envolve a cascata do ácido aracdônico. Esses autores não encontraram correlação entre os níveis da ET-1 no AT e a gravidade da doença, definida pelo índice de oxigenação (NIU et al., 1998).

Kuo et al., 2001, estudaram as concentrações da ET-1 em 22 recém-nascidos com DMH. Não encontraram diferenças nos níveis da ET-1 no 1º dia de vida com o desenvolvimento de DBP ($7,8 \pm 1,8$ pg/mL nos com DBP e $5,8 \pm 2,8$ pg/mL nos sem DBP; $p=0,2$), porém apenas 4 recém-nascidos desenvolveram DBP, o que compromete a conclusão de que a concentração plasmática da ET-1 não é um preditor de DBP (KUO et al., 2001).

Truog et al., 2002, estudaram RNPT com idade média de 3 semanas de vida que desenvolveram DBP. Neste grupo, o tratamento com NO inalado não modificou os valores da irET-1 nos AT destes pacientes enquanto comparados os valores antes, durante e após 48 horas da suspensão do tratamento com NO inalado (TRUOG et al., 2002).

Ambalavanan e Novak, 2003, não obtiveram correlação entre níveis da ET-1 no AT de RNPT no 1º dia de vida com o desenvolvimento de DBP, ou com a mortalidade (AMBALAVANAN e NOVAK, 2003).

3 - OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar as concentrações plasmáticas da endotelina-1 em recém-nascidos pré-termo com e sem doença da membrana hialina.

3.2 - Objetivos específicos

- Verificar a associação entre os níveis da endotelina-1 no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo com o desenvolvimento da DMH.
- Verificar a associação entre os níveis da endotelina-1 no sangue de recém-nascidos pré-termo com 12 a 48 horas de vida com o desenvolvimento da DMH.
- Avaliar a associação entre o nível da endotelina-1 no sangue de cordão umbilical e no sangue de recém-nascidos pré-termo com 12 a 48 horas de vida com o escore de gravidade neonatal – SNAPPE II.

- Avaliar a associação entre nível da endotelina-1 no sangue de cordão umbilical e no sangue de recém-nascidos pré-termo com 12 a 48 horas de vida com o tempo de ventilação mecânica.

4 - METODOLOGIA

4 - METODOLOGIA

4.1 - Delineamento do Estudo

Constitui em estudo de coorte, de caráter observacional, individual e contemporâneo. Os fatores em estudo foram os níveis da endotelina-1 no sangue de cordão umbilical e com 12 a 48 horas de vida, e o desfecho clínico, a presença de doença da membrana hialina.

4.2 - População

4.2.1 - População em Estudo

Foi constituída de recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas e peso de nascimento inferior a 2.000 g.

4.2.2 - População da Pesquisa

Os pacientes efetivamente estudados foram os recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas e peso de nascimento inferior a 2.000 g, nascidos

no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) nos períodos de 1º de janeiro de 2001 a 15 de janeiro de 2002 e 1º de fevereiro de 2003 a 15 de novembro de 2003.

4.3 - Amostra e Amostragem

4.3.1 - Critérios de Inclusão

Foram considerados elegíveis para pesquisa todos os recém-nascidos com IG menor ou igual a 34 semanas e peso de nascimento (PN) menor que 2.000g, nascidos no Centro Obstétrico do HCPA durante os períodos do estudo.

4.3.2 - Critérios de Exclusão

Foram excluídos os recém-nascidos com:

- Algum tipo de malformação congênita.
- Doenças genéticas.
- Infecções congênitas como: sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírose, herpes.
- Mãe soropositiva para o vírus da imunodeficiência adquirida.
- Mãe usuária de drogas de qualquer espécie (inalatória ou endovenosa).
- Uso materno de opiáceos ou outros fármacos capazes de causar depressão respiratória no recém-nascido.

- Quadro de disfunção respiratória caracterizada por pneumonia congênita e/ou como parte de quadro clínico de sepse neonatal precoce.
- Hemólise no sangue do cordão umbilical.
- Ausência de indicação, pelo médico assistente, de exames no período de 12 a 48 horas de vida, ou quando o material coletado tenha hemolisado.
- Ausência de consentimento dos pais.

4.4 - Variáveis em Estudo

As variáveis em estudo foram obtidas dos dados dos prontuários dos recém-nascidos, exame físico do prematuro e análise laboratorial. Nos prontuários dos recém-nascidos foi revisada a ficha de nascimento preenchida rotineiramente no momento do parto, a nota de internação na Unidade Neonatal e as evoluções diárias do recém-nascido preenchidas pela equipe médica, além do fluxo de sinais vitais e balanço hídrico preenchidos pela equipe de enfermagem. Os dados da mãe foram obtidos da carteira de pré-natal, ficha obstétrica e lista de problemas preenchidas pela equipe médica da obstetrícia.

Foram estudadas as seguintes variáveis:

- **Doença da membrana hialina (DMH):** definida como a presença de disfunção respiratória com início nas primeiras 24 horas de vida, caracterizada por taquipnéia, retrações intercostais, subcostais e supraesternais, gemido expiratório e/ou cianose, com necessidade de oxigênio superior a 50% para manter saturação de oxigênio acima de 92%, com raios-X de tórax compatível com o diagnóstico de doença da membrana hialina (microgranulações disseminadas em ambos pulmões e broncograma aéreo) e necessidade de surfactante exógeno. Os raios-X foram avaliados pelo médico da equipe assistencial e revisados pelo pesquisador.

O surfactante exógeno utilizado de rotina pelo Serviço de Neonatologia do HCPA é o Survanta®- Abbott Laboratórios. Este surfactante é extraído de macerado de pulmão bovino e utilizado na dose de 100mg/kg por aplicação, com um total de 4ml/kg/dose.

- **Nível plasmático da endotelina-1 (ET-1):** foram obtidos os níveis da ET-1 no sangue do cordão umbilical e no sangue do recém-nascido em uma segunda coleta realizada no período entre 12 e 48 horas de vida. Endotelina-1 humana foi dosada pelo método de *quantitative luminescent sandwich ELISA* da *R&D Systems* conforme instruções do fabricante. O kit é comercialmente disponível e apresenta uma margem de análise de 0,32 a 1000 pg/ml com sensibilidade de <0,16 pg/mL e um coeficiente de variação intraensaio e interensaio de 2,5% e 5%, respectivamente. As leituras foram realizadas num luminômetro para placas de ELISA, Lumicount, automático.

- **Displasia broncopulmonar (DBP):** o diagnóstico foi estabelecido a partir dos critérios do NICHD/NHLBI/ORD Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia. Definindo-se DBP como a necessidade de oxigênio suplementar FiO_2 maior que 21% por no mínimo 28 dias, e nos RNPT com IG inferior a 32 semanas, é necessário, também, ter completado 36 semanas de IG corrigida e ainda persistir a necessidade de oxigênio suplementar (JOBÉ e BANCALARI, 2001).

- **SNAPPE II:** é um escore utilizado para medir a gravidade de doença e o risco de mortalidade em recém-nascidos com qualquer peso de nascimento, internados em Unidades Intensivas Neonatais. É composto por 9 itens, pontuando-se os piores resultados encontrados para os sinais vitais (pressão arterial média e temperatura axilar), diurese e análises laboratoriais (pH do sangue, razão PaO_2/FiO_2) durante as primeiras 12 horas da internação, além de presença ou não de convulsões múltiplas, baixo peso de nascimento, escore de apgar no 5º minuto, classificação do recém-nascido em pequeno para idade gestacional, ficando abaixo do percentil 3. Como utiliza os critérios de gravidade de doença e os fatores de risco

para morte neonatal, pode ser utilizado como preditor de mortalidade (RICHARDSON et al., 2001).

- **Tempo de ventilação mecânica:** foi registrado na ficha protocolo de cada paciente o tempo em que o recém-nascido pré-termo permaneceu em ventilação mecânica. Nas situações em que foi necessário reintrodução de suporte ventilatório, foram desconsiderados os períodos em que este reinício ocorreu após o RNPT ter ficado 48 horas em ar ambiente.

4.5 - Variáveis controladas

Foram controladas as seguintes variáveis:

- **Sexo:** caracterizado como masculino ou feminino.
- **Peso de nascimento (PN):** considerada a aferição na sala de parto em balança digital.
- **Idade gestacional (IG):** foi calculada a IG obstétrica pela data da última menstruação, empregando-se o método de NAEGLÉ e ecografia obstétrica de primeiro trimestre, quando existente. A IG pediátrica foi obtida pelo método de New Ballard (BALLARD et al., 1991). Foi considerada a IG obstétrica, exceto nos casos em que esta se diferenciou da pediátrica em mais de duas semanas.
 - **Apgar no 5^o minuto:** calculado pelo médico pediatra que atendeu o RNPT na sala de parto e registrado na folha de nascimento.
 - **Hipertensão pulmonar persistente (HPP):** definida pela presença de *shunt* direita esquerda pelo canal arterial estabelecido pela diferença de saturação pré e pós-ductal, confirmada por ecocardiografia a cores com doppler nos casos sugestivos clinicamente de HPP.

- **Suporte ventilatório utilizado pelo recém-nascido pré-termo durante a internação:** foram registrados o tempo de utilização e o tipo de suporte (ventilação mecânica, CPAPn, campânula de oxigênio).
- **Momento da coleta da segunda amostra para dosagem de ET-1:** foram registrados nas fichas protocolo o dia e horário das coletas; desta forma, a partir das datas de nascimento, foram estabelecidos os momentos da coleta em horas de vida do recém-nascido.

