



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

GUILHERME PASETTO FADANNI

Estudo do efeito da combinação de fármacos anti-citocina na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos: *insights* para o tratamento farmacológico da SDRA

FLORIANÓPOLIS

2023

GUILHERME PASETTO FADANNI

Estudo do efeito da combinação de fármacos anti-citocina na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos: *insights* para o tratamento farmacológico da SDRA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

FLORIANÓPOLIS

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fadanni, Guilherme Pasetto

Estudo do efeito da combinação de fármacos anti-citocina na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos : insights para o tratamento farmacológico da SDRA / Guilherme Pasetto Fadanni ; orientador, João Batista Calixto, 2023.

186 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Lesão pulmonar aguda. 3. SDRA. 4. Citocinas. 5. Imunofarmacologia. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Guilherme Pasetto Fadanni

Estudo do efeito da combinação de fármacos anti-citocina na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos: *insights* para o tratamento farmacológico da SDRA

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 11 de outubro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marco Aurélio Martins, Dr.

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. André Báfica, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Farina, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Prof. João Batista Calixto, Dr.

Orientador

FLORIANÓPOLIS

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram do caminho sinuoso e acidentado do doutoramento uma experiência produtiva. Sem o suporte de tantas pessoas, isso não teria sido possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meu orientador, João Batista Calixto, pela orientação sábia, paciente e entusiástica, e por me receber no Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP) como doutorando. Sou extremamente grato pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa singular e em um ambiente singular que, para muito além dos limites da minha tese, me fizeram evoluir como empreendedor e como cientista. Cito aqui, e reitero, a frase de Isaac Newton: *“if I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants”* (se eu vi mais longe, foi por estar nos ombros de gigantes). Aproveito também para agradecer aos colaboradores do CIEnP, atuais ou anteriores, que contribuíram para a realização do meu trabalho. Em especial, destaco o Dr. Sérgio Macedo Júnior, a Dra. Priscila Zimath, a Dra. Sara Tolouei, e a Dra. Melina Heller por terem sido essenciais na realização de experimentos desta tese.

Aos meus pais e irmão, expresso minha sincera gratidão pelo amor, apoio e dedicação incondicionais. Do início da graduação, há quase 12 anos, ao fim do doutorado, cada uma das minhas vitórias tem também o nome deles. Esta é mais uma, e por isso, dedico este trabalho à minha família. Para Eduarda, minha namorada, expresso um igual e sonoro agradecimento. Sua paciência, apoio e cumplicidade foram muito importantes, e sou privilegiado por tê-la em minha vida durante todo esse tempo.

Agradeço, por fim, aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, à Universidade, à CAPES, ao CNPq, e a todos os outros que não foram mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Science is more than a body of knowledge.
It is a way of thinking, a way of skeptically
interrogating the universe with a fine
understanding of human fallibility”.*

(Carl Sagan, 1990)

RESUMO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é um estado de lesão pulmonar aguda (LPA) grave definido por início rápido, edema bilateral difuso e hipoxemia. Apesar de décadas de esforços, a taxa de mortalidade permanece elevada e não há, até o momento, um tratamento farmacológico definido. As evidências atuais sustentam um papel crítico da inflamação excessiva na LPA/SDRA, fazendo com que diversas citocinas e suas respectivas vias de sinalização sejam consideradas potenciais alvos terapêuticos. Contudo, devido à complexidade da síndrome, ensaios clínicos recentes apontam para a necessidade de combinação de fármacos e do uso de prescrição guiada por biomarcadores para que haja benefício clínico. Neste estudo, três combinações de fármacos anti-citocina foram comparadas com as respectivas monoterapias quanto à eficácia em um modelo experimental de LPA/SDRA induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos. Para isso, foi utilizada a instilação intratraqueal de LPS em camundongos da linhagem CD-1 seguido da avaliação de alterações inflamatórias, hematológicas, fisiológicas e funcionais relevantes à triagem de fármacos na LPA. Primeiro, uma ampla caracterização do modelo foi realizada de modo a demonstrar efeitos tempo- (6, 24, 48 e 72 horas), dose- (7,5, 1,5, 0,75 e 0,3 x 10⁶ EU/kg) e sexo-dependentes e o perfil hiperinflamatório da LPA induzida por LPS. Esses resultados também guiaram a definição de dose do LPS (3,0 x 10⁶ EU/kg), do tempo até a avaliação (três dias) e do sexo dos camundongos (machos) para os experimentos subsequentes. Na sequência, realizou-se um ensaio de farmacocinética seguido de uma prova de conceito, onde foi revelado que a adição do inibidor de Janus quinase (JAK) baricitinibe (10 mg/kg, v.o.) ao tratamento com o corticosteroide dexametasona (10 mg/kg, i.p.) aumenta consideravelmente a eficácia da intervenção. Isso inclui a redução ou abolição completa de aspectos da inflamação e consolidação pulmonar, mecânica respiratória disfuncional, expressão gênica pró-inflamatória e liberação de citocinas nos alvéolos. A partir desses resultados, outras duas combinações foram também avaliadas. Inicialmente, foi demonstrado que a neutralização simultânea de TNF e de IFN- γ com anticorpos monoclonais (500 μ g cada por camundongo) apresentou eficácia comparável à combinação de dexametasona e baricitinibe, sendo mais eficaz que a neutralização individual e uma alternativa promissora aos imunossuppressores não-seletivos. Depois, revelou-se que a combinação de dinaciclibe (inibidor de quinases dependentes de ciclina; 2,5 mg/kg, i.p.) e MCC950 (inibidor do inflamassoma NLRP3; 10 mg/kg, v.o.) também foi mais eficaz do que as monoterapias e resultou em ampla redução dos prejuízos, indicando que existem múltiplos alvos terapêuticos pelos quais combinações de fármacos podem resultar em melhor desfecho na LPA. Deste modo, conclui-se que combinações de fármacos anti-citocina reduzem a inflamação e alterações hematológicas, fisiológicas e funcionais de maneira superior às monoterapias na LPA induzida por LPS em camundongos. Estes achados apoiam de maneira enfática a continuidade das investigações da terapia combinada anti-citocina em cenários de hiperinflamação e LPA, e sugerem que no futuro diferentes combinações de fármacos poderiam ser aliadas à seleção de pacientes guiada por biomarcadores para um tratamento individualizado efetivo da SDRA.

Palavras-chave: SDRA; terapia combinada; inflamação; insuficiência respiratória.

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a state of severe acute lung injury (ALI) defined by rapid onset, bilateral diffuse edema and hypoxemia. Despite decades of efforts, mortality rate remains high and there is no defined pharmacological treatment. Current evidence supports a critical role for excessive inflammation in ALI/ARDS, resulting in several cytokines and their signaling pathways being putative therapeutic targets. However, due to the complexity of the syndrome, recent clinical trials point to the necessity of combination therapy and use of biomarker-guided prescription to achieve clinical benefit. In this study, the efficacy of three combinations of anti-cytokine drugs were evaluated and compared to their respective monotherapies in a model of ALI/ARDS induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice. To this end, LPS was instilled intratracheally in male mice from the CD-1 strain followed by assessment of inflammatory, hematologic, physiologic and functional alterations that are relevant to drug screening in ALI. First, a broad characterization of the model was carried out to demonstrate time- (6, 24, 48 and 72 hours), dose- (7.5, 1.5, 0.75 e 0.3 x 10⁶ EU/kg) and sex-dependent effects and the hyperinflammatory profile of LPS-induced ALI. These results also led to the informed selection of the dose of LPS (3,0 x 10⁶ EU/kg), time until assessment (three days), and sex of mice (males) for further experiments. Then, a study of pharmacokinetics was followed by a proof-of-concept test, through which was revealed that adding the Janus kinase (JAK) inhibitor baricitinib (10 mg/kg, p.o.) to treatment with the corticosteroid dexamethasone (10 mg/kg, i.p.) considerably increases the efficacy of the intervention. This includes reducing or completely abrogating aspects of pulmonary inflammation and consolidation, dysfunctional respiratory mechanics, pro-inflammatory gene expression and cytokine release into the alveolus. Based on these results, two additional drug combinations were also evaluated. Initially, it was demonstrated that simultaneous neutralization of TNF and IFN- γ with monoclonal antibodies (500 μ g each per mice) resulted in an efficacy that is comparable to that of the combination of dexamethasone and baricitinib, being more efficacious than individual neutralization and a promising alternative to non-selective immunosuppressors. Then, it was revealed that combining dinaciclib (cyclin-dependent kinase inhibitor; 2.5 mg/kg i.p.) and MCC950 (NLRP3 inflammasome inhibitor; 10 mg/kg, p.o.) was also more effective than the monotherapies and results in broad reduction of impairment, indicating that there are multiple therapeutic targets through which drug combinations may result in better outcome in ALI. Therefore, we conclude that combinations of anti-cytokine drugs are superior to monotherapies in reducing inflammation and hematologic, physiologic and functional changes in LPS-induced ALI in mice. This findings emphatically support further investigation into combined anti-cytokine therapy in settings of hyperinflammation and ALI, and suggests that in the future different drug combinations could be coupled to biomarker-guided selection of patients for effective individualized treatment of ARDS.

Keywords: ARDS; combination therapy; inflammation; respiratory failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema respiratório humano.....	19
Figura 2. Etiologias da SDRA.....	21
Figura 3. Lesão alveolar aguda na SDRA.	25
Figura 4. Manejo clínico da SDRA e potenciais práticas associadas.	29
Figura 5. Modelo teórico das oportunidades de intervenção terapêutica na SDRA..	32
Figura 6. Estrutura e ativação do inflamassoma NLRP3.	36
Figura 7. Sinalização por IFN- γ	46
Figura 8. Sinalização pela via JAK-STAT.....	48
Figura 9. Mecanismos de ação do receptor de glicocorticoide.....	50
Figura 10. Visão geral do tratamento anti-citocina para a LPA/SDRA de acordo com as evidências atuais.	60
Figura 11. Vias de sinalização celular pró-inflamatória induzidas por LPS.	64
Figura 12. Procedimento de instilação intratraqueal de LPS (método transtraqueal) utilizado na indução do modelo de LPA.	72
Figura 13. Análise histopatológica por imagem.....	75
Figura 14. Método de avaliação da mecânica respiratória.	77
Figura 15. Delineamento do primeiro bloco experimental.	84
Figura 16. Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em machos.	86
Figura 17. Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em fêmeas.	88
Figura 18. Perfil tempo-resposta das alterações histopatológicas nos pulmões.	89
Figura 19. Liberação de citocinas no espaço broncoalveolar na fase inicial da LPA.	91
Figura 20. Alterações de mecânica respiratória basal.....	94
Figura 21. Delineamento do segundo experimental.	95
Figura 22. Perfil dose-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica.....	98
Figura 23. Perfil dose-resposta das alterações de mecânica respiratória basal.....	101
Figura 24. Delineamento do terceiro bloco experimental	102

Figura 25. Avaliação da farmacocinética da dexametasona e baricitinibe após coadministração	103
Figura 26. Delineamento do quarto bloco experimental.	104
Figura 27. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica.	108
Figura 28. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a mecânica respiratória.	111
Figura 29. Efeitos do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar	113
Figura 30. Delineamento do quinto bloco experimental.....	114
Figura 31. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a expressão pulmonar relativa de oito genes de interesse.....	116
Figura 32. Delineamento do sexto bloco experimental.....	118
Figura 33. Efeitos do tratamento com controle isotópico sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica	119
Figura 34. Delineamento do sétimo bloco experimental.....	120
Figura 35. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica.....	123
Figura 36. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a mecânica respiratória.	125
Figura 37. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar..	127
Figura 38. Delineamento do oitavo bloco experimental.....	128
Figura 39. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica.	130
Figura 40. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a mecânica respiratória.	133
Figura 41. Efeitos do cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar.....	135

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação entre os mecanismos patogênicos, as consequências fisiológicas e as manifestações clínicas na SDRA.	26
Quadro 2. Critérios da Definição de Berlim para diagnóstico da SDRA	27
Quadro 3. Recomendações de diretriz de prática clínica para a ventilação mecânica em adultos com SDRA.	30
Quadro 4. Compilado de insucessos em estudos clínicos destinados à investigação do potencial terapêutico de farmacoterapias na SDRA.	31
Quadro 5. Seleção de imunomoduladores com potencial terapêutico na hipercitocinemia associada à SDRA.....	35
Quadro 6. Ensaio clínico em andamento voltados à combinação de drogas anti-citocina para o tratamento da LPA/SDRA.	53
Quadro 7. Comparação do trato respiratório de humanos e camundongos.	61
Quadro 8. Condições instrumentais dos espectrômetros de massas e os parâmetros da cela de colisão.....	78
Quadro 9. Composição da fase móvel e gradiente dos métodos analíticos desenvolvidos.....	79
Quadro 10. Configuração dos ciclos da reação de RT-qPCR	81
Quadro 11. Resumo dos blocos experimentais.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina trifosfato
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
CARD	domínio de recrutamento e ativação de caspase
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL7	<i>C-C motif chemokine ligand 7</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CRP	proteína C-reativa
CRS	síndrome de liberação de citocinas
CXCR1	<i>C-X-C motif chemokine receptor 1</i>
CXCR2	<i>C-X-C motif chemokine receptor 2</i>
DAMP	padrões moleculares associados a dano
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
ECMO	oxigenação por membrana extracorpórea
ECRs	estudos controlados e randomizados
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FLBA	fluido de lavado broncoalveolar
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GM-CSFR	receptor do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
gp130	glicoproteína 130
GR	receptor de glicocorticoide
GSDMD	gasdermina D
GSDMD^{Nterm}	porção N-terminal da gasdermina D
HAdV	adenovírus humano
HLH	linfocitose hemofagocítica
IAV/H1N1	vírus influenza A subtipo H1N1
IAV/H3N2	vírus influenza A subtipo H3N2

IFN-γ	interferon gama
IFN-γR	receptor de interferon gama
IL-1α	interleucina 1 alfa
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-1R	receptor de interleucina 1
IL-3	interleucina 3
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-6R	receptor de interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	interleucina 17
IL-17RA	receptor A de interleucina 17
IL-18	interleucina 18
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JAK	Janus quinase
LDH	lactato desidrogenase
LPA	lesão pulmonar aguda
LPiV	lesão pulmonar induzida por ventilação
LPS	lipopolissacarídeo
mAb	anticorpo monoclonal
NEK7	<i>NIMA-related kinase 7</i>
NEWS2	<i>National Early Warning Score 2</i>
NF-κB	fator nuclear kappa B
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
NO	óxido nítrico
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PaO₂/FiO₂	razão entre pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e fração inspirada de oxigênio
PEEP	pressão expiratória final positiva
PRR	receptor de reconhecimento de padrão
PYD	domínio pirina

rhIL-1Ra	antagonista recombinante do receptor de interleucina 1 humano
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
sIL-6R	receptor solúvel de interleucina 6
SoC	padrão de cuidado
SpO2	saturação de oxigênio
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
sTNFR1	receptor 1 solúvel do fator de necrose tumoral
suPAR	receptor solúvel do ativador de plasminogênio tipo uroquinase
TLR	receptor do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR1	receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNFR2	receptor 2 do fator de necrose tumoral
UTI	unidade de tratamento intensivo
VFD	dias livre de ventilação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO	19
1.1.1. Etiologia	20
1.1.2. Epidemiologia	23
1.1.3. Fisiopatologia	24
1.1.4. Diagnóstico	27
1.1.5. Manejo clínico	28
1.1.6. A busca por um tratamento farmacológico	31
1.2. AVANÇOS RECENTES E PERSPECTIVAS DA TERAPIA ANTI-CITOCINA NA LESÃO PULMONAR AGUDA: UMA REVISÃO DE LITERATURA	33
1.2.1. Introdução	33
1.2.2. Citocinas como alvos terapêuticos na LPA e SDRA	34
1.2.2.1. Inibição da sinalização por IL-1 e o inflamassoma NLRP3	35
1.2.2.2. Inibição da sinalização por IL-6	37
1.2.2.3. Inibição da sinalização por IL-8 e CXCR1/2	39
1.2.2.4. Inibição da sinalização por IL-17	41
1.2.2.5. Inibição da sinalização por GM-CSF	42
1.2.2.6. Inibição da sinalização por TNF	43
1.2.2.7. Inibição da sinalização por IFN- γ	45
1.2.2.8. Inibição da via de sinalização JAK-STAT	47
1.2.2.9. Uso de corticosteroides	49
1.2.3. O potencial da combinação de drogas anti-citocina	51
1.2.3.1. Evidências a partir de estudos observacionais e ensaios clínicos ...	52
1.2.3.2. <i>Insights</i> de estudos experimentais	57
1.2.4. Conclusões e perspectivas	59
1.3. MODELAGEM EXPERIMENTAL DA LPA/SDRA EM CAMUNDONGOS ...	61
1.3.1. Estratégias e validade translacional	61
1.3.2. Modelo experimental de LPA induzido por LPS	62
1.3.2.1. Mecanismos de reconhecimento e resposta ao LPS	63
1.3.2.2. Visão geral e aspectos práticos.....	65
1.4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	65