4.6 - Logística

Inicialmente foi obtido, no momento do nascimento, sangue da veia do cordão umbilical (1mL) para dosagem da endotelina-1 dos recém-nascidos com IG menor ou igual a 34 semanas e peso de nascimento inferior a 2.000g, nascidos no Centro Obstétrico do HCPA. O sangue foi coletado diretamente do cordão umbilical, logo após o clampeamento deste, e armazenado em frasco com EDTA conforme recomendações do fabricante do kit de dosagem da ET-1. Imediatamente o sangue foi centrifugado a 2500 rotações por minuto, na temperatura de 20°C, pela pesquisadora e sua equipe. O plasma foi armazenado em tubo *Eppendorf*, identificado com o número do paciente e guardado em freezer a <80°C logo após, para posterior análise da ET-1. O material foi armazenado no freezer do Laboratório de pesquisa do Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado no HCPA.

Os recém-nascidos foram acompanhados durante toda a internação e, de acordo com sua evolução clínica e radiológica nas primeiras 24 horas de vida, foram classificados em dois grupos: com DMH (casos), e sem DMH (controles).

Grupo I – recém-nascidos pré-termo com doença da membrana hialina: são aqueles RNPT com disfunção respiratória iniciada nas primeiras 24 horas de vida, caracterizada por taquipnéia, retrações intercostais, subcostais e supraesternais, gemido expiratório e/ou cianose, com necessidade de oxigênio superior a 50% para manter saturação de oxigênio acima de 92%, com raios-X de tórax compatível com o diagnóstico de doença da membrana hialina (microgranulações disseminadas em ambos pulmões e broncograma aéreo) e necessidade de surfactante exógeno, além de não ter diagnóstico clínico ou ecocardiográfico de HPP.

Grupo II - recém-nascidos pré-termo sem DMH (controles): são aqueles RNPT que não apresentaram sintomas respiratórios ou, se presentes, ocorreu disfunção respiratória leve, com necessidade de no máximo 40% de oxigênio e apenas transitoriamente (duração máxima de 72 horas). Além disso, não receberam surfactante exógeno.

Dentro das primeiras 12 a 48 horas de vida foram obtidas coletas de sangue dos recém-nascidos (1ml) para a segunda dosagem da ET-1. A amostra de 1mL foi obtida junto com os exames solicitados pelo médico assistente na sua rotina de atendimento, não implicando coleta de sangue exclusivamente para a pesquisa. O sangue foi acondicionado em frasco contendo EDTA e centrifugado a 2500 rotações por minuto, na temperatura de 20°C, pela equipe da pesquisa. O plasma foi armazenado em tubo de *Eppendorf*, identificado com o número do paciente e guardado em freezer a <80°C logo após, para posterior análise.

As dosagens séricas da ET-1 foram realizadas pela pesquisadora no final do período de acompanhamento dos recém-nascidos, com os grupos já pré-definidos. Todos os testes foram realizados em duplicata. Todos os pacientes tiveram uma ficha protocolo preenchida pela pesquisadora com os dados de sua evolução durante a internação hospitalar (Anexo I).

4.7 - Método bioquímico empregado para determinação da endotelina-1

A endotelina-1 foi determinada pelo método de enzimoimunoensaio com kit comercialmente disponível pela *R&D Systems (QuantiGlo® Human Endothelin-1 Immunoassay for the quantitative determination of human endothelin-1 (ET-1) concentrations in cell culture supernates, urine, serum, and EDTA plasma, R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA)*. Este kit é disponível apenas para pesquisa e emprega a técnica de ELISA tipo sanduíche. Cada kit é composto por uma placa com capacidade para 96 testes, com sensibilidade de $< 0,16\text{pg/mL}$ e margem de $0,32$ a 1000pg/mL e um coeficiente de variação intraensaio e interensaio de $2,5\%$ e 5% , respectivamente.

O tempo necessário para realização do teste é cinco horas, e o volume de plasma da amostra é $100\mu\text{l}$ para cada teste. O princípio da técnica é de uma reação do tipo antígeno-anticorpo, onde o anticorpo monoclonal específico para ET-1 encontra-se pré-colocado na placa de ELISA. Cada kit contém uma placa com 96 “espacinhos” (*wells*). Foram utilizados dois kits, cada um possibilitando a realização de 40 testes em duplicata, pois 16 espaços foram utilizados para a curva-padrão, também em duplicata.

Inicialmente são preparados todos os reagentes e realizada a reconstituição do *standard* com água destilada formando uma solução de 5000pg/mL . A curva-padrão é obtida a partir de rediluições progressivamente maiores da solução de 5000pg/mL , com a produção de sete pontos. O ponto máximo da curva é de 1000pg/mL e o mínimo de 0pg/mL .

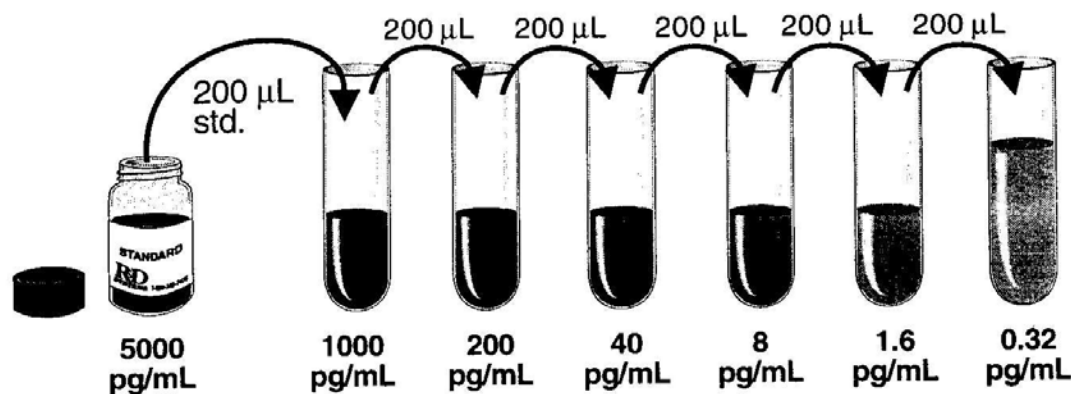


Fig. 1 – Diluições da endotelina-1 para formar a curva-padrão.

Reagentes, amostras e padrão foram pipetados nos espaços da placa de ELISA e, após um período de incubação de 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente em misturador de microplaca orbital horizontal, cada “espacinho” foi lavado 4 vezes com *Wash Buffer*, utilizando-se pipeta de multicanais. Assim, foi possível eliminar qualquer substância não ligada ao anticorpo da placa. Seguiu-se a adição de 200µl de *ET-1 Conjugate* em cada “espacinho” e nova incubação durante 3h à temperatura ambiente, em misturador de microplaca orbital horizontal. Nova lavagem, e após, adicionado 200µl do substrato de luminol/peroxidase em cada “espacinho” e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente, sem movimentação, e em no máximo 30 minutos realizada a leitura da luz emitida. Para a leitura das placas foi utilizado um luminômetro Lumicount™ (comprimento de onda para leitura: 1 segundo) que faz leitura automática de microplacas. O aparelho fornece os valores em unidades relativas de luz (URL). A luz é lida no luminômetro na proporção da quantidade de ET-1 ligada na etapa inicial do teste.

Com estes dados, foi montada uma curva-padrão, convertendo as URL em pg/mL, utilizando as medidas de luz da curva-padrão como referência dos valores da endotelina-1, em cada placa, corrigindo-se pelo ponto zero.

A dosagem de endotelina foi feita pela pesquisadora no Laboratório de Comunicação Celular do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Histologia e Embriologia sob a chefia do Dr. Emer Suavinho Ferro, na Universidade de São Paulo.

4.8 - Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra resultou em 17 recém-nascidos em cada grupo, para obter um nível de significância de 5%, um poder estatístico de 80% e uma estimativa de diferença nos níveis de ET-1 entre os grupos de 40%. O nível de significância utilizado no procedimento foi $\alpha=5\%$ (COHEN, 1988).

4.9 – Análise Estatística

Foi realizado o cálculo de percentagem para as variáveis categóricas e médias e desvios padrões das variáveis quantitativas (média \pm DP). Na presença de assimetrias, foi realizado cálculo da mediana e percentil interquartil (mediana, p25 - p75).

Inicialmente, para comparação de variáveis quantitativas paramétricas, foi realizado o Teste t de Student e, para as não-paramétricas, o Teste de Mann-Whitney. Para as variáveis qualitativas foram utilizados os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, quando necessário. Para estabelecer correlação entre variáveis, foi empregado o Coeficiente de Correlação de Spearman.

Para comparação da ET-1 entre os grupos com DMH e sem DMH no sangue de cordão e, após, com 12 a 48 horas de vida, foi utilizada transformação logarítmica em um

modelo de Análise de Variâncias (ANOVA) para medidas repetidas, controlando para peso de nascimento, idade gestacional e escore de apgar no 5º minuto. Na comparação entre os grupos: sem DMH, DMH com DBP e DMH sem DBP, foi utilizado ANOVA de uma via, também com transformação logarítmica da variável ET-1.

A função logarítmica conhecida como *Lognormal Distribution*, foi empregada na variável quantitativa, endotelina-1, possibilitando a escolha de testes paramétricos na comparação entre três grupos, devido ao comportamento não paramétrico (assimétrico) da variável (ALTMAN, 1994).

A endotelina é uma variável quantitativa que apresenta comportamento assimétrico, com desvio padrão elevado, e em algumas circunstâncias é possível corrigir a assimetria da variável com *Lognormal Distribution*. A vantagem principal é a localização de uma diferença entre três grupos, que um teste paramétrico permite em relação aos testes não paramétricos, os quais apenas evidenciam a existência da diferença sem, no entanto, localizá-la (ALTMAN, 1994).

O nível de significância mínima aceito foi $p < 0,05$.

O programa estatístico empregado foi o *Statistical Package for Social Science* (SPSS).

4.10 – Considerações Éticas

Os pais autorizaram a participação do filho na pesquisa mediante a assinatura de termo de consentimento informado (Anexo 2). Os RNPT não foram admitidos no estudo sem o consentimento de seus pais ou responsáveis legais.

Como se trata de um estudo observacional, não houve riscos para os pacientes nem alteração na rotina de atendimento assistencial. O sangue do cordão costuma ser desprezado,

exceto quando é necessário realizar tipagem sanguínea do bebê, portanto a retirada de 1 ml para a dosagem de endotelina-1 não interferiu na assistência. A segunda amostra de sangue foi coletada por punção periférica do recém-nascido pré-termo ou por cateter umbilical arterial, quando presente, junto com outros exames solicitados pelo médico assistente do paciente na rotina do atendimento. Os recém-nascidos não foram puncionados exclusivamente para a pesquisa. O volume de 1ml de sangue adicional coletado para dosagem de endotelina-1 não implicou riscos para o paciente. O resultado do exame não alterou a conduta terapêutica. A privacidade e a autonomia dos pacientes foi respeitada, uma vez que não foram identificados.

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, através da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, tendo sido protocolado sob o número 00319.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. London:Chapman & Hall; 1994.

Ambalavanan N, Novak ZE. Peptide growth factors in tracheal aspirates of mechanically ventilated preterm neonates. *Pediatr Res* 2003;53(2):240-4.

Andersson S, Merritt A, Orpana A, Viinikka L, Ylikorkala O. High endothelin-1 in the airways of preterm infants is associated with less severe respiratory distress during the early postnatal period. *Pediatrics* 1997;99:545-7.

Bagchi A, Viscardi RM, Taciak V, Ensor JE, McCrea KA, Hasday JD. Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor- α in lung lavage of premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1994;36:244-52.

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.

Berbinschi A, Ketelslegers JM. Endothelin in urine. *Lancet* 1989;2:46.

Blouquit S, Sari S, Lombet A, D'herbomez M, Naline E, Matran R, Chinet T. Effects of endothelin-1 on epithelial ion transport in human airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Aug;29(2):245-51. Epub 2003 mar 06.

Bussen S, Sutterlin, Steck T. Plasma endothelin and big endothelin levels in women with severe preeclampsia or HELLP-syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 1999;262(3-4):113-9.

Cohen J. *Statistical Power Analysis of the Behavioral Sciences*. New Jersey: Erlbaum Associates, publishers; 1988.

Dobyns EL, Eells PL, Griebel JL, Abman SH. Elevated plasma endothelin-1 and cytokine levels in children with severe acute respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1999;135:246-9.

Druml W, Steltzer H, Waldhäusl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, et al. Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1169-73.

Dschietzig T, Alexiou K, Laule ML, Becker R, Schror K, Baumann G, et al. Stimulation of pulmonary big endothelin-1 and endothelin-1 by antothrombin III: A rationale for combined application of antothrombin III and endothelin antagonists in sepsis-related acute respiratory distress syndrome? *Crit Care Med* 2000;28(7):2445-9.

Ekblad H, Arjamaa O, Vuolteenaho O, Kääpä P, Kero P. Plasma endothelin-1 concentrations at different ages during infancy and childhood. *Acta Paediatr* 1993;82:302-3.

Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Physiologic significance of nitric oxide and endothelin-1 in circulatory adaptation. *Pediatr Int* 2000;42(1):26-30.

Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Endogenous nitric oxide and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Eur J Pediatr* 2001;160:217-22.

Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2001;2(2):90-101. Disponível em: URL: <http://www.respiratory-research.com/content/2/2/090> acessado em 9/2/2002.

Figueras-Aloy J, Gómez L, Rodríguez-Miguélez JM, Jordán Y, Salvia MD, Jiménez W, Carbonell-Estrany X. Plasma nitrite/nitrate and endothelin-1 concentrations in neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003;92:582-7.

Fineman JR, Wong J, Mikhailov T, Vanderford PA, Jerome HE, Soifer SJ. Altered endothelial function in lambs with pulmonary hypertension and acute lung injury. *Pediatric Pulmonology* 1999;27:147-56.

Furghgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-6.

Gao S, Chen Z, Xu Y. Plasma endothelin and atrial natriuretic peptide in normal and hypertensive pregnancy. *Chin Med J (Eng)* 1996;109(11):823-6.

Goraca A. New views on the role of endothelins. *Endocr Regul* 2002;36:161-7.

Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann miglitol, 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.

Groneck P, Goetze-Speer B, Speer CP. Inflammatory bronchopulmonary response of preterm infants with microbial colonisation of the airways at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1996;74:F51-5.

Hakkinen LM, Vuolteenaho OJ, Leppaluoto JP, Laatikainen TJ. Endothelin in maternal and umbilical cord blood in spontaneous labour and at elective cesarean delivery. *Obstet Gynecol.* 1992;80(1):72-5.

Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultures endothelial cells. *Am J Physiol* 1985;248(5Pt 1):C550-6.

Ivy DD, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. Endothelin A receptor blockade decreases pulmonary vascular resistance in premature lambs with hyaline membrane disease. *Pediatr Res* 1998;44:175-80.

Jefferies AL, Coates G, O'Brodovich H. Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease. *NEJM* 1984;311(17):1075-80.

Jobe, AH, Bancalari E. NICHD/NHLBI/ORD Workshop Summary on Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1723-1729.

Kääpä P, Seppänen M, Kero P, Saraste M. Pulmonary hemodynamics after synthetic surfactant replacement in neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1993;123:115-9.

Kääpä P, Kero P, Ekblad H, Erkkola R, Arjamaa O. Plasma endothelin-1 in the neonatal respiratory distress syndrome. *Ann Chir Gynaecol* 1994;83:110-2.

Kanai H, Hirakata H, Nakayama M, Nagashima A, Fujishima M. Minimal daily variations of plasma and urinary endothelin-1 in healthy subjects. *Clinical Nephrology* 1996;46(5):353-4.

Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:765-88.

Khedun SM, Naicker T, Moodley J. Endothelin-1 activity in pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 2002;22(6):590-3.

Kirkpatrick BV, Mueller DG. Respiratory Disorders in the Newborn. In: Chernick V, Boat TF, Kending Jr EL, editors. *Kending's Disorders of the Respiratory Tract in Children*. 6th ed. Canada: W.B. Saunders Company; 1997. p.328-45.

Kobayashi H, Puri P. Plasma endothelin levels in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994;29(9):1258-61.

Kojima T, Isozaki-Fukuda Y, Takedatsu miglitol, Ono A, Hitata Y, Kobayashi Y. Plasma endothelin-1 like immunoreactivity levels in neonates. *Eur J Pediatr* 1992;151:913-5.

Kumar P, Kazzi NJ, Shankaran S. Plasma immunoreactive endothelin-1 concentrations in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Perinatol* 1996;13(6):335-41.

Kuo CY, Chou YH, Lien R, Yang PH. Study of plasma endothelin-1 concentrations in Taiwanese neonates with respiratory distress. *Chang Gung Med J.* 2001;24(4):239-44.

Laforgia N, Difonzo I, Altomare M, Mautone A. Cord blood endothelin-1 and perinatal asphyxia. *Acta Pædiatr* 2001;90:351-2.

Lakshminrusimha S, Steinhorn RH. Pulmonary vascular biology during neonatal transition. *Clin Perinatol* 1999;26(3):601-19.

Langleben D, Demarchie M, Laporta D, Spanier AH, Schlesinger RD, Stewart DJ. Endothelin-1 in acute injury and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1646-50.

Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB, O'Murchu B, Perrella MA, Heublein DM, et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc* 1990;65:1441-55.

Levin ER. Endothelins. *NEJM* 1995;333(6):356-63.

Lyrene RK, Philips JB. Control of pulmonary vascular resistance in the fetus and newborn. *Clin Perinatol* 1984;11(3):551-64.

Malamitsi-Puchner A, Economou E, Efstathopoulos T, Sevastiadou S, Hadzistamatiou Z, Nicolopoulos D. Endothelin1-21 plasma concentrations on days 1 and 4 of life in healthy and ill preterm neonates. *Biol Neonate* 1995;67:317-21.

Masaki T, Usuki S, Yanagisawa M, Suzuki N. Endothelin in perinatal pharmacology. *Seminars in Perinatology* 1991;15(1):27-9.

Mattyus I, Zimmerhackl LB, Schawarz A, Hentschel M, Brandis M, Miltenyi M, et al. Renal excretion of endothelin in children is influenced by age and diuresis. *Acta Pædiatr* 1994;83:468-72.

Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:555-81.

Mildenberger E, Biesel B, Siegel G, Versmold HT. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4):H1730-7.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263(5579):663-5.

Niu JO, Munshi UK, Siddiq MM, Parton LA. Early increase in endothelin-1 in tracheal aspirates of preterm infants: correlation with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1998;132:965-70.

Olsen SL, Clark PL, Thibeault DW, Norberg M, Truog WE. Exhaled nitric oxide and tracheal endothelin-1 in preterm infants with and without RDS. *Pediatr Pulmonol* 2003;36(5):421-6.

Orbak Z, Zor N, Energin VM, Selimoglu MA, Handan ALP, Akçay F. Endothelin-1 levels in mothers with eclampsia - pre-eclampsia and their newborns. *Journal of Tropical Pediatrics* 1998;44:47-9.

Perreault T, Coceani F. Endothelin in the perinatal circulation. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:644-53.