1.5.	HIPÓTESE.....	66
1.6.	OBJETIVOS.....	66
1.6.1.	Objetivo geral.....	66
1.6.2.	Objetivos específicos.....	67
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1.	ANIMAIS E PROCEDIMENTOS GERAIS.....	69
2.2.	RANDOMIZAÇÃO, CEGAMENTO E BOAS PRÁTICAS CIENTÍFICAS.....	69
2.3.	BEM-ESTAR ANIMAL E PONTO FINAL HUMANITÁRIO.....	70
2.4.	MODELO EXPERIMENTAL DE LPA INDUZIDO POR LPS.....	71
2.5.	DROGAS E TRATAMENTOS.....	72
2.6.	LAVADO BRONCOALVEOLAR E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	73
2.7.	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NO FLBA.....	74
2.8.	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO FLBA.....	74
2.9.	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	74
2.10.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES.....	75
2.11.	ANÁLISE DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	75
2.12.	ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA.....	77
2.12.1.	Quantificação de dexametasona e baricitinibe por LC-MS/MS.....	77
2.12.2.	Extração dos compostos em amostras de plasma.....	79
2.12.3.	Extração dos compostos em amostras de tecido pulmonar.....	80
2.13.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PULMONAR.....	80
2.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA E TAMANHO AMOSTRAL.....	82
2.15.	DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	83
3.	RESULTADOS.....	84
3.1.	PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	84
3.1.1.	Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos e fêmeas submetidos à instilação intratraqueal de LPS.....	85
3.1.2.	Liberção de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas após 6 horas da instilação intratraqueal de LPS.....	90
3.1.3.	Alterações de mecânica respiratória basal em camundongos machos e fêmeas após 72 horas da instilação intratraqueal de LPS.....	92

3.2.	SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL	95
3.2.1.	Perfil dose-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	96
3.2.2.	Perfil dose-resposta das alterações de mecânica respiratória basal em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	98
3.3.	TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	102
3.3.1.	Estudo simplificado da farmacocinética do cotratamento com dexametasona e baricitinibe.....	102
3.4.	QUARTO BLOCO EXPERIMENTAL	104
3.4.1.	Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	105
3.4.2.	Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	109
3.4.3.	Efeitos do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	112
3.5.	QUINTO BLOCO EXPERIMENTAL	113
3.5.1.	Efeitos da monoterapia ou cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a expressão pulmonar de oito genes de interesse em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS....	114
3.6.	SEXTO BLOCO EXPERIMENTAL	117
3.6.1.	Efeitos do tratamento com controle isotópico sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS.....	118
3.7.	SÉTIMO BLOCO EXPERIMENTAL.....	119

3.7.1. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS.....	120
3.7.2. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	124
3.7.3. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS.....	126
3.8. OITAVO BLOCO EXPERIMENTAL.....	127
3.8.1. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS.....	128
3.8.2. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	130
3.8.3. Efeitos do cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS	134
4. DISCUSSÃO	136
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE LPA PARA O ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS ANTI-CITOCINA	136
4.2. EFICÁCIA DAS COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS ANTI-CITOCINA NA LPA INDUZIDA POR LPS E A FARMACOLOGIA TRANSLACIONAL	143
5. CONCLUSÕES	155
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
7. DO PROGRAMA DE DOUTORADO ACADÊMICO PARA INOVAÇÃO	157
REFERÊNCIAS.....	158
ANEXO	186

1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

O sistema respiratório é o conjunto de estruturas responsável pela condução do ar inalado até os pulmões e a troca de O_2 e CO_2 entre os alvéolos pulmonares e a circulação sanguínea. Em humanos, esse sistema é dividido em trato respiratório superior, constituído pela cavidade nasal, faringe e laringe, e o trato respiratório inferior, formado pela traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos (**Figura 1**).

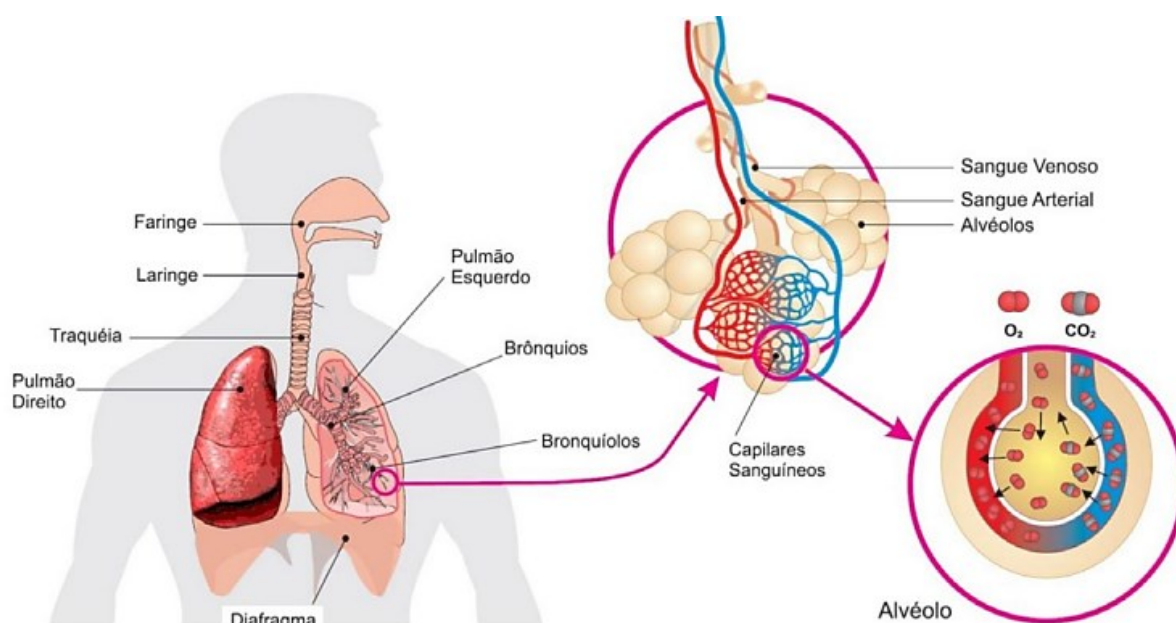


Figura 1. Sistema respiratório humano. Fonte: adaptado de Silva et al. (2017).

Pela natureza de sua função, o trato respiratório inferior é uma estrutura bastante delicada e a preservação de suas características é essencial à vida. Ao mesmo tempo em que paredes alveolares extremamente finas e vascularizadas são necessárias para a troca gasosa eficiente, o tecido precisa ser complacente e elástico o suficiente para permitir grandes variações de volume que promovem o fluxo de ar. Ainda, os pulmões precisam lidar com a exposição constante a partículas e patógenos carregados pelo ar inalado, cujo volume ultrapassa 10.000 litros por dia em humanos (Riches & Martin, 2018). Desse modo, tal exposição e vulnerabilidade faz dos pulmões um órgão susceptível a uma variedade de doenças, particularmente em ambientes com aglomerações de pessoas, pobreza, exposições ambientais e condições inadequadas de habitação e de cuidado à saúde (FIRS, 2021).

Enquanto a maioria dos estímulos nocivos ao sistema respiratório é naturalmente e prontamente resolvida pelo sistema imune, por vezes, lesões pulmonares causadas por infecção, inflamação e/ou outros estímulos agudos podem ultrapassar a capacidade do órgão em manter sua homeostase. Nesses casos, sintomas comuns e inicialmente brandos dão lugar a complicações graves, podendo evoluir a um quadro de disfunção respiratória chamada Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).

1.1.1. Etiologia

A SDRA é uma síndrome respiratória heterogênea caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema bilateral difuso no tecido pulmonar e hipoxemia (ARDS Definition Task Force, 2012). Tipicamente, o desenvolvimento da SDRA acontece em ambiente hospitalar a partir de quadro não-resolvido de pneumonia ou sepse extrapulmonar, mas pode também derivar de causas menos frequentes como aspiração de conteúdo gástrico, trauma, overdose de drogas, transfusão de sangue, afogamento, pancreatite, entre outras. Embora a pneumonia seja o fator de risco inicial mais comum à SDRA, a grande maioria dos pacientes também apresenta sepse durante a evolução do quadro (Matthay et al., 2020; **Figura 2**).

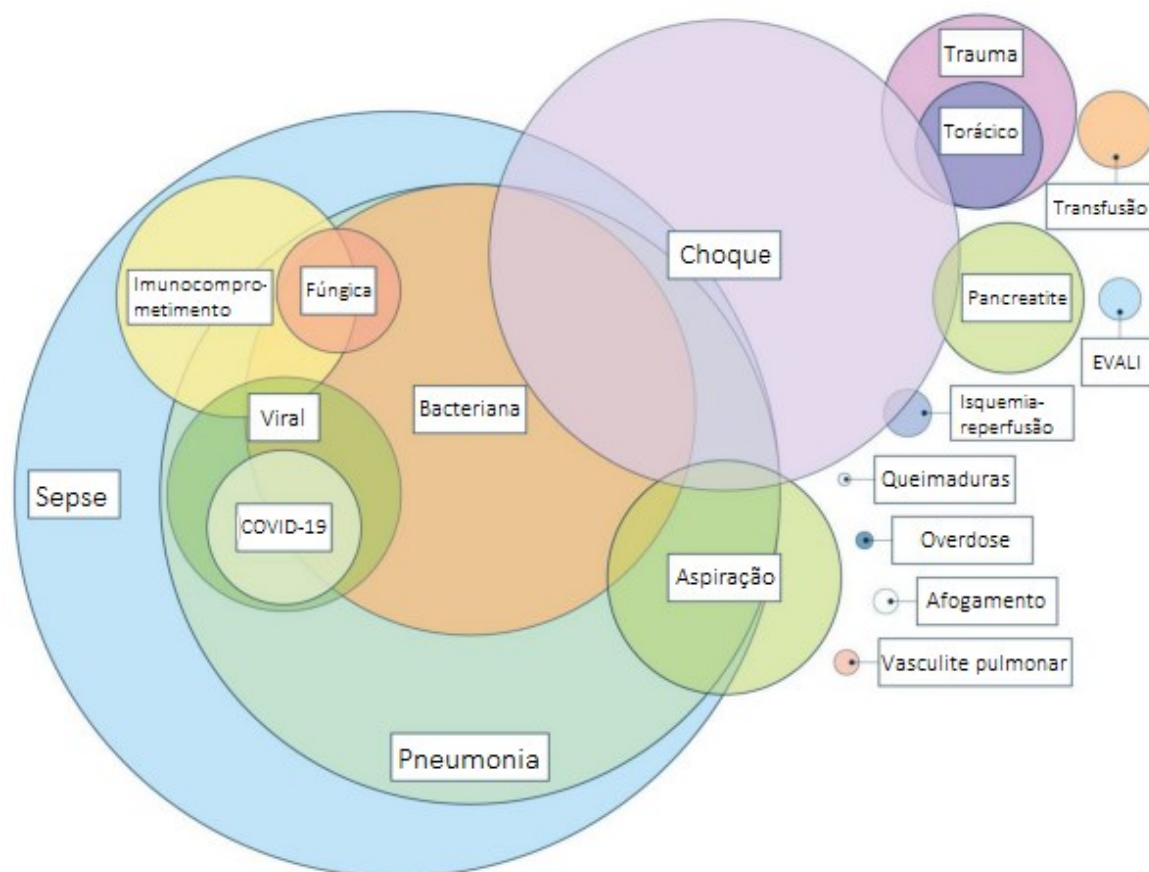


Figura 2. Etiologias da SDRA. O tamanho dos círculos representa uma aproximação da frequência relativa de cada condição (o círculo que corresponde à COVID-19 pode estar sujeito a imprecisão). EVALI = lesão pulmonar associada ao uso de produtos de cigarro eletrônico ou *vaping*. Fonte: adaptado de Matthay et al. (2020).

No que diz respeito às infecções respiratórias, mais de 40 patógenos ou grupos de patógenos estão associados à SDRA (Matthay et al., 2019; 2020). Esses incluem principalmente vírus e bactérias, mas também fungos e protozoários. Dentre as bactérias, destacam-se as comumente associadas a infecções comunitárias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, além de *Mycobacterium tuberculosis*. Outras, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter* spp., são mais importantes na SDRA associada a infecções hospitalares (Matthay et al., 2019; 2020). De maneira importante, várias das bactérias supracitadas estão classificadas como prioridade em um esforço de preocupação global da Organização Mundial da Saúde (OMS) com o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos (Tacconelli et al., 2018).

Quanto aos vírus, recebem destaque o Influenza A (e.g. H1N1, H5N1, H7N9) e Influenza B, metapneumovirus humano, vírus sincicial respiratório, rinovírus, coronavírus (e.g. MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2) e adenovírus (Matthay et al., 2019; 2020). Os vírus Influenza A, por exemplo, são um grupo de patógenos causadores de epidemias sazonais que, em geral, causam infecção branda marcada por sintomas gripais (e.g. tosse, febre, coriza, dor de cabeça) e inflamação do trato respiratório superior. Apesar disso, esses vírus foram responsáveis por 291 a 645 mil mortes por ano globalmente entre 1999 e 2015 (Iuliano et al., 2018). Isso acontece porque uma parcela dos infectados progride para um quadro de pneumonia viral que, se não resolvida, causa um ciclo de auto amplificação de dano inflamatório característico do desenvolvimento de SDRA (Short et al., 2014). Dessa forma, dada a ameaça constante de novas pandemias a partir de linhagens emergentes (Harrington et al., 2021), a SDRA induzida por Influenza A é particularmente preocupante em um contexto epidemiológico.