Procianoy RS. Doença da Membrana Hialina. *Problemas Respiratórios IN Miura E, Procianoy RS e colaboradores. Neonatologia. Princípios e Prática. Porto Alegre: Artes Médicas;1997.p.148-150.*

Radunovic N, Lockwood CJ, Alvarez M, Nastic D, Petkovic S, Berkowitz RL. Fetal and maternal plasma endothelin levels during the second half of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:28-32.

Rascher W, Gyódi G, Worgall S, Sulyok E. Effect of sodium chloride supplementation on urinary endothelin-1 excretion in premature infants. *J Pediatr* 1994;125:793-7.

Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK, The Canadian NICU Network, The Kaisers Permanente Neonatal Minimum Data Set Wide Area Network, and The SNAP-II Study Group. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr* 2001;138:92-100.

Ringer SA. Resuscitation in the delivery room. In: Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR, editors. *Manual of Neonatal Care*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2003.p.57-69.

Rosenberg AA, Kennaugh J, Koppenhafer SL, Loomis M, Chatfield BA, Abman SH. Elevates immunoreactive endothelin-1 levels in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1993;123:109-14.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985;364:45-56.

Sadler TW. Sistema Respiratório. In: Sadler TW. *Langman Embriologia Médica*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1997.p.147-52.

Sagsoz N, Kucukozkam T. The effect of treatment on endothelin-1 concentration and mean arterial pressure in preeclampsia and eclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):185-91.

Schears GJ, Costarino AT. Complexity of inflammatory mediators in acute respiratory distress syndrome (ARDS) [editorial]. *J Pediatr* 1999;135:144-6.

Skinner JR, Boys RJ, Hunter S, Hey EM. Pulmonary and systemic arterial pressure in hyaline membrane disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1992;67:355-73.

Slowinski T, Neumayer HH, Stolze T, Gossing G, Halle H, Hocher B. Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 48:446S-9S.

Smyth RL. Inhaled nitric oxide treatment for preterm infants with hypoxic respiratory failure. *Thorax* 2000;55(Suppl 1):S51-5.

Speer CP. Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease. *Eur J Pediatr* 1999;158 Suppl 1:S18-22.

Spiropoulos K, Trakada G, Nikolaou E, Prodromakis E, Efremidis G, Pouli A, Koniavitou A. Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respir Med* 2003;97:983-9.

Steinhorn RH, Millard SL, Morin III FC. Persistent pulmonary hypertension of the newborn Role of nitric oxide and endothelin in pathophysiology and treatment. *Clin Perinatol* 1995;22(2):405-28.

Stenmark KR, Eyzaguirre M, Westcott JY, Henson PM, Murphy RC. Potential role of eicosanoids and PAF in the pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:770-2.

Sulyok E, Ertl T, Adamovits K, Hovanyovszky S, Rascher W. Urinary endothelin excretion in the neonate: influence of maturity and perinatal pathology. *Pediatr Nephrol* 1993;7:881-5.

Truog WE, Pallotto E, Clark P, Kaftan HA, Ekekezie II, Norberg M, Ballard RA. Interaction of endogenous endothelin-1 and inhaled nitric oxide in term and preterm infants. *Clin Sci (Lond)* 2002;103 Suppl 48:294S-7S.

Tsukahara H, Sekine K, Miura M, Todoroki Y, Ohshima Y, Hiraoka M, Hosokawa K, Kotsuji F, Mayumi M. Vasoactive and natriuretic mediators in umbilical cord blood: a report of our observation and review of the literature. *Early Hum* 2002;69:57-64.

Vane JR, Botting RM. Endothelium-derived vasoactive factors and the control of the circulation. *Seminars in Perinatology* 1991;15(1):4-10.

Vroomen M, Cardozo RHL, Steendijk P, Frölich M, Baan J, Van Bel F. Endothelin-1 plasma concentration increases in the early phase of pulmonary hypertension development during respiratory distress syndrome: a study in newborn lambs. *Early Hum* 2001;63:9-21.

Walther FJ, Benders MJ, Leighton JO. Persistent pulmonary hypertension in premature neonates with severe respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1992;90:899-904.

Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Choriamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996;97:210-5.

Whitsett JA, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Acute respiratory disorders. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG ed. Neonatology Pathophysiology and management of the newborn. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.485-508.

Whol MEB. Developmental Physiology of the Respiratory System. In: Chernick V, Boat TF, Kending Jr EL, editors. Kending's Disorders of the Respiratory Tract in Children. 6th ed. Canada: W.B. Saunders Company; 1997. p.19-27.

Winters JW, Wong J, Van Dyke D, Johengen M, Heymann MA, Fineman JR. Endothelin receptor blockade does not alter the increase in pulmonary blood flow due to oxygen ventilation in fetal lambs. *Pediatr Res* 1996;40(1):152-7.

Wolff K, Nissel H, Carlstrom K, Kublickiene K, Hensen A, Lunell NO, Lindblom B. Endothelin-1 and big endothelin-1 levels in normal term pregnancy and in preeclampsia. *Regul Pept* 1996;67(3):211-6.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.

Ziegler JW, Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of the pulmonary circulation. *Clin Perinatol* 1995;22(2):387-403.

6 – ARTIGO

6 - ARTIGO

NÍVEIS DA ENDOTELINA-1 NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA EM RECÉM- NASCIDOS PRÉ-TERMO COM E SEM DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA

**(Umbilical cord and neonatal endothelin -1 levels in preterm newborns with and
without respiratory distress syndrome)**

Auxílio Financeiro: Auxílio parcial do FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

**NÍVEIS DA ENDOTELINA-1 NO SANGUE DO CORDÃO
UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA EM RECÉM-NASCIDOS
PRÉ-TERMO COM E SEM DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA**

RESUMO

Objetivo: Determinar os níveis da endotelina-1 (ET-1) no sangue de cordão umbilical e no plasma de recém-nascidos pré-termo com doença da membrana hialina (DMH) e comparar estes níveis com controles.

Metodologia: Nós determinamos os níveis da ET-1 em 18 pré-termos com DMH que não tiveram diagnóstico clínico ou ecocardiográfico de hipertensão pulmonar e em 22 pré-termos sem DMH (peso de nascimento < 2000g e idade gestacional \leq 34 semanas). Foram utilizados sangue do cordão umbilical e uma segunda amostra de sangue coletada durante as primeiras 12 a 48 horas de vida após o nascimento, para determinação da ET-1 por enzimoimunoensaio.

Resultados: As medianas dos valores da ET-1 do sangue de cordão umbilical foram similares nos dois grupos (controles: 10,9pg/mL e DMH: 11,4pg/mL) e foram significativamente maiores do que as da segunda amostra (controles: 1,7pg/mL, DMH: 3,5pg/mL; $p < 0,001$ para ambos os grupos). As medianas da ET-1 da segunda amostra foram significativamente maiores no grupo com DMH do que no grupo controle ($p < 0,001$). Houve uma correlação positiva entre dosagem da ET-1 na segunda amostra e o Escore de Gravidade Neonatal SNAPPE II ($r = 0,36$, $p = 0,02$), e duração da ventilação mecânica ($r = 0,59$, $p = 0,04$). Um declínio mais lento nos valores da ET-1 do nascimento para as 12 a 48h de vida foi observado nos recém-nascidos pré-termo com DMH comparados com os controles.

Conclusões: Recém-nascidos pré-termo com e sem DMH tem níveis semelhantes da ET-1 no sangue de cordão umbilical, enquanto os níveis da ET-1 no recém-nascido com 12 a 48 horas de vida foram maiores nos com DMH do que nos controles. Níveis elevados da ET-1 na DMH sugerem que este mediador está envolvido na fisiopatologia da DMH.

Palavras-chave: endotelina-1, doença da membrana hialina, prematuridade, displasia broncopulmonar, SNAPPE II.

UMBILICAL CORD AND NEONATAL ENDOTHELIN -1 LEVELS IN PRETERM NEWBORNS WITH AND WITHOUT RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

ABSTRACT

Objective: To determine umbilical cord and plasma levels of endothelin-1 (ET-1) in preterm newborns with respiratory distress syndrome (RDS) and compare them with a control group.

Study design: We determined umbilical cord blood and neonatal (second sample) levels of endothelin-1 in 18 preterm newborns with RDS who had no clinical or echocardiographic diagnosis of pulmonary hypertension and 22 without respiratory distress syndrome (birth weight <2000g and gestational age \leq 34 weeks). Umbilical cord blood and a second blood sample taken 12 to 48 hours after birth were used for ET-1 determination by enzyme immunoassay.

Results: Median umbilical cord blood ET-1 levels were similar in both groups (control: 10.9pg/mL and RDS: 11.4pg/mL) and were significantly higher than in the second sample (control: 1.7pg/mL and RDS: 3,5pg/mL, $P<0.001$ for both groups). Median ET-1 levels in the second sample were significantly higher in children with RDS than in control infants ($P<0.001$). There were significant positive correlations between second sample ET-1 and Score for Neonatal Acute Physiology and Perinatal Extension II ($r=0.36$, $P=0.02$), and duration of mechanical ventilation ($r=0,59$, $P=0.04$). A slower decline of ET-1 from birth to 48 h of life was observed in newborns with RDS when compared to controls.

Conclusions: Preterm newborns with and without RDS had similar umbilical cord ET-1 levels, whereas ET-1 levels were higher in RDS than in the control newborns 12 to 48 hours after birth. High ET-1 in RDS suggests that this mediator is involved in pathophysiology of RDS.

Key-words: endothelin-1, respiratory distress syndrome, prematurity, hyaline membrane disease, bronchopulmonary displasia, SNAPPE II.

INTRODUÇÃO

Estudos recentes sugerem a presença de um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) em recém-nascidos pré-termo (RNPT) com doença da membrana hialina (DMH), os mecanismos envolvidos nesse processo, todavia, ainda não estão bem estabelecidos (1,2,3,4).

A endotelina (ET) é um peptídeo composto por 21 aminoácidos em cadeia com duas pontes dissulfeto, havendo três isoformas distintas: ET-1, ET-2 e ET-3 (5). A ET-1 induz contração isolada das veias pulmonares, mitogênese do músculo liso vascular, hipertrofia de células miocárdicas, apresenta efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos, provoca broncoconstrição, secreção de muco, proliferação celular e reação inflamatória (6,7,8,9,10,11,12). A ET-1 apresenta uma potente ação vasoconstritora pulmonar (6,8,9,11,12,13,14).

Há estudos experimentais sugerindo que a ET-1 possa ter um papel importante na reatividade vascular pulmonar da DMH (3,4). Há relato de elevação dos níveis da ET-1 em aspirados traqueais de recém-nascidos com DMH (15). Foram também constatados níveis séricos elevados da ET-1 na sepse neonatal (16), asfixia perinatal (17,18), hérnia diafragmática congênita (19), hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (13,20,21,22,23) e na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) em crianças (24).

Nossa hipótese é que a ET-1 está envolvida na patogênese da DMH em RNPT. Desta forma, avaliamos os níveis da ET-1 no sangue de cordão umbilical e nas primeiras 12 a 48 horas de vida em RNPT com e sem DMH.

PACIENTES E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e consentimento informado foi obtido dos pais ou responsáveis pelos recém-nascidos.

População estudada

Foram incluídos no estudo RNPT, com idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas e peso de nascimento inferior a 2.000g, nascidos no Centro Obstétrico do HCPA no período de 1º de janeiro de 2001 a 15 de novembro de 2003, além de ausência de hemólise no sangue de cordão umbilical coletado.

Foram excluídos os recém-nascidos com malformações congênitas, doenças genéticas ou infecções congênitas como sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes, os filhos de mães soropositivas para o vírus da imunodeficiência adquirida e de usuárias de opiáceos ou outros fármacos capazes de causar depressão respiratória no recém-nascido ou com uso de drogas de qualquer espécie, além de recém-nascidos com quadro de disfunção respiratória caracterizada por pneumonia congênita ou como parte do quadro clínico de sepse neonatal precoce, bem como presença de hemólise no sangue coletado.

DMH foi definida como a presença de disfunção respiratória iniciada nas primeiras 24 horas de vida caracterizada por taquipnéia, retrações intercostais, subcostais e supraesternais, gemido expiratório e, ou cianose com necessidade de oxigênio superior a 50% para manter a saturação de oxigênio acima de 92%, além de raios-x de tórax compatível com o diagnóstico de DMH (microgranulações disseminadas em ambos pulmões e broncograma aéreo).

A Displasia Broncopulmonar (DBP) foi diagnosticada com base nos critérios do NICHD/NHLBI/ORD Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia (25).

A idade gestacional foi obtida pela história materna do último período menstrual e ecografia de primeiro trimestre, quando disponível, e confirmada pelo Método de New Ballard (26). Quando a diferença foi maior que duas semanas entre as duas avaliações, foi considerada a avaliação clínica.

Foi realizado SNAPPE II em todos os recém-nascidos no final das primeiras 24 horas de vida (27).

Surfactante pulmonar exógeno foi utilizado nos recém-nascidos que apresentaram dificuldade respiratória nas primeiras horas de vida, necessitando mais de 40% de oxigênio e com exame radiológico compatível com DMH.

Classificação dos recém-nascidos

GRUPO CONTROLE: recém-nascidos pré-termo sem sintomas respiratórios ou com quadros leves de disfunção respiratória, com necessidade máxima de oxigênio de 40% e com duração máxima de 72 horas e que não fizeram uso de surfactante pulmonar exógeno.

GRUPO DMH: recém-nascidos pré-termo que desenvolveram DMH, como definido previamente, e que necessitaram de tratamento com surfactante pulmonar exógeno, além de não ter tido diagnóstico clínico ou ecocardiográfico de hipertensão pulmonar.

Determinação dos níveis plasmáticos da ET-1

Foi colhido sangue venoso do cordão umbilical no momento do nascimento e uma amostra adicional de sangue foi colhida entre 12 e 48 horas após o nascimento, para dosagem da ET-1. Nenhuma punção venosa foi realizada especialmente para o estudo. O sangue foi coletado em tubos com EDTA (1000 µl) e centrifugado imediatamente. O plasma foi congelado e armazenado a -80°C. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A análise da ET-1 foi realizada usando a técnica de enzimo-imunoensaio (QuantiGlo, R&D Systems, Inc. MN, USA). O *kit* utilizado apresenta uma margem de análise de 0,32 a 1000 pg/mL, uma sensibilidade de <0,16pg/mL e um coeficiente de variação intraensaio e

interensaio de 2,5% e 5%, respectivamente. As leituras foram realizadas num luminômetro para placas de ELISA, Lumicount automático.

Análise estatística

O cálculo do tamanho da amostra resultou em 17 recém-nascidos em cada grupo, para obter um nível de significância de 5%, um poder estatístico de 80% e uma estimativa de diferença entre os grupos de 40% nos níveis da ET-1.

Os resultados foram apresentados em médias e desvios padrões (média±DP) ou mediana e percentil interquartil (mediana, p25-p75), ou ainda, em percentagem.

Inicialmente, para comparação de variáveis paramétricas, foi realizado o Teste t de Student e, para as não-paramétricas, o Teste de Mann-Whitney. Para as variáveis qualitativas foram utilizados os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, quando necessário. O Coeficiente de Correlação de Spearman foi calculado para as correlações entre a ET-1 e SNAPPE II, a ET-1 e duração da ventilação mecânica e a ET-1 e escore de apgar.

Para comparação da ET-1 entre os grupos com e sem DMH no sangue de cordão e após com 12 a 48 horas de vida, utilizamos transformação logarítmica em um modelo de Análise de Variâncias (ANOVA) para medidas repetidas, controlando para peso de nascimento, idade gestacional e escore de apgar no 5º minuto. Na comparação dos grupos: controle, DMH com DBP e DMH sem DBP, foi utilizado ANOVA de uma via, também com transformação logarítmica da variável ET-1.

O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

O programa estatístico empregado foi o *Statistical Package for Social Science* (SPSS).

RESULTADOS

Foram incluídos 40 RNPT, assim divididos: grupo controle (n=22) e grupo DMH (n=18).

Os dois grupos não diferiram quanto ao sexo, tipo de parto e tempo médio de vida no momento da coleta de sangue com 12 a 48 horas pós-nascimento. Os recém-nascidos com DMH foram significativamente mais imaturos, com peso de nascimento menor, escore de Apgar mais baixo no 5º minuto e SNAPPE II maior do que os controles (tabela 1). Nenhum recém-nascido em ambos os grupos apresentou exame cultural positivo.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação aos valores da ET-1 no sangue do cordão umbilical. Nos valores da ET-1 com 12 a 48 horas de vida, os níveis foram significativamente superiores nos recém-nascidos com DMH do que nos controles (tabela 2).

A ET-1 no sangue de cordão umbilical foi maior que a ET-1 obtida com 12 a 48 horas de vida em ambos os grupos ($p < 0,001$). Houve diferença significativa entre os dois grupos utilizando ANOVA para medidas repetidas ($p = 0,007$) e a diferença persistiu após ter sido controlada para idade gestacional, peso de nascimento e índice de Apgar no 5º minuto ($p = 0,015$) (Figura 1).

Não houve correlação significativa entre os valores do SNAPPE-II e os níveis da ET-1 no cordão umbilical ($p = 0,88$), mas houve uma correlação positiva entre os valores da ET-1 com 12 a 48 horas de vida e o SNAPPE-II ($r = 0,36$, $p = 0,02$). Não houve correlação entre os níveis da ET-1 no cordão umbilical ou com 12 a 48 horas de vida com o escore de apgar < 6 no 5º minuto. O tempo de uso de ventilação mecânica mostrou correlação positiva com dosagem da ET-1 com

12 a 48 horas de vida ($r=0,59$, $p=0,04$), mas não com os níveis da ET-1 no sangue do cordão umbilical ($p=0,93$).

Três pacientes do grupo com DMH desenvolveram DBP. Não houve diferença nos valores da ET-1 do sangue de cordão entre os controles, os pacientes com DMH sem DBP e com DBP (10,9pg/mL, 11,2pg/mL e 13,8pg/mL respectivamente; $p=0,96$). Na amostra com 12 a 48 horas de vida, não houve diferença entre pacientes sem DBP e com DBP (3,7pg/mL e 3,3pg/mL respectivamente, $p=0,93$), e ambas foram significativamente mais altas do que nos controles ($p=0,001$ e $p=0,05$, respectivamente).

Não houve diferença nos níveis da ET-1 no sangue do cordão umbilical e no sangue obtido com 12 a 48 horas após o nascimento entre os recém-nascidos que sobreviveram e os não-sobreviventes (tabela 3).

DISCUSSÃO

A endotelina-1, o óxido nítrico e as prostaglandinas modulam o tônus vascular pulmonar nos fetos normais (28,29,30,31). A ET-1 age nos vasos pulmonares através dos receptores ETA, presentes no músculo liso arterial do pulmão fetal, e receptores ETB, localizados nas células endoteliais. A ET-1 ligando-se aos receptores ETA leva à vasoconstrição e aos receptores ETB à vasodilatação (28,32). Níveis elevados no cordão umbilical estão relacionados à adaptação à vida extra-uterina (13). Desta forma, não é surpresa que os recém-nascidos com DMH e os controles tenham níveis similares da ET-1 na amostra de sangue do cordão umbilical.