Outro exemplo recente é o SARS-CoV-2, um vírus de RNA descoberto em 2019 e causador da COVID-19. Esse vírus faz parte da família de coronavírus da qual dois outros patógenos zoonóticos – SARS-CoV e MERS-CoV – emergiram e causaram pandemias em 2002 e 2012, respectivamente (Hu et al., 2021). Com o surgimento e a rápida distribuição do SARS-CoV-2, uma nova pandemia foi reconhecida pela OMS em março de 2020 e resultou, até setembro de 2023, em cerca de 770 milhões de casos e quase 7 milhões de mortes (OMS, 2023). Segundo a OMS, entre os sintomáticos, casos leves e moderados equivalem a 80% dos indivíduos, seguido de 15% de casos graves (que requerem suporte respiratório ou UTI) e 5% de casos críticos (Hu et al., 2021; OMS, 2021). Entre os pacientes com COVID-19 internados em UTI, a prevalência de SDRA é de 75% e sobe para 90% se considerados apenas os não-sobreviventes (Tzotzos et al., 2020). A taxa de mortalidade na UTI é tipicamente de 40 a 50%, sendo a SDRA a causa de morte em pouco menos de um terço dos casos, chegando a 95% na ausência de suporte adequado (Olivas-Martínez et al., 2021).

A sepse, outra condição intimamente associada à SDRA, tem origem na complicação de um quadro de pneumonia ou a partir de um insulto extrapulmonar. Fontes comuns da sepse extrapulmonar incluem infecções do peritônio, do trato urinário, de tecidos moles e da pele (Matthay et al., 2019; 2020). Nesses casos, a

patogênese da SDRA advém da lesão pulmonar indireta, que é a manifestação pulmonar de um estado de inflamação e disfunção endotelial generalizado e previamente estabelecido (Shaver & Bastarache, 2014).

1.1.2. Epidemiologia

Dados epidemiológicos de SDRA variam bastante ao longo dos estudos, e diversos fatores dificultam a separação das diferenças biológicas entre populações daquelas que dizem respeito ao diagnóstico e serviços de saúde (Pham & Rubenfeld, 2017). Isso foi confirmado por análise *a posteriori* do maior estudo epidemiológico internacional da SDRA em que se revelaram diferenças geoeconômicas importantes (Laffey et al., 2017). Na literatura, a incidência populacional da SDRA foi estimada entre 3,65 e 81 casos por 100.000 pessoas-ano (revisado em Pham & Rubenfeld, 2017; Rezoagli et al., 2017). Grande variação é também observada no custo econômico da SDRA, tendo sido estimado entre 8 e 547 mil dólares por paciente, com a amplitude dos gastos parcialmente explicada pela população considerada e os diferentes sistemas de saúde (Boucher et al., 2022).

De acordo com o estudo prospectivo internacional LUNG SAFE (Bellani et al., 2016), o maior em dados epidemiológicos (459 UTIs em 50 países) realizado antes da pandemia de COVID-19, pacientes com SDRA corresponderam a 10,4% de todas as admissões em UTI e 23,4% de todos os que utilizaram ventilação mecânica. Este trabalho, realizado durante o inverno, também indicou que 59,4% dos pacientes apresentaram pneumonia como fator de risco, seguido de sepse extrapulmonar (16%), aspiração (14,2%) e outros com menores frequências. A mortalidade hospitalar geral ficou em 40%, sendo 34,9% em casos de SDRA leve, 40,3% em casos moderados e 46,1% em casos graves (Bellani et al., 2016).

Em outro estudo, o qual observou atestados de óbito gerados nos EUA entre 1999 e 2013, foi revelado um decréscimo significativo de mortes relacionadas à SDRA ao longo do tempo (Cochi et al., 2016). Atualmente, uma revisão de vários estudos epidemiológicos sugere um platô da mortalidade em torno de 40% para SDRA independente da gravidade e 45% para casos moderados a graves (Rezoagli et al., 2017). Cochi et al. (2016) também mostraram maior mortalidade ajustada por idade

em homens e na população negra, embora não seja possível discernir os fatores genéticos de potenciais determinantes sociais.

No estudo retrospectivo realizado por Ketcham et al. (2020), 84% dos pacientes com SDRA apresentavam sepse nas 72 horas anteriores à morte, embora esse índice fosse de 43% no início do acompanhamento. Além da sepse, disfunção neurológica (46%), hematológica (41%), renal (37%), cardíaca (24%), hemorragia (12%) e disfunção hepática (9%) e gastrointestinal (6%) foram também observadas. No geral, 60% dos pacientes com SDRA apresentaram disfunção de múltiplos órgãos nesse mesmo período, mas somente 9% foram caracterizados com disfunção pulmonar irreversível e não-suportável (Ketcham et al., 2020). No mesmo sentido, o estudo LUNG SAFE associou maior gravidade da SDRA a um maior escore do componente não-pulmonar no SOFA (do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*), uma ferramenta para avaliar a incidência e a gravidade de disfunção de órgãos (Bellani et al., 2016). Em conjunto, essas evidências indicam que, apesar da disfunção pulmonar, a piora do quadro e a mortalidade na SDRA está fortemente associada à sepse e disfunção de múltiplos órgãos.

1.1.3. Fisiopatologia

A SDRA pode ter origem pulmonar (direta) ou extrapulmonar (indireta), e isso implica em diferenças no modo e local em que ocorre o início da lesão nos pulmões (Shaver & Bastarache, 2014). Na SDRA de origem pulmonar, a patogênese se dá nos alvéolos a partir de estímulos que direta ou indiretamente causam um insulto inflamatório e lesão epitelial (**Figura 3**). Assim, receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células epiteliais e macrófagos residentes reconhecem padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs) e/ou patógenos (PAMPs), o que leva à ativação do sistema imune e produção de quimiocinas (e.g. MCP-1/CCL2, CCL7) e citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-1 β , TNF, IL-6). Uma vez liberadas no espaço broncoalveolar, essas substâncias promovem o recrutamento e ativação de leucócitos, cujos produtos de sua atividade (e.g. espécies reativas, histonas, armadilhas extracelulares dos neutrófilos e mais citocinas) perpetuam a resposta inflamatória e causam danos ao tecido alveolar (Matthay et al., 2019; Thompson et al., 2017).

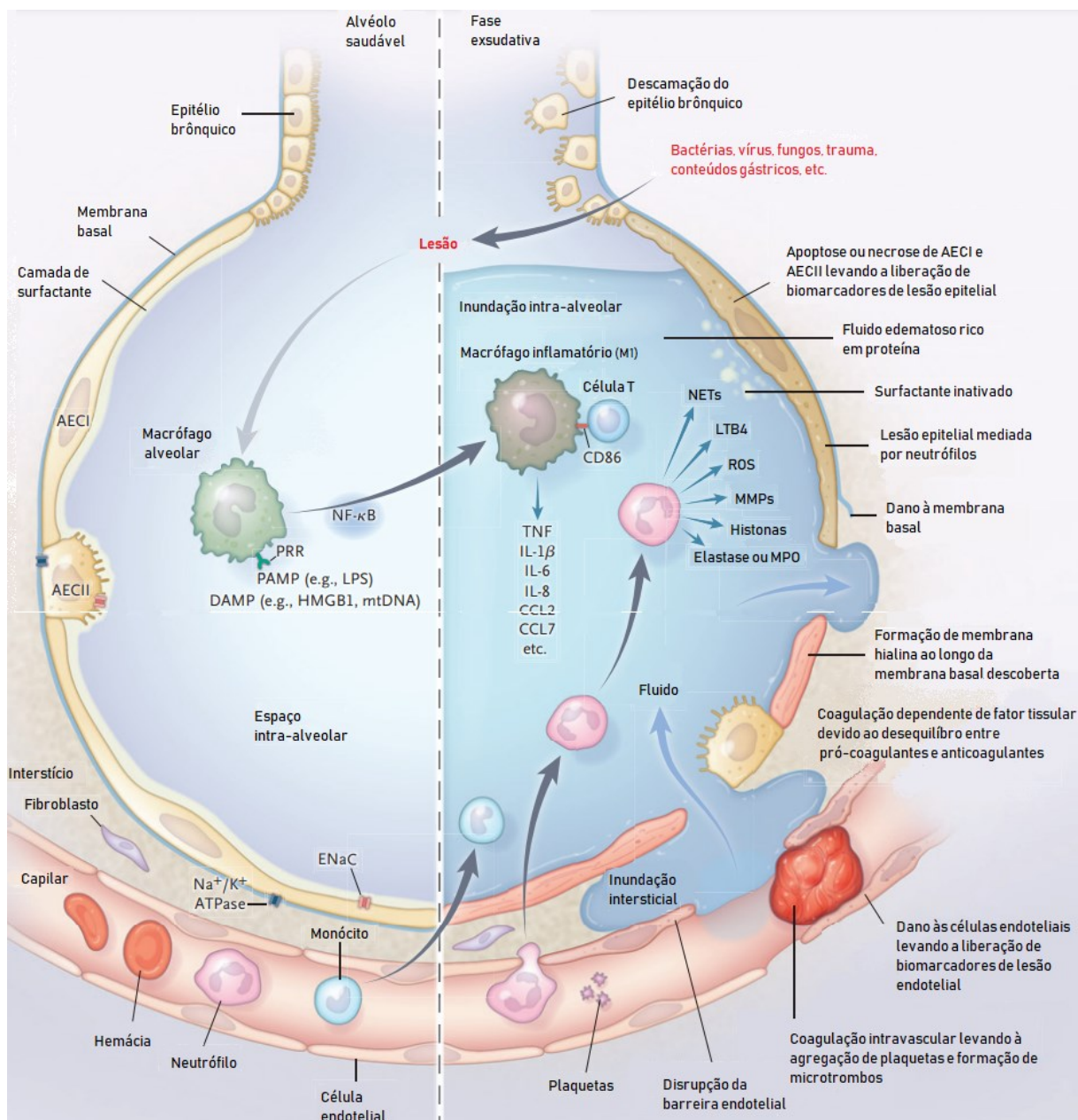


Figura 3. Lesão alveolar aguda na SDR. AECI = célula epitelial alveolar do tipo I. AECII = célula epitelial alveolar do tipo II. PRR = receptor de reconhecimento de padrão. PAMP = padrão molecular associado a patógenos. LPS = lipopolissacarídeo. DAMP = padrão molecular associado a dano. HMGB1 = proteína 1 do grupo de alta mobilidade. ENaC = canal epitelial de sódio. Na⁺/K⁺ ATPase = bomba ATPase de sódio e potássio. CD86 = grupamento de diferenciação 86. TNF = fator de necrose tumoral. IL-1 β = interleucina 1 β . IL-6 = interleucina 6. IL-8 = interleucina 8. NETs = armadilhas extracelulares de neutrófilos. LTB4 = leucotrieno B4. ROS = espécies reativas de oxigênio. MMPs = metaloproteinases de matriz. MPO = mieloperoxidase. Fonte: adaptado de Thompson et al. (2017).

À medida que a integridade das barreiras epitelial e endotelial é comprometida, o interstício e o interior do alvéolo são preenchidos com mais células e conteúdo vascular, o que causa congestão do tecido. Em paralelo, a ativação de células endoteliais favorece a formação de microtrombos através da agregação de plaquetas (Matthay et al., 2019; Thompson et al., 2017). Além disso, a lesão do epitélio também

reduz a capacidade de produção de surfactante e de remoção de fluido, o que contribui ao agravamento do quadro (Huppert et al., 2019). Então, com a formação de edema e prejuízo à hematose, desenvolve-se hipoxemia e a necessidade de suporte ventilatório (Matthay et al., 2019; Thompson et al., 2017). O **Quadro 1** ilustra a conexão entre mecanismos de patogênese e os diferentes aspectos da manifestação clínica da SDRA.

Quadro 1. Relação entre os mecanismos patogênicos, as consequências fisiológicas e as manifestações clínicas na SDRA.

Mecanismo	Consequência fisiológica	Manifestação clínica
Lesão de barreira alvéolo-capilar com formação de edema intersticial e alveolar	Redução de complacência pulmonar	Aumento do esforço respiratório
Preenchimento alveolar difuso	Desequilíbrio da relação perfusão-ventilação e <i>shunt</i>	Hipoxemia grave com opacidade radiográfica bilateral difusa
Inativação e produção reduzida de surfactante	Colapso alveolar no fim da expiração	Resposta favorável à pressão expiratória final positiva (PEEP)
Ativação endotelial e plaquetária com trombose microvascular nos pulmões, e destruição ou obstrução do leito vascular pulmonar	Aumento da ventilação do espaço morto, hipertensão arterial pulmonar	Aumento da ventilação minuto, hipercapnia, insuficiência cardíaca direita
Extravasamento de mediadores inflamatórios para a circulação sistêmica	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica	Disfunção múltipla de órgãos

Fonte: adaptado de Bos & Ware (2022).

Após os primeiros dias de inflamação aguda (fase exsudativa), o alvéolo prejudicado entra em fase proliferativa, caracterizada pela multiplicação de células e remodelação do alvéolo. Esta etapa é crítica para a recuperação de pacientes com SDRA (Matthay et al., 2019). Todavia, em alguns casos a fase proliferativa também resulta na formação de fibrose, uma resposta fortemente associada com maior dependência da ventilação mecânica e maior índice de mortalidade (revisado em Burnham et al., 2014).

Por fim, embora seja amplamente aceito que a lesão pulmonar direta e indireta diferem em algumas características clínicas, os fatores subjacentes e como eles podem ser relevantes para a intervenção terapêutica na SDRA ainda são incertos (Bos & Ware, 2022). Nesse sentido, outra maneira interessante de diferenciar os pacientes é estratificá-los por subfenótipos biológicos com base no nível de resposta

inflamatória. Essa abordagem é referida na literatura como os subfenótipos hipoinflamatório e hiperinflamatório da SDRA (Sinha et al., 2022). Resumidamente, há evidências de que o subfenótipo hiperinflamatório — aproximadamente um terço dos pacientes — apresenta mortalidade significativamente maior, níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes e resposta contrastante a intervenções farmacológicas e não farmacológicas (Calfée et al., 2014; 2018; Famous et al., 2017). Ensaio prospectivos utilizando estratégias baseadas em subfenótipos biológicos ainda não foram realizados, mas são promissores na identificação de terapias para a SDRA e de pacientes com maior probabilidade de se beneficiar (Wick et al., 2021).

1.1.4. Diagnóstico

A SDRA foi descrita pela primeira vez em 1967, a partir de 12 pacientes que desenvolveram um padrão similar de insuficiência respiratória aguda apesar de heterogeneidade de insultos primários (Ashbaugh et al., 1967). Um primeiro consenso da definição de SDRA foi estabelecido 27 anos mais tarde, em 1994 (Bernard et al., 1994), e posteriormente revisado em 2012 dando origem a uma nova definição chamada “definição de Berlim” (ARDS Definition Task Force, 2012). Posta a inexistência de um teste diagnóstico, a presença e gravidade da SDRA é determinada pelo preenchimento dos critérios desta definição (**Quadro 2**).

Quadro 2. Critérios da Definição de Berlim para diagnóstico da SDRA

Tempo	Insuficiência respiratória em 1 semana a partir de insulto clínico conhecido ou de sintomas respiratórios novos ou que se agravam
Imaginologia	Opacidade bilateral em radiografia do tórax ou tomografia computadorizada não totalmente explicada por efusões, colapso ou nódulos
Origem do edema	Insuficiência respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga hídrica. Necessita avaliação objetiva (e.g. ecocardiografia) para excluir edema hidrostático se na ausência de fator de risco
Oxigenação	Estabelecimento agudo de hipoxemia definida como $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg com $PEEP \geq 5$ cm H ₂ O - PaO_2/FiO_2 de 201-300 mmHg é SDRA leve - PaO_2/FiO_2 de 101-200 mmHg é SDRA moderada - $PaO_2/FiO_2 \leq 100$ mmHg é SDRA grave

SDRA = síndrome do desconforto respiratório agudo. PaO_2 = pressão parcial de oxigênio arterial. FiO_2 = fração inspirada de oxigênio. PEEP = pressão expiratória final positiva. Fonte: adaptado de Matthay et al. (2019) e ARDS Definition Task Force (2012).

Após admissão hospitalar, pacientes com lesão pulmonar regularmente apresentam desconforto respiratório, aumento de frequência respiratória, taquicardia e podem apresentar cianose como consequência de hipoxemia (Matthay et al., 2019). Entre os que desenvolvem a SDRA, o preenchimento dos critérios diagnósticos tende a ocorrer rapidamente após a hospitalização, em até 48 horas na maioria dos casos (Matthay et al., 2019). No estudo LUNG SAFE, por exemplo, 93% dos pacientes admitidos em UTI e que apresentaram SDRA o fizeram nas primeiras 24 horas. Porém, o reconhecimento clínico da síndrome ocorreu em apenas 60,2% do total de casos, variando de 51,3% em casos leves a 78,5% em casos graves (Bellani et al., 2016). Ainda, somente 34% dos diagnósticos ocorreram no momento do preenchimento dos critérios (Bellani et al., 2016), evidenciando que a SDRA não foi somente sub-reconhecida, mas que o diagnóstico, quando presente, aconteceu com atraso para a maioria dos pacientes. Entre os sobreviventes da SDRA, prejuízos físicos e mentais podem ser observados por muitos anos adiante (revisado em Mart & Ware, 2020).

1.1.5. Manejo clínico

Embora a pesquisa ao longo dos anos tenha promovido avanço expressivo em terapias de suporte, o desenvolvimento de farmacoterapias específicas para o tratamento da SDRA não obteve sucesso (Matthay et al., 2017). Logo, o manejo clínico permanece focado em suporte ventilatório e hemodinâmico, no tratamento de infecções e em práticas gerais de manutenção da saúde (**Figura 4**; Fan, Brodie & Slutsky, 2018, Matthay et al., 2019).

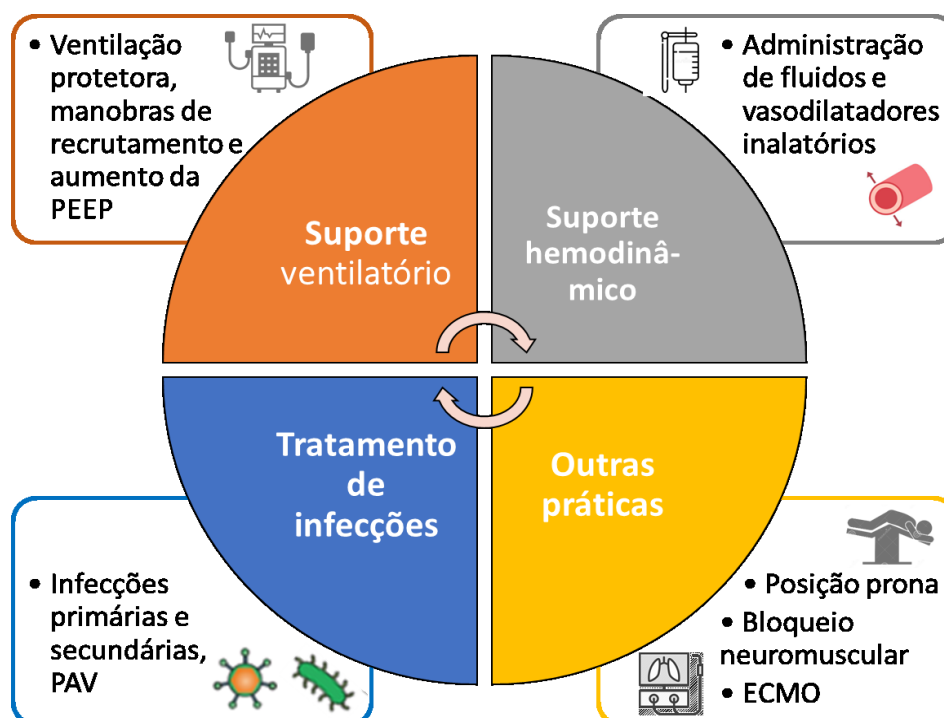


Figura 4. Manejo clínico da SDRA e potenciais práticas associadas. PEEP = pressão expiratória final positiva. PAV = pneumonia associada à ventilação. ECMO = oxigenação por membrana extracorpórea. Fonte: produzido pelo autor.

Consideradas as condições de hipoxemia e estabilidade hemodinâmica, um paciente com SDRA leve pode ser submetido à ventilação mecânica não-invasiva através de ferramentas como cânula nasal, máscara facial ou capacete. Já em casos moderados a graves, em especial, se torna necessário o método de ventilação invasiva (i.e., intubação). Embora o suporte ventilatório seja crítico para a sobrevivência do indivíduo com SDRA, o esforço biomecânico aplicado ao tecido durante os ciclos da ventilação pode causar ou agravar a lesão pulmonar, além de contribuir para a disfunção de órgãos e mortalidade (Beitler, Malhotra & Thompson, 2016; Fan, Brodie & Slutsky, 2018). Esse fenômeno foi definido como lesão pulmonar induzida por ventilador (LPIV) e levou à adoção de práticas conhecidas como “ventilação protetora”. Em 2017, com o objetivo de mitigar a LPIV, sociedades médicas da área publicaram conjuntamente um documento com diretrizes para a prática clínica da ventilação mecânica em adultos com SDRA (Fan et al., 2017). O **Quadro 3** resume essas recomendações.

Quadro 3. Recomendações de diretriz de prática clínica para a ventilação mecânica em adultos com SDRA.

Intervenção	Gravidade da SDRA	Recomendação
Ventilação mecânica com volumes correntes e pressões inspiratórias baixos	Todas	Forte recomendação <i>a favor</i> do uso de estratégias que limitam o volume corrente (4-8 ml/kg de peso corporal predito) e pressão inspiratória (pressão de platô < 30 cmH ₂ O)
Posição prona	Grave	Forte recomendação <i>a favor</i> do uso de posição prona por mais de 12 horas/dia em pacientes com SDRA grave
Ventilação oscilatória de alta-frequência	Moderada ou grave	Forte recomendação <i>contra</i> o uso rotineiro de ventilação oscilatória de alta-frequência em pacientes com SDRA moderada ou grave
Pressão positiva expiratória final (PEEP) mais alta	Moderada ou grave	Recomendação condicional <i>a favor</i> do uso de PEEP mais alta
Manobras de recrutamento	Moderada ou grave	Recomendação condicional <i>a favor</i> do uso de manobras de recrutamento
Oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) venovenosa	Grave	Sem recomendação devido a evidência insuficiente.

SDRA = síndrome do desconforto respiratório agudo. Fonte: traduzido de Fan et al. (2017).

Embora seja assunto de uma atualização futura da diretriz, o uso de sedativos e bloqueadores neuromusculares também podem beneficiar pacientes em uso de ventilação mecânica. Essa é uma intervenção farmacológica complementar cujo objetivo é reduzir o risco de LPIV e de lesão autoinfligida pelo esforço respiratório espontâneo. Nesse sentido, uma meta-análise recente mostra redução de LPIV e de mortalidade (21-28 dias, mas não em 90 dias) em pacientes com SDRA moderada a grave sob uso de bloqueadores neuromusculares (Torbic et al., 2021). Além destes, outro risco importante do suporte ventilatório é a pneumonia associada à ventilação (PAV), definida como uma infecção adquirida após pelo menos 48 horas de ventilação mecânica. A PAV ocorre em 5 a 40% dos pacientes com SDRA ventilados e está fortemente ligada à intubação endotraqueal. Sendo um potencial agravante do quadro clínico, a PAV demanda um processo coordenado de diagnóstico, escolha do tratamento e evasão de resistência microbiana (Papazian, Klomp & Luyt, 2020).

Uma das principais características da SDRA é o aumento da permeabilidade vascular e conseqüente formação de edema pulmonar. Por essa razão, maior pressão hidrostática vascular causada pela infusão de fluido tem o potencial de favorecer a formação de edema. Por outro lado, a administração de fluido também é importante para o aumento do débito cardíaco e oxigenação dos tecidos (Vignon et al., 2020).

Assim, esse dilema levou ao estudo de diferentes estratégias de administração de fluido, em geral definidas como “conservadoras” ou “liberais”. Em uma meta-análise, o uso de estratégias conservadoras aumentou o número de dias livre de ventilação e reduziu o tempo de permanência na UTI, mas não houve impacto sobre a mortalidade (Silversides et al., 2017). Por isso, embora algum nível de benefício tenha sido encontrado, há ainda incertezas sobre a estratégia conservadora. No mais, outras estratégias no tratamento da SDRA incluem o uso de vasodilatadores inalatórios e a oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) (Matthay et al., 2019).

1.1.6. A busca por um tratamento farmacológico

Ao longo de décadas de pesquisa, estudos clínicos para testar potenciais tratamentos para a SDRA acumularam muitos insucessos, incluindo-se anti-inflamatórios e anticoagulantes, estatinas, surfactante, antioxidantes e outros (**Quadro 4**).

Quadro 4. Compilado de insucessos em estudos clínicos destinados à investigação do potencial terapêutico de farmacoterapias na SDRA.

Intervenção	Potencial mecanismo
Ácido graxos Omega-3	Anti-inflamatório
Anticorpos anti-endotoxina	Liga-se à endotoxina e reduz a resposta inflamatória
Aspirina	Anti-inflamatório via efeito antiplaquetário
β-agonistas	Melhora na depuração de fluido alveolar
Cetoconazol	Anti-inflamatório
Estatinas (e.g. sinvastatina, rosuvastatina)	Anti-inflamatório, estabilização endotelial
Fator de crescimento de queratinócitos	Promoção de reparo epitelial
Ibuprofeno	Anti-inflamatório via inibição de ciclooxigenase
Interferon β-1a	Melhora na função da barreira endotelial pulmonar
Inibidor da elastase de neutrófilos (e.g. sivelestat)	Anti-inflamatório
Lisofilina	Anti-inflamatório
Óxido nítrico (inalado)	Vasodilatação pulmonar, melhora no desequilíbrio da razão ventilação-perfusão
Proteína C ativada	Anticoagulante, anti-inflamatório
Procisteína e N-acetilcisteína	Redução da lesão oxidativa via restauração de glutatona
Prostaglandina E1	Vasodilatação pulmonar, melhora no desequilíbrio da razão ventilação-perfusão
Surfactante	Promoção de reparo epitelial, redução de atelectrauma

Fonte: adaptado de Meyer et al. (2022).

Apesar de alguns avanços recentes, principalmente no contexto da SDRA associada à COVID-19, ainda não há um tratamento definido. Atualmente, as oportunidades de prevenção ou tratamento podem ser divididas em ao menos dois tipos: aquelas direcionadas ao insulto primário como, por exemplo, uma infecção por um patógeno, ou as direcionadas às consequências desse insulto, como a resposta imune desregulada, hipercoagulação, e a disfunção pulmonar (**Figura 5**).

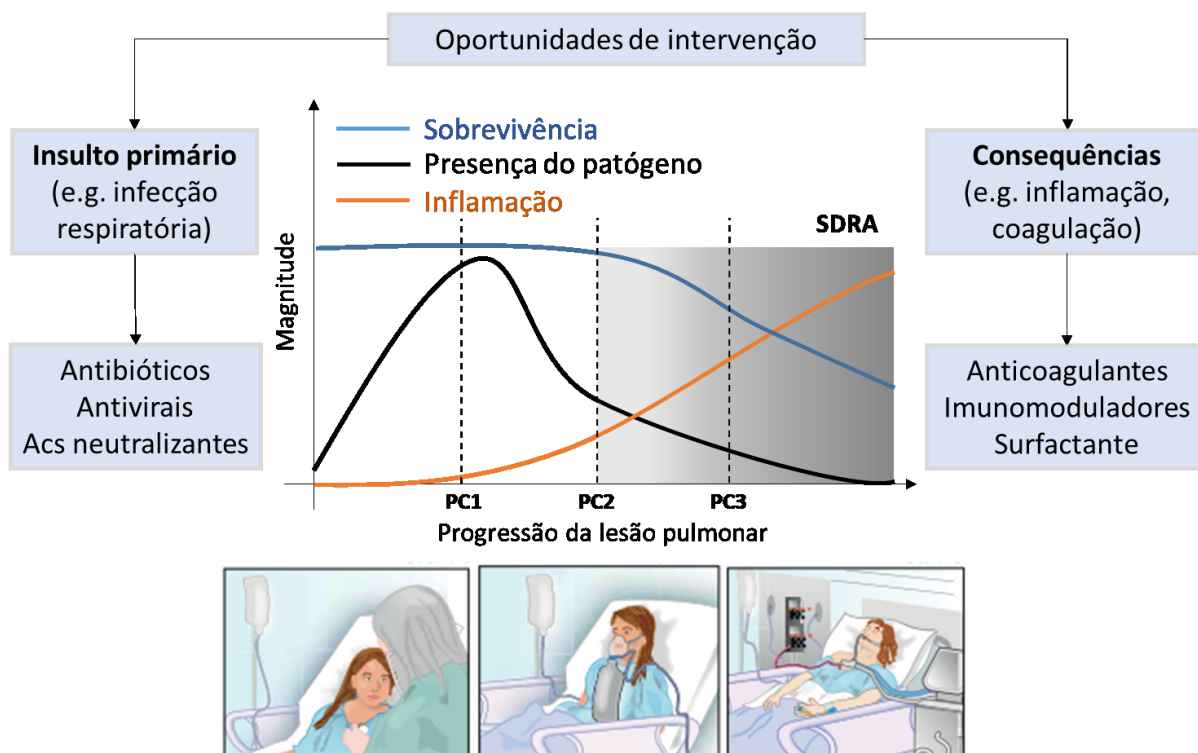


Figura 5. Modelo teórico das oportunidades de intervenção terapêutica na SDRA. Foi considerada a progressão da lesão pulmonar e o perfil temporal da presença de um patógeno, da inflamação e da sobrevivência do paciente. Acs = anticorpos. PC1 = ponto crítico 1, relativo ao atendimento hospitalar inicial. PC2 = ponto crítico 2, relativo ao uso de suporte ventilatório não-invasivo. PC3 = ponto crítico 3, relativo ao uso de suporte ventilatório invasivo. Ilustrações de paciente retiradas de Matthay et al. (2017). Fonte: produzido pelo autor.

Nos casos de pneumonia viral ou bacteriana, farmacoterapias direcionadas ao patógeno como anticorpos, antibióticos ou antivirais são ferramentas importantes para evitar o desenvolvimento de SDRA. Contudo, esses tratamentos têm seu maior benefício quando administrados na fase inicial da infecção, o que requer acesso a diagnóstico rápido e específico, e deixam descobertos os pacientes que já desenvolveram lesão pulmonar (Cohen et al., 2021). Ademais, somente uma fração dos pacientes com SDRA associada a pneumonia têm o patógeno identificado (Kao et al., 2017). Diante dessas limitações, grande parte da pesquisa clínica com SDRA

é direcionada a intervenções que visam mitigar as alterações fisiopatológicas secundárias ao insulto inicial. Essas intervenções incluem entre outros fármacos os imunomoduladores como corticosteroides, anticorpos neutralizantes e demais drogas anti-citocina, e tem por escopo um grupo maior de pacientes, incluindo-se aqueles com SDRA de diferentes etiologias, em estágios mais avançados ou com acesso limitado a identificação de patógenos. A contrapartida, como esperado, é que a intervenção em alterações patológicas já estabelecidas é uma tarefa difícil e, até momento recente, pouco produtiva.

Dado o número expressivo de estudos que envolveram terapias anti-citocina durante a pandemia de COVID-19, diversas evidências foram produzidas, resultando inclusive em aprovações em agências regulatórias. Contudo, não há ainda um compilado atualizado das informações, ficando incerta a evolução geral dessa abordagem na SDRA e como estudos pré-clínicos e clínicos podem ser beneficiados. Desse modo, faz-se necessária uma revisão de literatura.