Recém-nascidos a termo têm níveis elevados da ET-1 nas primeiras horas de vida e estes diminuem progressivamente (28). Hipóxia, doenças pulmonares, malformações ou mesmo prematuridade podem causar um desbalanço entre mediadores vasoconstritores e vasodilatadores (13).

Modelos experimentais têm sugerido que a ET-1 pode ter um papel importante na reatividade vascular dos recém-nascidos com DMH (3,4). Estudos com um pequeno número de recém-nascidos humanos sugerem que ET-1 está elevada na DMH (17,32,33).

O presente estudo é relevante pois tem grupo controle, a amostra tem tamanho significativo e foi estatisticamente calculada, e a ET-1 foi dosada empregando-se a técnica de enzimo-imunoensaio. Os nossos resultados confirmam que RNPT com DMH apresentam níveis elevados da ET-1 com 12 a 48 horas após o nascimento.

A presença de níveis elevados da ET-1, mesmo na ausência de hipertensão pulmonar, sugere que a ET-1 possa estar aumentada na DMH como parte da fisiopatologia desta doença (32). Além da principal ação vasoconstritora, a ET-1 tem ação mitogênica e inflamatória, e

em associação com a presença de outros mediadores vasoativos e inflamatórios pode estar envolvida no quadro do aumento da RVP, congestão vascular, hemorragia pulmonar e evidências de injúria direta ao endotélio, presentes na doença da membrana hialina (11).

Aumento da produção e diminuição da depuração da ET-1 pelos pulmões têm sido sugeridos como os mecanismos responsáveis pelos altos níveis da ET-1 em recém-nascidos com DMH. A hipóxia pode induzir uma produção da ET-1 em fetos (34). Recém-nascidos pré-termo com DMH freqüentemente apresentam períodos de hipóxia durante o curso da doença. Os pulmões são os responsáveis pelo clearance de 90% da ET-1 circulante (12). Não há estudos sobre a depuração da ET-1 na DMH, entretanto, tem sido mostrado que a depuração da ET-1 está diminuído em adultos com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (7).

No nosso estudo, foi observado uma correlação significativa entre os níveis da ET-1 e a gravidade da doença – duração de ventilação mecânica e SNAPPE II – sugerindo que a ET-1 tenha um papel importante no curso natural da DMH em RNPT. Niu e colaboradores, 1998, associaram níveis elevados da ET-1 no aspirado traqueal com maior probabilidade de desenvolvimento de DBP (35). Em crianças com SARA é descrita uma associação entre níveis elevados da ET-1 plasmática e maior mortalidade (24). Nossos dados não demonstraram associação entre níveis plasmáticos elevados da ET-1 e a ocorrência de DBP ou maior mortalidade, possivelmente porque esses achados necessitem da inclusão de um maior número de pacientes. De acordo com o nosso objetivo, o tamanho da amostra foi calculado para avaliar diferenças da ET-1 em recém-nascidos com e sem DMH.

O óxido nítrico aumenta os níveis celulares da GMPc (monofosfato cíclico de guanosina), que, por sua vez, diminui a liberação da ET-1 (12). Recentemente o NO tem sido usado no tratamento de RNPT com DMH (36,37). Em estudos experimentais, bloqueadores dos receptores ETA melhoraram a oxigenação em ovelhas pré-termo com DMH (3).

Concluindo, nossos recém-nascidos com e sem DMH tiveram níveis semelhantes da ET-1 no sangue do cordão umbilical, enquanto os níveis com 12 a 48 horas de vida após o nascimento foram mais altos nos recém-nascidos com DMH quando comparados com os controles. O aumento da resistência vascular pulmonar na DMH pode estar relacionado com níveis elevados da ET-1, justificando o uso do óxido nítrico e suportando recomendações para estudos futuros com novas modalidades terapêuticas, como a utilização de bloqueadores dos receptores ETA em recém-nascidos com DMH.

BIBLIOGRAFIA

1. Skinner JR, Boys RJ, Hunter S, Hey EM. Pulmonary and systemic arterial pressure in hyaline membrane disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1992;67:355-73.
2. Walther FJ, Benders MJ, Leighton JO. Persistent pulmonary hypertension in premature neonates with severe respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1992;90:899-904.
3. Ivy DD, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. Endothelin A receptor blockade decreases pulmonary vascular resistance in premature lambs with hyaline membrane disease. *Pediatr Res* 1998;44:175-80.
4. Vroomen M, Cardozo RHL, Steendijk P, Frölich M, Baan J, Van Bel F. Endothelin-1 plasma concentration increases in the early phase of pulmonary hypertension development during respiratory distress syndrome: a study in newborn lambs. *Early Hum* 2001;63:9-21.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
6. Lerman A, Hildebrand FL, Margulies KB, O'Murchu B, Perrella MA, Heublein DM, et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc* 1990;65:1441-55.
7. Druml W, Steltzer H, Waldhäusl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, et al. Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1169-73.
8. Levin ER. Endothelins. *NEJM* 1995;333(6):356-63.
9. Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:555-81.
10. Schears GJ, Costarino AT. Complexity of inflammatory mediators in acute respiratory distress syndrome (ARDS) [editorial]. *J Pediatr* 1999;135:144-6.
11. Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res*

2001;2(2):90-101.

12. Goraca A. New views on the role of endothelins. *Endocr Regul* 2002;36:161-7.

13. Perreault T, Coceani F. Endothelin in the perinatal circulation. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:644-53.

14. Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:543-54.

15. Andersson S, Merritt A, Orpana A, Viinikka L, Ylikorkala O. High endothelin-1 in the airways of preterm infants is associated with less severe respiratory distress during the early postnatal period. *Pediatrics* 1997;99:545-7.

16. Figueras-Aloy J, Gómez L, Rodríguez-Miguélez JM, Jordán Y, Salvia MD, Jiménez W, Carbonell-Estrany X. Plasma nitrite/nitrate and endothelin-1 concentrations in neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003;92:582-7.

17. Kojima T, Isozaki-Fukuda Y, Takedatsu miglitol, Ono A, Hitata Y, Kobayashi Y. Plasma endothelin-1 like immunoreactivity levels in neonates. *Eur J Pediatr* 1992;151:913-5.

18. Laforgia N, Difonzo I, Altomare M, Mautone A. Cord blood endothelin-1 and perinatal asphyxia. *Acta Pædiatr* 2001;90:351-2.

19. Kobayashi H, Puri P. Plasma endothelin levels in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994;29(9):1258-61.

20. Kumar P, Kazzi NJ, Shankaran S. Plasma immunoreactive endothelin-1 concentrations in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Perinatol* 1996;13(6):335-41.

21. Fineman JR, Wong J, Mikhailov T, Vanderford PA, Jerome HE, Soifer SJ. Altered endothelial function in lambs with pulmonary hypertension and acute lung injury. *Pediatric Pulmonol* 1999;27:147-56.

22. Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Endogenous nitric

oxide and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Eur J Pediatr* 2001;160:217-22.

23. Truog WE, Pallotto E, Clark P, Kaftan HA, Ekekezie II, Norberg M, Ballard RA. Interaction of endogenous endothelin-1 and inhaled nitric oxide in term and preterm infants. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(Suppl 48):294S-7S.

24. Dobyns EL, Eells PL, Griebel JL, Abman SH. Elevated plasma endothelin-1 and cytokine levels in children with severe acute respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1999;135:246-9.

25. Jobe, AH, Bancalari E. NICHD/NHLBI/ORD Workshop Summary on Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1723-1729.

26. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extrwemely premature infants. *J Pediatr* 1991;119(3):417-23.

27. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK, The Canadian NICU Network, The Kaises Permanente Neonatal Minimum Data Set Wide Area Network, and The SNAP-II Study Group. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr* 2001;138:92-100.

28. Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Physiologic significance of nitric oxide and endothelin-1 in circulatory adaptation. *Pediatr Int* 2000;42(1):26-30.

29. Whitsett JA Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Acute respiratory disorders. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG ed. *Neonatology Pathophysiology and management of the newborn*. 5 ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 1999.p.485-508.

30. Tsukahara H, Sekine K, Miura M, Todoroki Y, Ohshima Y, Hiraoka M, Hosokawa K, Kotsuji F, Mayumi M. Vasoactive and natriuretic mediators in umbilical cord blood: a report of our observation and review of the literature. *Early Hum* 2002;69:57-64.

31. Ziegler JW, Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of the pulmonary circulation. *Clin Perinatol* 1995;22(2):387-403.
32. Kääpä P, Kero P, Ekblad H, Erkkola R, Arjamaa O. Plasma endothelin-1 in the neonatal respiratory distress syndrome. *Ann Chir Gynaecol* 1994;83:110-2.
33. Malamitsi-Puchner A, Economou E, Efstathopoulos T, Sevastiadou S, Hadzistamatiou Z, Nicolopoulos D. Endothelin1-21 plasma concentrations on days 1 and 4 of life in healthy and ill preterm neonates. *Biol Neonate* 1995;67:317-21.
34. Hashiguchi K, Takagi K, Nakabayashi M, Takeda Y, Sakamoto S, Naruse M et al. Relationship between fetal hypoxia and endothelin-1 in fetal circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (suppl 7):S509-S510
35. Niu JO, Munshi UK, Siddiq MM, Parton LA. Early increase in endothelin-1 in tracheal aspirates of preterm infants: correlation with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1998;132:965-70.
35. Kinsella JP, Walsh WF, Bose CC, Gertsman DR, Labella JJ, Saresai S, et al. Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 354:1061-65.
36. Schreiber MD, Gin-Mestan K, Marks JD, Huo D, Lee G, Srisuparp P. Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2003;349:2099-2107.

Tabela 1 - Dados demográficos da população estudada

	Controles (n=22)	DMH (n=18)	p
Idade gestacional (semanas)	31,4 ±1,6	29,33 ±2,3	0,002
Peso de nascimento (g)	1580,4 ±276,7	1064,7 ±219,9	<0,001
Sexo masculino	11 (50,0%)	10 (55,5%)	0,97
Parto cesariano	15 (68,2%)	15 (83,3%)	0,46
Índice de Apgar no 5º minuto	9 (8,7 – 9)	8 (6 – 9)	0,03
SNAPPE II	0 (0 – 9)	24,0 (17,75 - 36,75)	0,001
Tempo médio de vida na coleta de sangue com 12 a 48 horas pós-nascimento (horas)	29,7 ±10,2	30,3 ±9,4	0,85

Valores expressos frequência (%), média ± desvio padrão ou mediana (p25-p75)

Tabela 2 – Níveis plasmáticos da ET-1 nos recém-nascidos pré-termo com DMH e controles

	Controles (n=22)	DMH (n=18)	p
ET-1 no sangue de cordão	10,9	11,4	0,9
(pg/mL)	(7,4 - 14,2)	(7,1 - 17,3)	
ET-1 com 12 a 48 horas de vida	1,7	3,5	<0,001
(pg/mL)	(1,4 - 2,2)	(2,7 - 4,9)	

Valores expressos em mediana (p25-p75)

Tabela 3 – Dados demográficos e níveis da ET-1 nos RNPT com DMH comparando os sobreviventes e os não-sobreviventes

	Sobreviventes	Não-sobreviventes	p
	(n=13)	(n=5)	
Idade gestacional (sem)	29,3 ±2,5	29,4 ± 1,9	0,94
Peso de nascimento (g)	1119,6 ±177,4	922,0 ±275,3	0,09
ET-1 do sangue de cordão	9,4	11,7	0,29
(pg/mL)	(5,6 - 15,8)	(9,8 - 20,5)	
ET-1 com 12 a 48 horas de vida	3,4	3,8	0,44
(pg/mL)	(2,6 - 4,5)	(2,6 - 8,5)	

Valores expressos em média ± desvio padrão ou mediana (p25-p75)

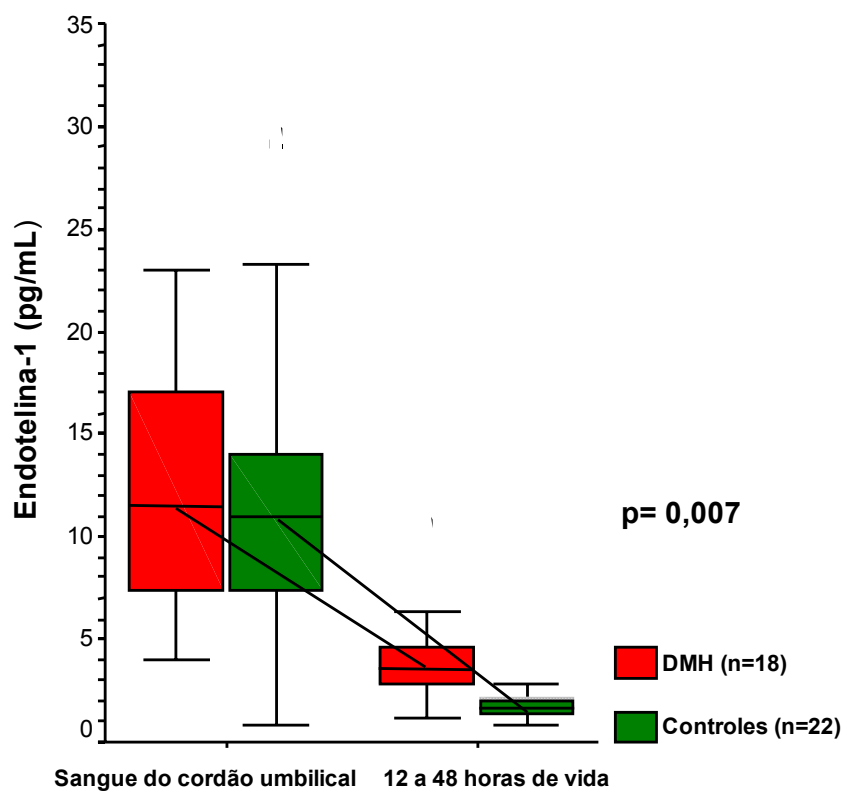


Figura 1 – Comparação entre os níveis da ET-1 nos recém-nascidos pré-termo com DMH e controles.

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo brasileiro avaliando níveis séricos da ET-1 em recém-nascidos pré-termo com DMH. Os estudos disponíveis na literatura internacional são experimentais ou com uma amostra relativamente pequena de recém-nascidos. Estes estudos evidenciam níveis aumentados da ET-1 em recém-nascidos pré-termo com DMH. Os nossos resultados confirmam esses achados.

Os níveis séricos da endotelina-1 no sangue do cordão umbilical não diferem recém-nascidos pré-termo com DMH ou sem DMH (controles). Nos controles, os níveis da ET-1 caíram na evolução das primeiras 12 a 48 horas de vida de forma mais acentuada do que nos recém-nascidos com DMH. Desta forma, os níveis séricos da ET-1 são mais elevados em pacientes com DMH na dosagem com 12 a 48 horas de vida, demonstrando um comportamento próprio da ET-1 na evolução da DMH. Os níveis da ET-1 no sangue de cordão umbilical não têm valor no diagnóstico precoce da DMH.

Demonstramos uma correlação significativa entre os níveis da ET-1 e a gravidade da DMH – duração de ventilação mecânica e SNAPPE II – sugerindo que a ET-1 tenha um papel importante no curso natural da DMH nestes recém-nascidos.

No grupo de RNPT estudados não encontramos correlação entre os valores da ET-1 com a sobrevida. O pequeno número de não-sobreviventes nesta amostra dificulta alguma conclusão

mais definitiva a respeito da possível correlação. Também não encontramos correlação entre os níveis da ET-1 com o desenvolvimento da DBP, porém não era este o objetivo inicial do estudo e portanto, o cálculo no tamanho da amostra foi realizado para comparação entre presença ou não de DMH.

A relevância do nosso estudo também está relacionada à possibilidade de novas terapêuticas futuras com bloqueadores dos receptores ETA em recém-nascidos pré-termo com DMH, especialmente nos com quadros mais graves.

ANEXOS

ANEXO I

PROTOCOLO : NÍVEIS DA ET-1 NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E COM 12 A 48 HORAS DE VIDA EM RNPT COM E SEM DMH

1. Número: _____ 2. Grupo: (1) DMH (2) Controle

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Rn de _____ Registro: _____ / _____

3. DN: __/__/200__ 4. Horário: __h__min 5. Sexo: (1) M (2) F 6. PN: _____g

7. Apgar 5º minuto: ____ 8. IGP (Ballard): ____semanas 9. SNAPPE II: ____

DADOS MATERNOS E DO PARTO:

10. Tipo de parto: (1) vaginal (2) cesariana

11. IGO: ____semanas 12. IG válida: ____semanas

DADOS DO RN - DRP/ET-1/DBP:

13. ET-1 no sangue do cordão: ____pg/mL

14. ET-1 com 12 a 48h d.v.: ____pg/mL 15. Data coleta: __/__/200__ 16. __h__min

17. Tempo de vida na coleta: ____horas

18. Diagnóstico respiratório: (1) DMH (2) TTRN (3) outro: _____ (8) não teve DRP

Rx tórax: _____

19. HPP: (1) clínica (2) clínica e ECO (3) ECO (8) ausência

20. DBP: (1) sim (2) não 18. Rx alterado para DBP: (1) sim (2) não (8) não tem RX

21. Hemocultura positiva (sepse precoce): (1) sim (2) não

Suporte ventilatório: 22. VM (1) sim (2) não 23. CPAPn (1) sim (2) não

24. Campânula (1) sim (2) não 25. Tempo de VM: __horas

EVOLUÇÃO:

26. Desfecho: (1) alta (2) óbito 27. Data alta/ óbito: __/__/200__ 28. Hora: __h__min

Observações: _____

ANEXO II

Grupo de recém-nascidos pré-termo com DMH (n=18)

NUM	GRU	DN	HDN	SEXO	PN	APG5	IGP	PARTO	IGO	IGV	SNAPPEII	ET1CORD	ET1PERI	DATAPERI	HPERI	TVCOL
1	1	25/02/01	10:58	1	1250	4	30	2	29	29	27	4,4	2,1	26/2/2001	07:30	21
2	1	18/04/01	22:02	2	985	9	33	1	26	33	22	7,4	2,8	20/4/2001	11:20	38
3	1	04/05/01	19:17	1	1050	10	31	2	31	31	24	11,2	3,8	5/5/2001	12:30	18
4	1	09/05/01	0:37	1	900	5	30	2	28	28	69	11,7	2,2	9/5/2001	16:30	16
5	1	28/05/01	11:10	1	1320	9	32	2	28	32	21	23	10,7	29/5/2001	13:30	27
11	1	02/12/01	21:45	2	935	6	28	1	26	26	57	13,8	1,1	4/12/2001	00:20	27
13	1	11/01/02	15:58	1	1260	8	30	2	30	30	5	5,1	9,8	12/1/2002	15:00	24
14	1	23/02/03	21:45	1	1145	9	30	1	28	28	16	4	3,3	25/2/2003	11:45	38
15	1	24/02/03	20:00	2	895	8	29	2	27	27	25	6,1	4,4	25/2/2003	19:15	24
21	1	26/05/03	15:39	1	1375	8	32	2	29	32	24	9,4	4,6	27/5/2003	11:30	20
23	1	04/06/03	22:08	2	1125	10	29	2	27	27	30	8,2	3,4	6/6/2003	10:50	37
24	1	15/06/03	15:05	2	1315	9	30	2	28	28	24	17	2,5	17/6/2003	12:30	46
26	1	29/06/03	11:29	2	920	10	29	2	26	29	18	20,4	3,7	30/6/2003	13:00	26
28	1	07/07/03	10:35	2	1200	7	32	2	29	32	8	14,6	3,8	8/7/2003	15:00	29
29	1	09/07/03	5:44	1	870	7	27	2	27	27	18	13	3	10/7/2003	10:20	29
32	1	19/08/03	15:26	1	1280	8	33	2	29	33	17	21,5	5,9	21/8/2003	09:30	43
37	1	29/09/03	18:58	2	650	4	28	2	25	28	64	8,4	3,1	1/10/2003	11:45	41
38	1	29/09/03	19:01	1	690	6	28	2	25	28	76	18,1	6,4	1/10/2003	12:10	42