1.2. AVANÇOS RECENTES E PERSPECTIVAS DA TERAPIA ANTI-CITOCINA NA LESÃO PULMONAR AGUDA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Uma versão em inglês e adaptada desta revisão de literatura foi publicada no periódico científico *Cytokine & Growth Factor Reviews*, sob o título "*Recent progress and prospects for anti-cytokine therapy in preclinical and clinical acute lung injury*" (Fadanni & Calixto, 2023).

1.2.1. Introdução

Devido à gravidade e natureza inflamatória da SDRA, medicamentos anti-inflamatórios são há muito tempo estudados como uma potencial terapia. Contudo, nenhum dos candidatos mais promissores demonstrou benefícios consistentes para os pacientes (Lewis et al., 2019). Recentemente, análises secundárias de estudos controlados e randomizados (ECRs) e uma melhor compreensão da heterogeneidade dos pacientes têm transformado a maneira como se espera que esses medicamentos sejam testados (Wick et al., 2021). Além disso, avanços recentes na compreensão da "tempestade de citocinas" em pacientes com COVID-19 grave, linfocitose

hemofagocítica (HLH) e síndrome de liberação de citocinas (CRS, do inglês *cytokine release syndrome*) revelaram novos *insights* sobre inibição de citocinas que podem ter algum valor terapêutico na SDRA (Karki & Kanneganti, 2021). Dessa forma, por meio de uma análise abrangente da literatura, esta revisão fornece uma visão atualizada das evidências pré-clínicas e clínicas da inibição de citocinas importantes na LPA e na SDRA. Nela, discute-se o progresso recente com novos fármacos em desenvolvimento além de medicamentos previamente aprovados e sujeitos a reposicionamento. Por fim, também são discutidas as evidências atuais e as direções futuras do tratamento com combinações de fármacos anti-citocina.

1.2.2. Citocinas como alvos terapêuticos na LPA e SDRA

O papel das citocinas na LPA/SDRA tem sido investigado há muitas décadas, embora sem resultar em avanços terapêuticos. No momento, evidências acumuladas sugerem uma forte associação entre o aumento da concentração de citocinas e o estabelecimento, a gravidade e a mortalidade da SDRA (Bauer et al., 2000; Matute-Bello et al., 2000; Meduri et al., 1995a,b; Park et al., 2001; Wang J et al., 2021). A tempestade de citocinas, aqui referida de forma intercambiável como hipercitocinemia, é um termo amplo que descreve um estado de hiperativação imune no qual ocorre um envolvimento excessivo e simultâneo de múltiplos efetores imunológicos, especialmente citocinas e quimiocinas (Karki & Kanneganti, 2021). Embora a utilidade do termo seja objeto de debate, este tem sido amplamente utilizado para explicar a patogênese da COVID-19 grave, SDRA e outras condições, bem como para fornecer a fundamentação teórica para ensaios clínicos de terapias anti-citocina (Karki & Kanneganti, 2021). Nessa perspectiva, ensaios clínicos que combinem os avanços na subfenotipagem da SDRA com drogas anti-citocina utilizadas na COVID-19, HLH, CRS ou doenças autoinflamatórias, podem revelar um tratamento eficaz para a SDRA, especialmente para o subtipo hiperinflamatório. Drogas candidatas incluem, mas não se limitam, a fármacos e biofármacos aprovados pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) que têm por alvo as principais citocinas pró-inflamatórias, seus receptores, moléculas sinalizadoras ou fatores de transcrição *downstream* (**Quadro 5**).

Quadro 5. Seleção de imunomoduladores com potencial terapêutico na hipercitocinemia associada à SDRA.

Alvo	Droga	Indicação atual [†]
IFN- γ	Emapalumabe	Linfocitose hemofagocítica
IL-1 α , IL-1 β ou IL-1R	Anakinra, canaquinumabe, riloncept	Artrite reumatoide, síndromes periódicas associadas a criopirina, síndrome periódica associada ao fator de necrose tumoral, deficiência do antagonista do receptor de IL-1, e outras
IL-6 ou IL-6R	Sarilumabe, siltuximabe, tocilizumab	Artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, síndrome de liberação de citocinas, doença pulmonar intersticial associada à esclerose sistêmica, Doença de Castleman, COVID-19, e outras
IL-17A ou IL-17RA	Brodalumabe, ixequizumabe secuquinumabe	Psoríase, artrite psoriásica, espondilite anquilosante, e outras
Janus quinases (JAKs)	Baricitinibe, ruxolinitibe, tofacitinibe	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, alopecia areata, COVID-19, espondilite anquilosante, colite ulcerativa, doença do enxerto contra o hospedeiro, mielofibrose, e outras
NF- κ B	Dexametasona, metilprednisolona	Uso amplo, incluindo doenças endócrinas, reumáticas, hematológicas, oftálmicas, dermatológicas, gastrointestinais e respiratórias
TNF	Adalimumabe, etanercepte, infiximabe	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, artrite idiopática juvenil, espondilite anquilosante, colite ulcerativa, Doença de Crohn, psoríase, uveíte e outros

[†]Baseado nas aprovações da *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) até junho de 2023. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>. Algumas das indicações podem não se aplicar a todas as drogas na mesma classe.

1.2.2.1. Inibição da sinalização por IL-1 e o inflamassoma NLRP3

O inflamassoma NLRP3 (do inglês *NOD, LRR and pyrin domain-containing protein 3*) é um complexo multiproteico intracelular que serve como plataforma para a produção das citocinas IL-1 β e IL-18, e um tipo de morte celular inflamatória chamada piroptose (**Figura 6**). Considerando que a ativação excessiva do NLRP3 e a liberação de IL-1 têm sido associadas a lesões pulmonares e hiperinflamação, ensaios clínicos para testar a inibição direcionada na COVID-19 e na SDRA se tornaram um interesse lógico (Potere et al., 2022).

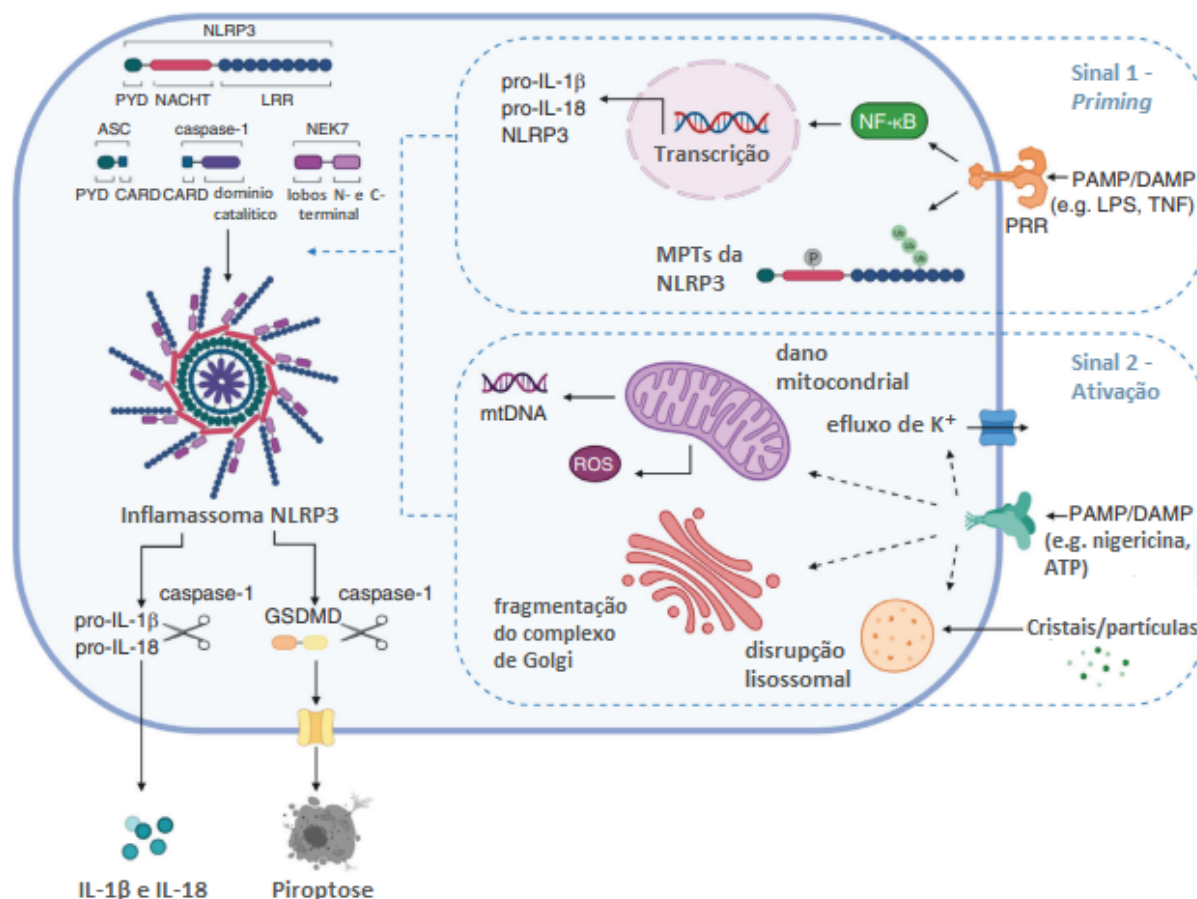


Figura 6. Estrutura e ativação do inflamassoma NLRP3. PYD = domínio pirina. NACHT = domínio NACHT. LRR = domínio de repetição rica em leucina. ASC = *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*. NEK7 = *NIMA-related kinase 7*. CARD = domínio de recrutamento de caspase. NLRP3 = *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*. GSDMD = gasdermina D. NF-κB = fator nuclear κB. MPT = modificações pós-traducionais. mtDNA = DNA mitocondrial. ROS = espécies reativas de oxigênio. Fonte: adaptado de Mckee & Coll (2020).

Em contraste com muitos estudos observacionais (Kyriazopoulou et al., 2021a), ECRs de agentes bloqueadores de IL-1 para pacientes com COVID-19 revelaram resultados predominantemente negativos (Ao et al., 2022; Dahms et al., 2023), embora com ressalvas. Argumenta-se que o potencial completo do bloqueio de IL-1 surge na forma grave da doença, onde a prevalência de hiperinflamação e SDRA é maior (Cavalli & Dagna, 2021; Potere et al., 2022). Além disso, o momento da intervenção também é um fator crítico. Por exemplo, o ensaio SAVE-MORE utilizou os níveis de receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase solúvel (suPAR) para identificação precoce de pacientes com risco de progredir para insuficiência respiratória grave ou óbito. Nesta população de estudo, a intervenção precoce com o padrão de cuidado (SoC, do inglês *standard of care*) e anakinra, um antagonista recombinante do receptor de IL-1 humano (rhIL-1Ra), foi associado a um benefício clínico em todos os desfechos predefinidos em comparação ao SoC isolado

(Kyriazopoulou et al., 2021b). Com base nesses resultados, a *European Medicines Agency* (EMA) recomendou a extensão da indicação do anakinra para incluir o tratamento da COVID-19 guiado por suPAR em pacientes adultos sob suplementação de oxigênio (EMA, 2021). Na mesma direção, a FDA concedeu uma autorização de uso emergencial (FDA, 2022). De todo modo, embora tenha suporte teórico tanto do ponto de vista clínico quanto pré-clínico (Frank et al., 2008), ainda não se sabe se o anakinra poderia ser útil para mitigar outras formas de LPA além da COVID-19 e prevenir a SDRA. Nesse sentido, ensaios futuros podem se beneficiar de biomarcadores para a estratificação ou seleção de pacientes, conforme apoiado pelo ensaio SAVE-MORE (Kyriazopoulou et al., 2021b) e uma análise de subgrupos em um ensaio de rhIL-1Ra para a sepse (Meyer et al., 2018).

Além do anakinra, uma meta-análise recente de pacientes com COVID-19 tratados com canakinumabe, um anticorpo monoclonal (mAb) cujo alvo é a IL-1 β , sugere maior sobrevivência bem como diminuição dos níveis de proteína C-reativa (CRP) (Ao et al., 2022). No entanto, o tamanho da amostra é pequeno e os dois ECRs incluídos não mostraram um benefício claro. Riloncept, um receptor “chamariz” solúvel de IL-1, não foi testado na COVID-19 ou outras formas de LPA em humanos. Em relação aos inibidores do NLRP3, um ECR *open-label* de fase II do DFV890 em pacientes com função respiratória comprometida por COVID-19 não atingiu o desfecho primário (Madurka et al., 2022). Além disso, um ensaio clínico da dapansutrila foi interrompido precocemente devido à evolução do SoC e da vacinação (NCT04540120). Assim, embora bem fundamentada, a premissa da inibição seletiva do inflamassoma NLRP3 na LPA/SDRA ainda depende exclusivamente de evidências preliminares, como estudos de associação genética (Maes et al., 2022), relevância do mecanismo para a evolução da doença (Grailer et al., 2014; Potere et al., 2022) e eficácia em modelos experimentais (Corcoran et al., 2021; Zeng et al., 2022).

1.2.2.2. Inibição da sinalização por IL-6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que exerce seus efeitos ligando-se a receptores de IL-6 ligados à membrana (IL-6R) ou solúveis (sIL-6R) em processos denominados sinalização clássica e trans-sinalização, respectivamente. Ambos os processos envolvem interação com a glicoproteína 130 (gp130) e a sinalização por

Janus quinase (JAK) e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), conhecida como a via JAK-STAT. No entanto, enquanto a sinalização clássica está principalmente associada a respostas homeostáticas, a trans-sinalização medeia a atividade patogênica da IL-6 (McElvaney et al., 2021).

O aumento da expressão de IL-6 tem sido observado em pacientes sob risco ou com SDRA estabelecida, especialmente entre os não sobreviventes (Meduri et al., 1995a,b; Park et al., 2001; Wang J et al., 2021) e aqueles que se enquadram no subfenótipo hiperinflamatório (Leisman et al., 2020). Tocilizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado contra IL-6R, tem sido usado para tratar várias condições, incluindo artrite reumatoide e CRS. Em um primeiro momento, estudos preliminares em pacientes com COVID-19 indicaram um benefício na sobrevivência que não foi consistentemente relatado em ECRs subsequentes (McElvaney et al., 2021). Porém, considerado o acúmulo de evidências, uma meta-análise recente de ECRs sugere que o tratamento com tocilizumabe está associado a redução da mortalidade e menor progressão para ventilação mecânica em casos moderados a graves de COVID-19 (Yu et al., 2022). Sarilumabe, um segundo anticorpo monoclonal anti-IL6R, não foi capaz de melhorar o desfecho clínico, embora sejam necessários estudos adicionais (Yu et al., 2022). Nesse contexto, a FDA aprovou em dezembro de 2022 o tocilizumabe como o primeiro anticorpo monoclonal para o tratamento de COVID-19 em indivíduos hospitalizados que estejam recebendo corticosteroides e necessitando de oxigênio suplementar, ventilação mecânica não invasiva ou invasiva, ou ECMO (FDA, 2022).

Da mesma forma que para o anakinra, não se sabe se o tocilizumabe pode modificar a SDRA não relacionada à COVID-19. Modelos animais de LPA experimental mostraram que a sinalização por IL-6 é importante para a defesa do hospedeiro durante infecções respiratórias (Gou et al., 2019; Lauder et al., 2013) e que pode ser protetora ou patogênica após estímulos estéreis (Goldman et al., 2014; Kobayashi et al., 2015; Voiriot et al., 2017). Além disso, foi recentemente relatado que a administração de tocilizumabe reduziu a inflamação e aumentou a sobrevivência em modelo de sepse induzido por ligadura e punção do ceco (Ibrahim et al., 2020) e na LPA induzida por ácido oleico (Terzi et al., 2022). No entanto, o tocilizumabe não se liga ao IL-6R de ratos ou camundongos (Lokau et al., 2020; Ueda et al., 2013), sugerindo que a eficácia observada nesses estudos provavelmente não é mediada

pelo mecanismo de ação previsto. Por fim, o tratamento com sgp130Fc, que inibe especificamente a trans-sinalização da IL-6 ao atuar como uma armadilha para o complexo IL-6/sIL-6R, foi eficaz em modelos murinos de sepse e fibrose pulmonar (Barkhausen et al., 2011; Le et al., 2014). Essa é uma estratégia promissora e que poderia ser uma alternativa seletiva à inibição global da IL-6 no futuro, mas cujo potencial terapêutico na LPA/SDRA ainda precisa ser demonstrado.

1.2.2.3. Inibição da sinalização por IL-8 e CXCR1/2

A IL-8, também conhecido como CXCL8, é uma quimiocina cuja sinalização ocorre por meio dos receptores CXCR (do inglês *C-X-C motif chemokine receptors*) 1 e 2, e atua como um potente atrativo e ativador de neutrófilos. A ativação excessiva do eixo IL-8-CXCR1/2 e a resultante neutrofilia têm sido postuladas como um componente crítico da hiperinflamação na LPA/SDRA (revisado em Cesta et al., 2021), tornando-a um potencial alvo terapêutico. Embora existam alguns inibidores de sinalização de IL-8 ou CXCR1/2 em desenvolvimento para asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), apenas três foram testados preliminarmente na LPA humana.

BMS-986253, um anticorpo monoclonal anti-IL-8, foi testado para a COVID-19 grave em um estudo pequeno de fase II que foi encerrado devido a uma análise provisória que sugeriu provável ineficácia (NCT04347226). O danirixin, um antagonista competitivo e seletivo de CXCR2, foi investigado como tratamento de influenza. Contudo, não foi possível traçar conclusões relativas à eficácia devido ao recrutamento insuficiente de pacientes (Madan et al., 2019). A terceira droga é o reparixin, um antagonista dual não competitivo de CXCR1/2 atualmente em desenvolvimento para múltiplas indicações, incluindo-se COVID-19 e SDRA. Um pequeno ECR *open-label* de fase II com pacientes com pneumonia grave por COVID-19 mostrou desfechos melhores durante tratamento com SoC e reparixin em comparação ao SoC isoladamente (Landoni et al., 2022a). Já um estudo consecutivo de fase III não atingiu o desfecho primário de eficácia, embora a interpretação completa dos resultados exija que mais dados sejam divulgados (Landoni et al., 2022b). De maneira importante, outros ensaios estão em andamento para testar a eficácia e a segurança do reparixin. Estes incluem pacientes hospitalizados com

pneumonia adquirida na comunidade, incluindo COVID-19, e SDRA não específica moderada a grave (NCT05254990, NCT05496868). Além disso, em uma meta-análise de ECRs com diferentes grupos de pacientes sob alto risco de mortalidade hospitalar, o tratamento com reparixin resultou em maior sobrevivência sem alterar o risco de infecções. Todavia, o número limitado de pacientes incluídos e a alta heterogeneidade clínica entre as populações-alvo ainda impedem uma interpretação definitiva (Landoni et al., 2022c).

Resultados interessantes também foram observados em modelos experimentais. Por exemplo, a expressão transgênica de IL-8 humana em camundongos proporcionou proteção contra infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*, mas foi associada a inflamação pulmonar, fibrose e comprometimento da função em animais não infectados (Reynolds et al., 2018). Um estudo com camundongos deficientes em CXCR2 mostrou mortalidade acentuada após infecção por *Streptococcus pneumoniae*, e o pré-tratamento de camundongos tipo-selvagem com um antagonista de CXCR2 resultou em redução da neutrofilia e aumento da carga bacteriana (Herbold et al., 2010). Em oposição, outro estudo associou o antagonismo de CXCR1/2 a desfechos mais favoráveis durante a infecção por IAV/H1N1, *Streptococcus pneumoniae* ou pneumonia pós-influenza (Tavares et al., 2017). Em relação à inflamação pulmonar causada por estímulos estéreis, camundongos nocaute para *cxcr2*^{-/-} apresentaram migração reduzida de neutrófilos para os pulmões e melhor desfecho em relação ao controle selvagem (Reutershan et al., 2006). De maneira importante, efeito similar foi observado em camundongos, ratos, macacos e humanos tratados com antagonistas de CXCR1/2 (Chapman et al., 2007; Lazaar et al., 2011; Mattos et al., 2020; Zarbock et al., 2008).

Em resumo, apesar de ter um bom suporte pré-clínico, o benefício clínico da inibição do eixo IL-8-CXCR1/2 na LPA/SDRA e a relação risco-benefício ainda são incertos. Estudos em andamento ou concluídos (mas não publicados) do reparixin na COVID-19, pneumonia adquirida na comunidade, e SDRA, podem trazer melhor entendimento ao tema. Ao mesmo tempo, outros ECRs de anticorpos monoclonais anti-IL-8 para SDRA e hiperinflamação também são de grande interesse.

1.2.2.4. Inibição da sinalização por IL-17

A família da IL-17 é composta por seis membros: IL-17A (comumente referida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. A IL-17A sinaliza através do receptor A de IL-17 (IL-17RA) e IL-17RC, e está fortemente envolvida tanto na inflamação patogênica quanto na defesa do hospedeiro. Em pacientes com SDRA, há correlação positiva entre o nível de IL-17 e medidas de inflamação, função pulmonar e gravidade do quadro clínico (Li et al., 2016; Mikacenic et al., 2016).

Considerando-se a LPA experimental, a inibição de IL-17 foi investigada em vários cenários. Em um estudo pioneiro, Ye et al. (2001) demonstraram que a sinalização por IL-17 é crucial para a defesa do hospedeiro durante a infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*. Em discordância, camundongos nocaute *Il-17a^{-/-}* ou *Il-17ra^{-/-}* infectados com IAV/H1N1 apresentaram taxas de sobrevivência aumentadas e redução da inflamação pulmonar e lesão tecidual, assim como animais tratados com anticorpo neutralizante de IL-17 (Crowe et al., 2009; Li et al., 2012). Em outro estudo, camundongos deficientes em IL-17RA com pneumonia induzida apresentaram taxas de sobrevivência aumentadas ou diminuídas dependendo da cepa de pneumococo (Ritchie et al., 2018). Com base nesses resultados, se a inibição da IL-17 é benéfica ou prejudicial durante infecções pulmonares em camundongos parece variar com o tipo e a cepa do patógeno. Na ausência de infecção, Li et al. (2016) demonstraram que o nível de IL-17 no FLBA (fluido do lavado broncoalveolar) de camundongos com LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) está positivamente correlacionado com perda de peso corporal, acúmulo de proteína no FLBA e lesão do tecido pulmonar. Além disso, o pré-tratamento com IL-17 exógena aumentou ainda mais esses parâmetros, além de favorecer a infiltração de neutrófilos e a liberação de citocinas (Li et al., 2016). Por fim, os autores mostraram que camundongos nocaute *Il-17^{-/-}* e camundongos pré-tratados com um anticorpo neutralizante de IL-17 tiveram a inflamação e a lesão tecidual significativamente reduzidas em resposta ao LPS (Li et al., 2016).

Atualmente, os inibidores de IL-17 amplamente aprovados incluem quatro anticorpos monoclonais, dois cujos alvos são a própria proteína IL-17A (secuquimumabe e ixequizumabe), um que visa tanto a IL-17A quanto a IL-17C (bimequizumabe), e outro que tem por alvo o receptor IL-17RA (brodalumabe). Neste

contexto, um estudo pequeno da adição do secuquinumabe ao SoC em pacientes com COVID-19 não encontrou benefícios (Resende et al., 2022). Contudo, o netaquimabe, um anticorpo monoclonal anti-IL-17A aprovado na Rússia, foi associado a níveis mais baixos de CRP e lactato desidrogenase (LDH), pontuação mais baixa no *National Early Warning Score 2* (NEWS2) e maior frequência de alta hospitalar precoce (5-7 dias) em um estudo observacional de pacientes com COVID-19 leve a moderada (Bryushkova et al., 2022). Além disso, em um estudo retrospectivo de pacientes com COVID-19 e níveis de CRP acima de 60 mg/L, aqueles que receberam netaquimabe (em adição ao SoC) apresentaram mortalidade significativamente reduzida, menor necessidade de ventilação mecânica e menor admissão à UTI quando comparados ao tratamento com tocilizumabe ou apenas SoC (Maslennikov et al., 2021). No geral, apesar do bom suporte pré-clínico e evidências preliminares de benefício clínico, ainda são necessários ECRs e estudos com maior tamanho amostral para validar o potencial terapêutico do netaquimabe e outros inibidores de IL-17 na LPA/SDRA.

1.2.2.5. Inibição da sinalização por GM-CSF

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é um fator de crescimento hematopoiético e uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos na inflamação e homeostase pulmonar. Maior mortalidade de camundongos nocaute *gm-csf^{-/-}* com pneumonia bacteriana (Ballinger et al., 2006) e um efeito protetivo da superexpressão ou administração de GM-CSF nas vias aéreas durante infecção por IAV/H1N1 (Halstead et al., 2018; Subramaniam et al., 2015) sugerem um papel benéfico do GM-CSF na LPA induzida por patógenos. No mesmo sentido, a presença de GM-CSF no FLBA de pacientes com SDRA inicial foi mais elevada entre os sobreviventes do que entre os não sobreviventes (Matute-Bello et al., 2000). No entanto, o GM-CSF também pode atuar como um impulsionador da hiperinflamação por meio do recrutamento e ativação excessivos de células mielóides nos pulmões (Lang et al., 2020). Em conformidade, o bloqueio da sinalização por GM-CSF limitou o influxo de neutrófilos e a liberação de citocinas em camundongos com LPA induzida por LPS (De Alessandris et al., 2019; Puljic et al., 2007). Portanto, tanto a inibição quanto a administração de GM-CSF estão sendo investigadas como estratégias terapêuticas na LPA/SDRA (Lang et al., 2020).

Atualmente, não existem inibidores específicos de GM-CSF sendo comercializados, mas alguns são objetos de pesquisas concluídas ou em andamento. Esses fármacos incluem seis anticorpos monoclonais que têm como alvo a proteína GM-CSF (namilumabe, gimsilumabe, lenzilumabe, otilimabe e plonmarlimabe) ou seu receptor GM-CSFR (mavrilimumabe). O estudo LIVE-AIR, desenhado para testar o lenzilumabe na COVID-19, revelou aumento da sobrevida livre de ventilação em pacientes com hipoxemia que não recebiam ventilação mecânica (Temesgen et al., 2022a). Esse efeito foi particularmente notável entre os indivíduos com níveis iniciais de CRP abaixo de 150 mg/L (Temesgen et al., 2022b). Em oposição, um estudo com número maior de pacientes e o fármaco otilimabe (*OSCAR trial*) não revelou benefício adicional em comparação com o SoC (Patel et al., 2023). Além disso, um estudo do gimsilumabe (Criner et al., 2022) e um ensaio menor com o mavrilimumabe (Cremer et al., 2022) apresentaram resultados negativos, enquanto que um estudo *open-label* de fase II com o namilumabe apoia uma investigação mais aprofundada (Fisher et al., 2022).

Diante da controvérsia nos resultados, argumentou-se que alguns dos dados atuais carecem de robustez e que o raciocínio por trás da inibição do GM-CSF na COVID-19 não tem clareza suficiente entre associação e causalidade (Kohler & Morris, 2023). Em um estudo de meta-análise recente (com cinco ECRs e dois estudos de coorte inclusos), concluiu-se que a administração de anticorpos anti-GM-CSF pode ser eficaz e segura, mas que ainda são necessários mais estudos (Xi et al., 2023). Deste modo, no presente momento, permanece altamente incerto se a neutralização do GM-CSF tem utilidade no tratamento da COVID-19 e, por extensão, qualquer outra causa de LPA ou SDRA.

1.2.2.6. Inibição da sinalização por TNF

A liberação de TNF é um fenômeno central da inflamação aguda e está aumentada no soro e/ou FLBA de pacientes com SDRA, pneumonia grave e COVID-19 grave (Bauer et al., 2000; Meduri et al., 1995a,b; Wang et al., 2021). Produzido principalmente por macrófagos, o TNF atua em outras células por meio de dois receptores, TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75). Enquanto a ativação do TNFR1 está amplamente associada a efeitos patogênicos, as evidências atuais sugerem que o

TNFR2 - cuja ativação é menos compreendida - possui uma função protetora (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

Historicamente, o potencial terapêutico da inibição do TNF foi extensivamente testado em ensaios clínicos de pacientes com sepse/choque séptico, mas sem sucesso (Abraham et al., 2001). Quando a evidência acumulada foi considerada em uma meta-análise, observou-se uma diminuição global pequena no risco relativo de morte, porém de forma consistente entre os estudos e estatisticamente significativa (Qiu et al., 2013). Atualmente, os medicamentos anti-TNF disponíveis comercialmente incluem quatro anticorpos monoclonais (adalimumabe, certolizumabe pegol, golimumabe e infliximabe) e uma proteína de fusão TNFR2-Fc (etanercept).

Em um pequeno ECR em pacientes com COVID-19 grave, nenhum benefício do tratamento com adalimumabe foi encontrado (Fakharian et al., 2021). Da mesma forma, Fisher et al. (2022) não relataram benefício adicional do tratamento com infliximabe em um estudo pequeno de fase II. No entanto, os resultados de um estudo muito maior (estudo ACTIV-1 IM) sugerem o contrário (O'Halloran et al., 2023 - *preprint*). Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada no desfecho primário (tempo médio de recuperação; taxa de recuperação = 1,13, $p = 0,063$), pacientes hospitalizados com COVID-19 moderada a grave tiveram menor mortalidade em 28 dias sob tratamento com infliximabe, especialmente aqueles que necessitavam de ventilação não invasiva ou dispositivos de oxigênio de alto fluxo no início do estudo (O'Halloran et al., 2023). Os pacientes em ventilação mecânica ou ECMO não se beneficiaram do tratamento com infliximabe. Além disso, a mortalidade e o tempo de recuperação entre aqueles com CRP > 75 mg/L no início do estudo mostraram uma maior tendência de melhora (O'Halloran et al., 2023), mais uma vez sugerindo que a identificação de pacientes com uma inflamação sistêmica mais proeminente poderia aumentar o sucesso terapêutico com inibidores de citocinas. Em paralelo, uma meta-análise realizada antes da publicação dos resultados do estudo ACTIV-1 sugere menor risco de hospitalização ou doença grave em pacientes com COVID-19 que recebem terapia anti-TNF (Kokkotis et al., 2022).

Em estudos não clínicos, a administração de um anticorpo específico contra o TNFR1 mitigou as alterações na inflamação, mecânica respiratória e oxigenação em modelos murinos de LPIV com e sem LPS (Bertok et al., 2012). Por outro lado, a neutralização direta do TNF não mostrou nenhum benefício, embora tenha sido

testada apenas no modelo “puro” de LPIV, que possui inflamação limitada (Bertok et al., 2012). Utilizando um modelo de inalação de LPS, Proudfoot et al. (2018) mostraram que a inalação prévia de um anticorpo anti-TNFR1 (GSK1995057) reduziu a infiltração de neutrófilos e marcadores de inflamação pulmonar em primatas não humanos e voluntários saudáveis. Além disso, Morris et al. (2020) demonstraram que o tratamento com anti-TNFR1, mas não com anti-TNFR2, acelera o ganho de peso, reduz a liberação de citocinas nos pulmões e melhora a função respiratória em camundongos infectados pelo vírus sincicial respiratório. Diante dos resultados favoráveis em relação à inibição seletiva do TNFR1, essa pode ser uma estratégia de tratamento promissora cuja eficácia na LPA aguarda investigação (Sinha & Ware, 2018).