NUM: número, GRU: grupo, DN: data de nascimento, HDN: horário do nascimento, SEXO: sexo, PN: peso de nascimento, APG5: apgar do 5º minuto, IGP: idade gestacional pediátrica, PARTO: tipo de parto, IGO: idade gestacional obstétrica, IGV: idade gestacional válida, conforme critérios previamente descritos, SNAPPEII: escore de gravidade, ET1CORD: ET-1 do sangue de cordão umbilical, ET1PERI: ET-1 coletada com 12 a 48 horas de vida, DATAPERI: data que foi coletada a ET-1 da segunda amostra, HPERI: horário desta coleta, TVCOL: tempo de vida na coleta.

ANEXO III

Grupo de recém-nascidos pré-termo com DMH (n=18)

NUM	DX	HPP	DBP	RXDBP	HMC+	VM	CPAPn	CAMP	TVM	DESFE	DDESFE	HDESFE
1	1	8	2	2	2	1	1	1	80	1	13/4/2001	15:19
2	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	20/6/2001	13:39
3	1	8	2	2	2	1	1	1	423	2	7/7/2001	15:05
4	1	8	2	2	2	1	2	2	155	2	15/5/2001	11:46
5	1	8	1	1	2	1	1	2	711	2	27/6/2001	03:50
11	1	8	1	1	2	1	1	1	48	1	16/2/2002	10:12
13	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	15/2/2003	14:32
14	1	8	1	1	2	1	1	1	443	1	28/4/2003	15:43
15	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	22/4/2003	14:40
21	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	30/6/2003	12:51
23	1	8	2	2	2	1	1	1	400	1	10/11/2003	10:48
24	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	22/7/2003	09:46
26	1	8	2	2	2	1	1	1	131	1	8/9/2003	13:06
28	1	8	2	2	2	2	1	1	0	1	28/8/2003	12:44
29	1	8	2	2	2	1	1	1	88	1	15/9/2003	12:12
32	1	8	2	2	2	1	1	1	49	1	23/9/2003	13:32
37	1	8	2	2	2	1	2	2	444	2	18/10/2003	07:38
38	1	8	2	2	2	1	2	2	493	2	20/10/2003	08:00

NUM: número, DX: diagnóstico respiratório, HPP: hipertensão pulmonar persistente, DBP: displasia broncopulmonar, RXDBP: raios-X com alterações para DBP, HMC+: hemocultura positiva, VM: ventilação mecânica, CPAPn: pressão positiva e contínua de vias aéreas com dispositivo nasal, CAMP: campânula, TVM: tempo de ventilação mecânica utilizado, DESFE: fesecho final, DDESFE: data do desfecho e HDESFE: horário que ocorreu o desfecho.

ANEXO IV

Grupo de recém-nascidos pré-termo controles (n=22)

NUM	GRU	DN	HDN	SEXO	PN	APG5	IGP	PARTO	IGO	IGV	SNAPPEII	ET1CORD	ET1PERI	DATAPERI	HPERI	TVCOL
6	2	23/07/01	17:30	1	1180	10	33	2	33	33	12	13,7	0,8	24/7/2001	12:30	19
7	2	15/09/01	17:13	2	1085	9	33	2	33	33	20	12,9	1	16/9/2001	15:30	23
8	2	26/09/01	21:36	1	1900	9	32	2	32	32	8	5,9	1,6	27/9/2001	11:45	15
9	2	08/11/01	10:27	2	1670	7	30	2	31	31	8	8,1	2,7	9/11/2001	11:45	26
10	2	02/12/01	20:47	1	1650	10	33	2	31	31	13	8,1	1,7	4/12/2001	10:30	38
12	2	27/12/01	15:35	1	1385	9	31	2	31	31	15	9,9	1,7	28/12/2001	14:10	23
16	2	01/04/03	19:28	1	1835	9	33	2	32	32	0	7,4	1,2	2/4/2003	12:00	17
17	2	26/04/03	23:37	2	1835	9	32	2	31	31	0	23,3	1,4	27/4/2003	13:15	14
18	2	13/05/03	2:15	2	1595	10	33	1	32	32	0	14	2,8	14/5/2003	18:00	40
19	2	16/05/03	12:59	2	1880	8	34	1	32	32	0	29,1	1,6	17/5/2003	23:40	35
20	2	18/05/03	12:30	2	1335	9	31	1	28	31	0	8,9	2	19/5/2003	18:45	31
22	2	30/05/03	21:28	2	1800	8	34	2	32	32	0	3,8	2	1/6/2003	10:10	37
25	2	17/06/03	0:26	1	1545	9	32	2	32	32	0	7,6	2	18/6/2003	17:30	42
27	2	02/07/03	4:25	1	1860	8	32	1	32	32	0	14,8	2,3	3/7/2003	18:00	38
30	2	19/08/03	0:46	2	1640	9	32	2	32	32	0	13	2,8	19/8/2003	12:30	12
31	2	19/08/03	0:48	1	1875	9	32	2	32	32	5	7,3	2,6	20/8/2003	11:30	35
33	2	03/09/03	13:56	2	1580	8	34	2	32	32	0	29,7	1,90	4/9/2003	14:20	25
34	2	09/09/03	5:43	1	1725	10	32	1	31	31	8	22,9	2,2	10/9/2003	11:40	30
35	2	17/09/03	11:29	2	1705	9	33	1	33	33	20	12	1	19/9/2003	12:00	48
36	2	27/09/03	10:16	1	1540	9	33	2	33	33	0	0,8	1,4	28/9/2003	18:40	33
39	2	8/11/2003	04:45	1	1110	9	27	2	27	27	0	7	1,7	9/11/2003	10:45	30
40	2	8/11/2003	19:20	2	1040	9	27	1	27	27	8	12,5	1,6	10/11/2003	13:40	43
6	2	23/07/01	17:30	1	1180	10	33	2	33	33	12	13,7	0,8	24/7/2001	12:30	19

ANEXO V

Grupo de recém-nascidos pré-termo controles (n=22)

NUM	DX	HPP	DBP	RXDBP	HMC+	VM	CPAPn	CAMP	TVM	DESFE	DDESFE	HDESFE
6	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	31/8/2001	10:57
7	2	8	2	2	2	2	2	1	0	1	25/10/2001	15:15
8	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	15/10/2001	16:31
9	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	30/11/2001	12:09
10	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	25/12/2001	11:39
12	2	8	2	2	2	2	2	1	0	1	6/2/2002	16:43
16	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	23/4/2003	10:32
17	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	12/5/2003	14:27
18	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	2/6/2003	14:30
19	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	4/6/2003	12:31
20	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	26/6/2003	17:46
22	8	8	2	2	2	2	2	1	0	1	16/6/2003	12:17
25	2	8	2	2	2	2	1	2	0	1	14/7/2003	12:44
27	2	8	2	2	2	2	2	2	0	1	15/7/2003	11:52
30	2	8	2	2	2	2	1	2	0	1	8/9/2003	15:45
31	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	8/9/2003	15:48
33	5	8	2	2	2	2	1	2	0	1	30/9/2003	12:51
34	2	8	2	2	2	2	1	1	0	1	03/10/03	11:57
35	2	8	2	2	2	2	1	2	0	1	9/10/2003	15:13
36	8	8	2	2	2	2	2	2	0	1	27/10/2003	13:32
39	2	8	2	2	2	2	1	2	0	1	5/1/2004	12:00
40	8	8	2	2	2	2	1	2	0	1	2/1/2004	11:26

ANEXO VI

TERMO DE CONSENTIMENTO

O bebê que nasce antes do tempo, prematuro, sabe-se que tem risco maior de ter problemas respiratórios nas primeiras horas de vida do que os bebês que nascem no tempo certo.

O objetivo deste estudo é ver se há correlação entre o nível no sangue de uma substância chamada endotelina-1 com o aparecimento destes problemas respiratórios no prematuro. Ver se ela está alta ou baixa no sangue do cordão umbilical, que foi coletado logo ao nascimento, e em uma segunda amostra de sangue, que será coletada junto com os outros exames que o médico do seu filho solicitará. Isto implicará em um melhor conhecimento das causas destes problemas respiratórios e, quem sabe no futuro, novas formas de tratamento. A quantidade de sangue adicional ao que será coletado a pedido de seu médico, é mínima, 1ml, o que não implicará em riscos maiores para o seu bebê. Seu filho não será submetido a exame de sangue exclusivamente para a pesquisa, e nenhuma intervenção será feita com esta finalidade.

Eu, _____, responsável pelo recém-nascido de _____, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre o procedimento no qual o meu filho ou tutelado estará envolvido, e os desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto sobre os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Declaro, para os devidos fins, que autorizo a inclusão do meu filho ou tutelado no estudo realizado pela Dra. Ana Cláudia Weber Benjamin.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do investigador: _____

Telefones para contato: 3249 64 78 ou 9954 48 34.