1.2.2.7. Inibição da sinalização por IFN- γ

O IFN- γ é o único membro da família de interferons do tipo II e é um mediador central da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro. A ligação do IFN- γ ao seu receptor (IFN- γ R) leva à ativação das JAKs 1 e 2, seguido da fosforilação da molécula de STAT1. A STAT1 então forma dímeros e transloca-se para o núcleo, onde induz transcrição gênica por meio de genes estimulados por interferon (ISGs; **Figura 7**). Além disso, é importante ressaltar que o IFN- γ polariza os macrófagos para um estado pró-inflamatório hiperresponsivo, e possui funções reguladoras importantes em várias células imunes (como células T) e não imunes (Ivashkiv, 2018).

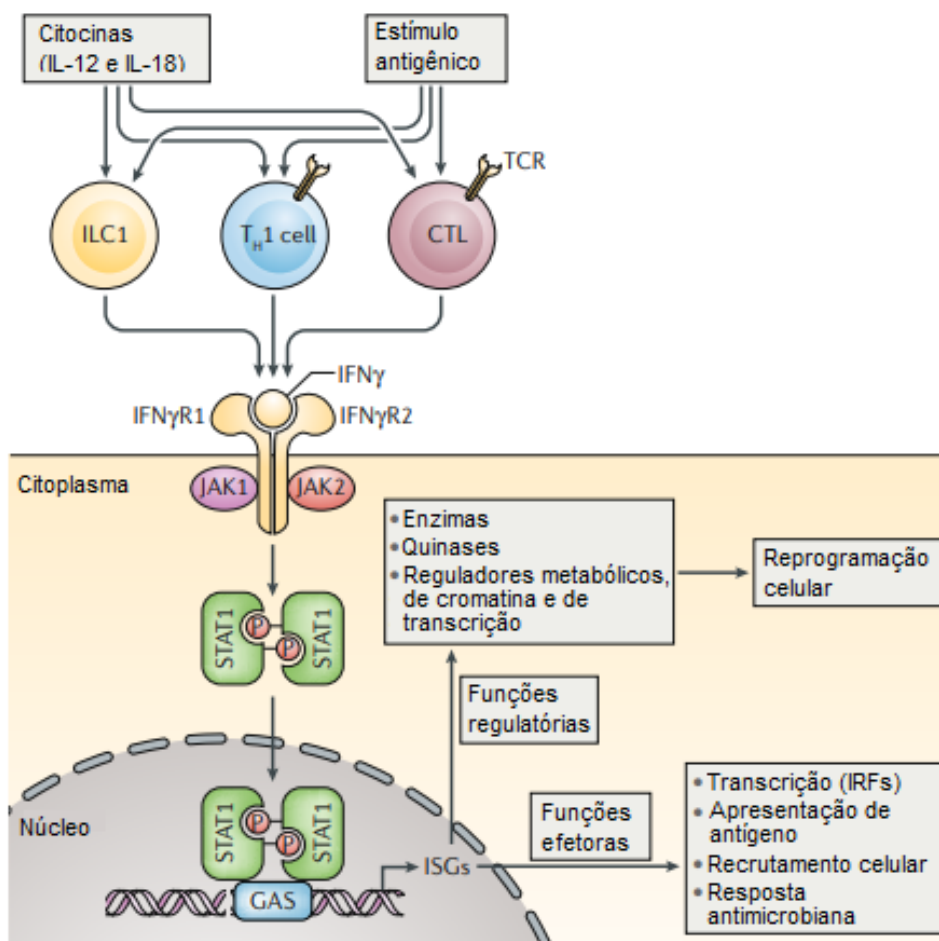


Figura 7. Sinalização por IFN- γ . ILC1 = célula linfóide inata tipo I. Th1 = célula T *helper* tipo I. CTL = linfócitos T citotóxicos. TCR = receptor de célula T. IFN- γ = interferon gama. IFN- γ R1 = subunidade 1 do receptor de interferon gama. IFN- γ R2 = subunidade 2 do receptor de interferon gama. JAK1 = Janus quinase 1. JAK2 = Janus quinase 2. STAT1 = transdutor de sinal e ativador da transcrição 1. GAS = sítio de ativação por interferon gama. ISGs = genes estimulados por interferon. IRFs = fatores reguladores de interferon. Fonte: adaptado de Ivashkiv (2018).

Comparado às outras citocinas, a correlação entre IFN- γ e os desfechos da LPA/SDRA está só recentemente sendo mais explorada, resultando em poucos dados relativos às concentrações teciduais e cinética. Contudo, o IFN- γ foi incluído em uma seleção de biomarcadores plasmáticos usados para definir o subfenótipo "reativo" associado a uma maior mortalidade na UTI (Bos et al., 2017). Além disso, um estudo recente encontrou aumento da expressão de ISGs e ativação de células T no subfenótipo hiperinflamatório comparado ao hipoinflamatório (Sarma et al., 2023 - *preprint*). Em uma análise que incluiu pacientes com SDRA associada a adenovírus humano (HAdV), SARS-CoV-2, IAV/H1N1 ou pneumonia bacteriana, a expressão de IFN- γ (além de várias outras citocinas) estava aumentada em comparação aos controles saudáveis (Li et al., 2021). Mais importante, uma maior expressão de IFN- γ foi identificada entre os pacientes infectados por HAdV que desenvolveram SDRA em

comparação àqueles que não desenvolveram, e os níveis de IFN- γ foram negativamente correlacionados com a razão PaO₂/FiO₂ (Li et al., 2021).

No cenário pré-clínico, camundongos nocaute *Irfng*^{-/-} submetidos a modelos de LPA induzidos por LPS, IAV/H1N1 ou *Streptococcus pneumoniae* tiveram uma resolução acelerada da lesão (Mock et al., 2020). Da mesma forma, outros estudos mostraram diminuição da inflamação pulmonar e aumento significativo da sobrevivência em camundongos deficientes em IFN- γ durante a infecção por IAV/H1N1 ou pneumonia bacteriana pós-influenza (Schmit et al., 2022; Verma et al., 2021). Um estudo subsequente revelou ainda que o IFN- γ foi capaz de aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios em células mieloides das vias aéreas para induzir uma hiperprodução de TNF e IL-6 que foi associada à mortalidade (Verma et al., 2022). Um papel prejudicial do IFN- γ na LPA/SDRA também é apoiado pelo uso de anticorpos neutralizantes (Liu et al., 2021; Mock et al., 2020; Verma et al., 2021). Vale ressaltar, ainda, que a inibição genética ou farmacológica da sinalização do IFN- γ em camundongos não teve um efeito significativo na eliminação de patógenos (Liu et al., 2021; Mock et al., 2020; Schmit et al., 2022; Verma et al., 2021; 2022).

Atualmente, tanto os dados clínicos quanto os não clínicos sugerem predominantemente que o IFN- γ é um importante fator de hiperinflamação na SDRA e um alvo terapêutico promissor. No entanto, o potencial terapêutico da inibição do IFN- γ na LPA/SDRA humana ainda não foi investigado. O emapalumabe, um anticorpo monoclonal neutralizante de IFN- γ aprovado para HLH, teve um ensaio clínico registrado para a COVID-19 (NCT04324021), mas o recrutamento de pacientes foi encerrado precocemente devido à evolução do SoC.

1.2.2.8. Inibição da via de sinalização JAK-STAT

A via de sinalização JAK-STAT é uma via intracelular de transdução de sinal que permite com que a interação entre quase 60 citocinas e seus respectivos receptores resulte em uma resposta transcricional (**Figura 8**; Philips et al., 2022). A família JAK possui quatro membros, JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2, enquanto a família de fatores de transcrição STAT compreende STAT1 à STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6 (Philips et al., 2022). Inibidores de STAT estão sendo avaliados em ensaios clínicos, mas nenhum foi aprovado até o momento. Por outro lado, vários inibidores

de JAK chegaram ao mercado, sendo o ruxolitinibe, o tofacitinibe e o baricitinibe os exemplos mais estudados.

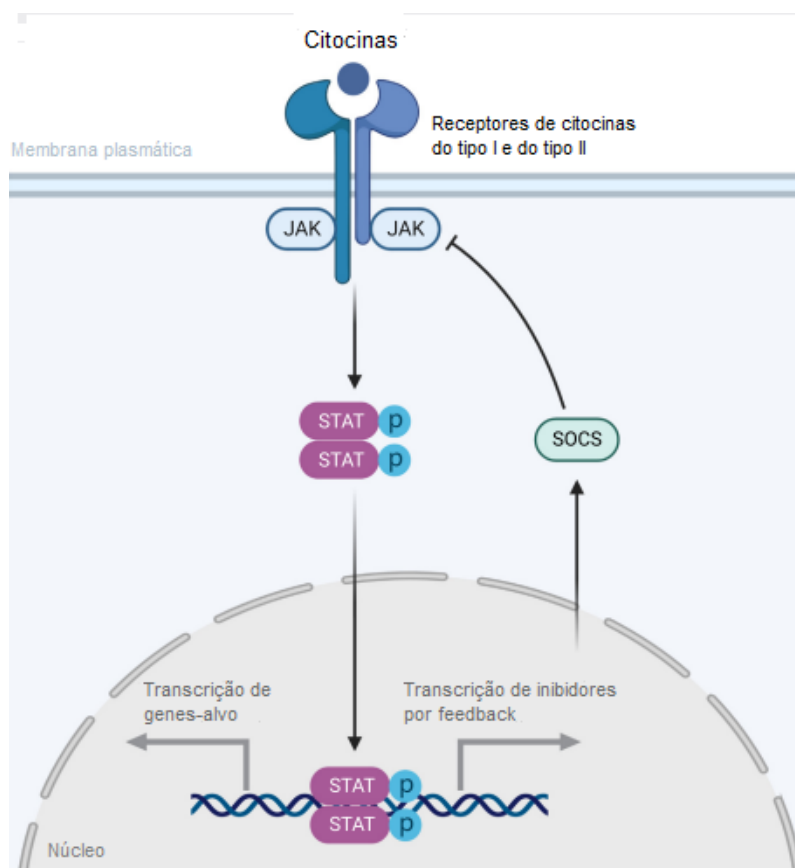


Figura 8. Sinalização pela via JAK-STAT. Traduzido de Luo et al. (2020).

Atualmente, dados conclusivos sobre a capacidade dos inibidores de JAK de modificar a LPA/SDRA ainda estão se acumulando. Uma exceção, porém, é o baricitinibe, que foi aprovado para o tratamento da COVID-19 em adultos hospitalizados que necessitem de oxigênio suplementar, ventilação mecânica não invasiva ou invasiva, ou ECMO (Rubin, 2022). Uma meta-análise que avaliou quatro ECRs do baricitinibe destaca uma redução na mortalidade em 28 dias quando este é usado em associação com o SoC, especialmente dexametasona e/ou inibidores de IL-6 (Selvaraj et al., 2022). Em uma segunda meta-análise que também incluiu três ECRs com ruxolitinibe e dois com tofacitinibe, as evidências combinadas sugerem que os três inibidores de JAK reduzem a mortalidade em pacientes hospitalizados com COVID-19 (RECOVERY Collaborative Group, 2022). Um estudo do nezulcitinibe (TD-0903), um inibidor de JAK inalatório e não seletivo em desenvolvimento para a LPA associada à COVID-19, não atingiu o desfecho primário de eficácia (Singh et al., 2021;

NCT04402866). Entre os estudos pré-clínicos, a eficácia dos inibidores de JAK foi demonstrada em macacos infectados com SARS-CoV-2 (Hoang et al., 2021) e em modelos murinos de asma induzida por alérgeno (Subramanian et al., 2021), fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Gu et al., 2023), sepse e choque tóxico (Jarneborn et al., 2020), CRS e HLH (Albeituni et al., 2019; Huarte et al., 2021), e LPA induzida por LPS (Calama et al., 2017). A inibição de STAT3 foi testada na LPA induzida por LPS e apresentou resultados positivos (Zhao et al., 2016).

De maneira importante, a ativação da via JAK-STAT induz sistemas de *feedback* negativo, como a família de supressores da sinalização de citocinas (SOCS, do inglês *suppressor of cytokine signalling*) (Philips et al., 2022). Essas proteínas são conhecidas por promover a ubiquitinação e proteólise de moléculas de sinalização, bem como inibir diretamente a atividade das JAKs limitando assim a inflamação (Liau et al., 2018). Devido ao papel protetor das SOCS na lesão pulmonar e na inflamação (Karki P et al., 2021; Zhao et al., 2016), os peptidomiméticos de SOCS são uma potencial estratégia terapêutica para a LPA/SDRA. No entanto, a expressão de SOCS1 foi associada à limitação da eliminação viral e aumento da mortalidade durante a infecção por IAV/H1N1 em camundongos (Sun et al., 2014). Em consonância, estudos com um antagonista de SOCS1 revelaram uma ampla atividade antiviral (Ahmed et al., 2015). Portanto, os miméticos de SOCS podem oferecer riscos de imunossupressão — como todo fármaco anti-citocina — que são pouco compreendidos. No geral, com base nos resultados positivos de pesquisas clínicas e pré-clínicas, a inibição de JAK é uma estratégia terapêutica promissora para a SDRA e possui evidências relativamente robustas para apoiar ensaios clínicos. Em contrapartida, a inibição de STATs ou o uso de peptidomiméticos de SOCS também podem ser importantes no futuro, mas ainda carecem de investigação suficiente no âmbito não-clínico.

1.2.2.9. *Uso de corticosteroides*

Os corticosteroides sintéticos são uma classe de medicamentos anti-inflamatórios que atuam principalmente ligando-se ao receptor de glicocorticoides (GR) e ativando vias de sinalização genômicas, não genômicas e mitocondriais (revisado em Escoter-Torres et al., 2019; Meduri et al., 2020). Os efeitos genômicos

ocorrem por meio da translocação do GR para o núcleo celular, seguida pela interação com elementos de resposta a glicocorticoides e com fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 (**Figura 9**). Essa interação leva à modulação de múltiplos genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa e resulta em um amplo antagonismo da inflamação (Escoter-Torres et al., 2019).

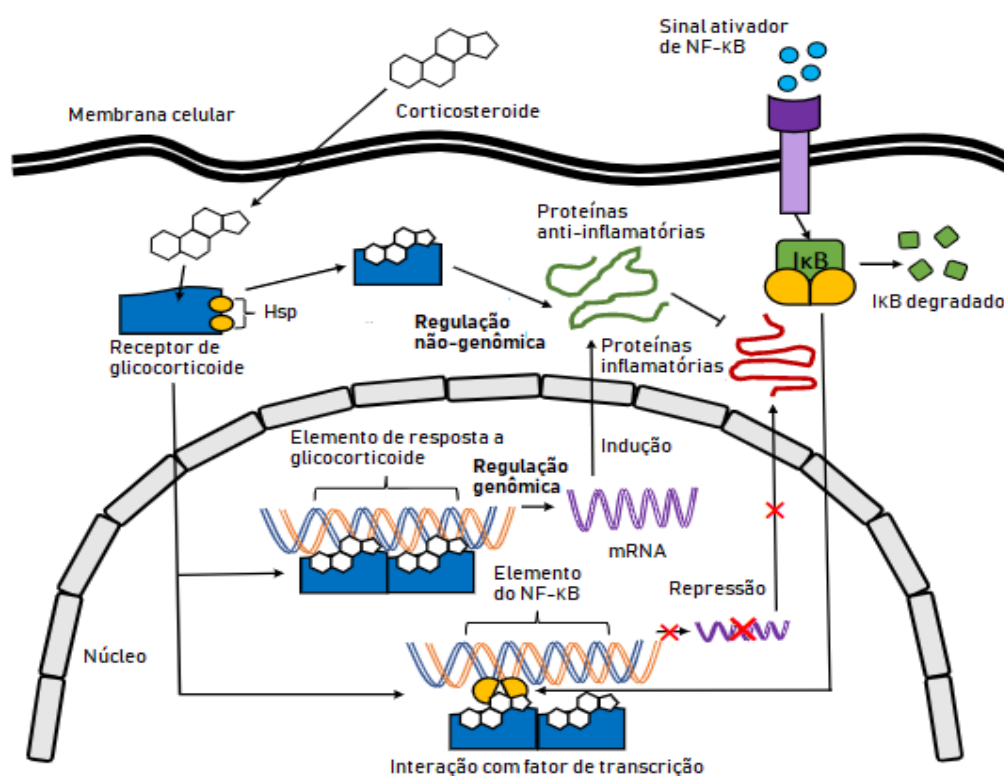


Figura 9. Mecanismos de ação do receptor de glicocorticoide. Hsp = *heat shock protein*. I κ B = inibidor do fator nuclear κ B. NF- κ B = fator nuclear κ B. Fonte: adaptado de Landolf et al. (2022).

Devido à potência, baixo custo e amplitude dos efeitos anti-inflamatórios, os corticosteroides sintéticos são fármacos de primeira escolha para muitas condições clínicas. No entanto, quando são considerados pacientes com infecções respiratórias e/ou SDRA, há uma controvérsia histórica em termos de benefício, dano ou ausência de efeito, e o debate sobre a segurança e eficácia dos corticosteroides é contínuo há décadas (Landolf et al., 2022; Matthay & Wick, 2020). Revisões sistemáticas e meta-análises recentemente publicadas sugerem um provável benefício do tratamento com corticosteroides em pacientes em estado crítico com COVID-19 ou SDRA não específica (Chang et al., 2022; Feng et al., 2022; Landolf et al., 2022). No entanto, o debate provavelmente continuará ativo, uma vez que muitos aspectos, como o momento adequado, a dosagem e a elegibilidade do paciente, requerem investigação

adicional (Landolf et al., 2022; Matthay & Wick, 2020). Além disso, foi proposto que os subfenótipos hipo- e hiperinflamatório entre os pacientes com COVID-19 podem estar associados a uma resposta contrastante aos corticosteroides (Sinha et al., 2021). Isso sugere que uma exploração adicional desses subgrupos na SDRA (associada ou não à COVID-19) também poderia revelar melhores oportunidades para intervenção direcionada. Por fim, o potencial para a combinação de corticosteroides com outros fármacos tem recebido mais atenção nos últimos anos. Vale ressaltar que a adição dos fármacos emapalumabe ou tocilizumabe ao tratamento com corticosteroides é agora uma terapia aprovada para a HLH ou COVID-19, respectivamente (Al-Salama, 2019; FDA, 2022). Portanto, é possível que a combinação de corticosteroides com inibidores seletivos de citocinas também tenha utilidade na SDRA, especialmente no subfenótipo hiperinflamatório.

1.2.3. O potencial da combinação de drogas anti-citocina

Embora a liberação excessiva de citocinas seja uma das características centrais da SDRA, os ensaios clínicos de drogas capazes inibir citocinas ou suas vias de sinalização não atenderam às expectativas. Na verdade, condições associadas à hipercitocinemia, como sepse e SDRA, têm um histórico de resposta inadequada a inibidores de citocinas, enquanto doenças com níveis mais baixos de citocinas circulantes, como artrite e psoríase, têm disponíveis ao uso imunomoduladores altamente eficazes. Essa controvérsia — o fato de que muitas vezes não há benefício na inibição de citocinas em condições em que a concentração de citocinas é muito mais alta — pode ser parcialmente atribuída à incapacidade de uma única droga modificar um mecanismo patogênico mais complexo. Teoricamente, uma maior concentração e diversidade de citocinas resulta em uma rede de citocinas mais ativa e intrincada, na qual a redundância funcional se torna um problema maior (Ozaki et al., 2002). Portanto, considerando o histórico em geral malsucedido das monoterapias na SDRA, talvez o engajamento de múltiplos alvos seja um passo necessário para alcançar avanços terapêuticos (Sun et al., 2016). A seguir, discute-se o estado da arte da terapia combinada para a SDRA, com foco exclusivo no tratamento unimodal e multialvo usando fármacos anti-citocina. Informações sobre a combinação multimodal podem ser encontradas no trabalho de outros autores (Raghavendran et al., 2008).

1.2.3.1. Evidências a partir de estudos observacionais e ensaios clínicos

No primeiro ano da pandemia de COVID-19, resultados encorajadores de ensaios clínicos com a dexametasona rapidamente fizeram do tratamento com corticosteroides a terapia de primeira linha para pacientes hospitalizados. Como consequência, o SoC atual inclui a administração de corticosteroides sistêmicos em até 95% da população de pacientes com COVID-19 (Selvaraj et al., 2022). Portanto, nesse contexto, um potencial benefício associado a uma droga de interesse é provavelmente mais representativo de efeito aditivo ou sinérgico da combinação com corticosteroides do que a monoterapia com a droga específica. Em concordância, dados da adição do tocilizumabe ao SoC no estudo RECOVERY mostraram que a redução geral de mortalidade em relação ao SoC isolado (31% vs. 35%) não é observada entre aqueles que não receberam corticosteroides sistêmicos (39% vs. 35%; 18% do total de pacientes). Em vez disso, os pacientes que receberam tocilizumabe, mas não corticosteroides, apresentaram um aumento absoluto de 4% na taxa de mortalidade, sugerindo que o tocilizumabe não teve efeito benéfico *per se*, e que apenas a combinação das drogas resultou em um desfecho superior ao SoC (RECOVERY Collaborative Group, 2021).

Notavelmente, o estudo do baricitinibe mostrou um efeito semelhante. Nesse caso, a adição de baricitinibe ao SoC resultou em uma diminuição geral na mortalidade de 14% para 12%. No entanto, em pacientes que não receberam corticosteroides sistêmicos (4-5% do total de pacientes), o uso do baricitinibe resultou em um aumento absoluto de 3% na taxa de mortalidade (14% vs. 11% no SoC). Ao contrário do estudo com tocilizumabe, essa heterogeneidade na resposta ao baricitinibe não atingiu significância estatística, embora um tamanho amostral muito menor de pacientes não tratados com corticosteroides possa ter afetado a análise (RECOVERY Collaborative Group, 2022). Independentemente disso, ambos os estudos sugerem coletivamente que uma maior sobrevivência é observada em pacientes tratados com a combinação das drogas anti-citocina, o que apoia uma investigação adicional dessa abordagem (**Quadro 6**).

Quadro 6. Ensaios clínicos em andamento voltados à combinação de drogas anti-citocina para o tratamento da LPA/SDRA.

Combinação de drogas [†]	Condição ou doença	Tipo de estudo	Status	Número de registro
Anakinra e ruxolitinibe	COVID-19 grave	ECR <i>open-label</i>	Desconhecido	NCT04424056
Colchicina e tocilizumabe	COVID-19 grave	ECR <i>open-label</i>	Em recrutamento	NCT05118737
Celecoxibe e rosuvastatina	Trauma torácico contuso, SDRA	ECR com cegamento	Desconhecido	NCT01623921
Dexametasona, heparina de baixo peso molecular e anakinra	COVID-19 grave	Não randomizado e <i>open-label</i>	Em recrutamento	NCT05279391
Dexametasona, heparina de baixo peso molecular e tocilizumabe	COVID-19 grave	Não randomizado e <i>open-label</i>	Em recrutamento	NCT05279391
Dexametasona, heparina de baixo peso molecular, baricitinibe, tocilizumabe e DNase inalada	COVID-19 grave	Não randomizado e <i>open-label</i>	Em recrutamento	NCT05279391
Dexametasona e baricitinibe	Tratamento de resgate na COVID-19	ECR <i>open-label</i>	Em recrutamento	NCT04890626
Dexametasona e baricitinibe	COVID-19 e tempestade de citocinas	ECR <i>open-label</i>	Desconhecido	NCT04832880
Tocilizumabe e ruxolitinibe	COVID-19 grave	ECR <i>open-label</i>	Desconhecido	NCT04424056

Baseado no ClinicalTrials.gov até junho de 2023. Disponível em: clinicaltrials.gov. [†]Os desenhos dos estudos podem incluir drogas adicionais e combinações das mesmas. As combinações listadas na tabela se referem a braços de estudo específicos que incluem drogas anti-inflamatórias com o menor número possível de drogas adicionais. ECR = estudo controlado randomizado.

Atualmente, a combinação mais estudada de inibidores de citocinas na LPA envolve pacientes com COVID-19 e a administração de corticosteroides e tocilizumabe. Uma meta-análise recente (apenas cinco estudos incluídos, nenhum ECR) mostra uma tendência de maior benefício com a combinação de drogas em comparação ao tocilizumabe sozinho, mas o efeito não atingiu significância estatística (Moosazadeh & Mousavi, 2022). Da mesma forma, um ECR *open-label* publicado posteriormente não encontrou benefício adicional do tocilizumabe em pacientes com COVID-19 moderada a grave tratados com corticosteroides. No entanto, com base nos amplos intervalos de confiança para a estimativa de efeito, os autores afirmaram que uma interpretação definitiva não poderia ser feita (Hermine et al., 2022). Desse modo, ainda há a necessidade de ECRs adequadamente dimensionados (da

perspectiva do poder estatístico) e de incluir estudos adicionais em uma meta-análise para obter-se clareza no tema. Atualmente, ensaios clínicos com corticosteroides em andamento incluem o teste da dexametasona em combinação com o anakinra, o tocilizumabe, o baricitinibe, ou o tocilizumabe e o baricitinibe simultaneamente (NCT04832880; NCT04890626; NCT05279391).

O fármaco anakinra, como mencionado anteriormente, foi reposicionado para tratar um subconjunto de pacientes com COVID-19 que necessitam de oxigênio suplementar e estão sob risco de evoluir para insuficiência respiratória grave (EMA, 2021). No estudo SAVE-MORE, que estabeleceu a base para a recomendação da EMA, 85,9% dos participantes estava sob tratamento com dexametasona como parte do SoC, sugerindo que o benefício observado para o anakinra foi adicional aos corticosteroides (Kyriazopoulou et al., 2021b). Estudos preliminares não controlados também indicavam que a combinação de anakinra com outros inibidores de citocinas, como metilprednisolona ou ruxolitinibe, poderia ser útil no tratamento de casos graves ou críticos de COVID-19 sem riscos óbvios à segurança (Bozzi et al., 2021; Kaplanski et al., 2021). Em um ECR *open-label* fatorial e multicêntrico, nem o anakinra, a inibição de IL-6 (sarilumabe/tocilizumabe) ou a combinação desses tratamentos resultaram em melhora clínica (Declercq et al., 2021). No entanto, com base nas limitações do desenho do estudo e no tamanho relativamente pequeno da amostra, a eficácia e segurança da combinação de anakinra com tocilizumabe ou sarilumabe ainda precisam ser exploradas mais a fundo. Nesse sentido, considerados os estudos que investigaram esses medicamentos separadamente, o uso de biomarcadores para a seleção de pacientes elegíveis para a terapia combinada pode ser uma abordagem interessante em estudos futuros. Além disso, um estudo em andamento está investigando o uso do inibidor não seletivo de NLPR3 colchicina em combinação com o tocilizumabe (NCT05118737), o que pode fornecer mais informações sobre o potencial da inibição simultânea das sinalizações por IL-1 e IL-6.

Potenciais candidatos para a terapia combinada também incluem estatinas, posto que alguns estudos mostraram que essa classe de drogas pode aliviar a SDRA (Calfée et al., 2018; Pienkos et al., 2023). Por exemplo, uma combinação de colchicina e rosuvastatina foi investigada em pacientes com COVID-19 não crítica em um pequeno ECR *open-label*, o qual não encontrou alteração no risco de progressão da doença ou eventos tromboembólicos em comparação com o SoC isolado (Shah et al.,

2023). Em concordância, um estudo anterior não havia encontrado benefício significativo da combinação de colchicina e rosuvastatina (Gaitán-Duarte et al., 2022). Em contrapartida, os autores mostraram uma redução significativa na mortalidade em 28 dias ou na necessidade de ventilação mecânica com uma combinação de quatro fármacos, sendo emtricitabina, tenofovir disoproxil, colchicina e rosuvastatina. De maneira importante, quase todos os pacientes envolvidos tinham SDRA no início do estudo (Gaitán-Duarte et al., 2022). No mais, uma combinação de rosuvastatina e celecoxibe está incluída em um ECR em pacientes com trauma torácico contuso, embora o registro tenha sido atualizado pela última vez há mais de uma década e o status de recrutamento atual seja desconhecido (NCT01623921).

Inibidores da via JAK-STAT são talvez os candidatos mais promissores para a terapia combinada na SDRA. Como mencionado anteriormente, ensaios clínicos grandes como os estudos COV-BARRIER e RECOVERY apoiam o benefício adicional do baricitinibe em populações de pacientes com alta taxa de uso de corticosteroides sistêmicos no início do tratamento (78-80% e 95-96%, respectivamente) (Marconi et al., 2021; RECOVERY Collaborative Group, 2022). Uma conclusão semelhante foi obtida em um estudo que demonstrou a eficácia do tofacitinibe, no qual 89,3% de todos os participantes receberam corticosteroides durante a hospitalização (Guimarães et al., 2021). Ainda, nenhum desses estudos levantou questões de segurança associadas à imunossupressão excessiva, o que encoraja a continuação dos testes com a combinação de corticosteroides e um inibidor da JAK. Em um estudo pioneiro que combina ruxolitinibe e eculizumabe, um anticorpo monoclonal anti-C5a do complemento, pacientes com SDRA associada à COVID-19 mostraram melhora ou uma tendência de melhora em vários parâmetros, incluindo oxigenação (Giudice et al., 2020). Atualmente, combinações do ruxolitinibe com anakinra ou tocilizumabe estão sendo investigadas em pacientes com COVID-19 grave em estágio 2b (pneumonia hipoxêmica e CRP > 150 mg/L) ou estágio 3 (SDRA) da doença (NCT04424056). No mais, o tratamento combinado com ruxolitinibe e sinvastatina não resultou em maior benefício a pacientes com COVID-19 quando comparado ao SoC isolado, o qual incluiu corticosteroides (77%), tocilizumabe (29%) e anticoagulantes (97%) (Garcia-Donas et al., 2023).

A combinação de mais de dois inibidores de citocinas com o SoC também é uma possibilidade, embora a relação risco-benefício seja amplamente desconhecida.

Um exemplo é um estudo prospectivo de coorte que investigou 103 pacientes graves com COVID-19 que receberam simultaneamente o SoC, baricitinibe e secuquinumabe (n = 49) ou SoC, baricitinibe, secuquinumabe e tocilizumabe (n = 54). É importante destacar que todos os pacientes também receberam dexametasona como parte do SoC, o que aumenta o total de imunossupressores em cada grupo para três e quatro, respectivamente (Hasan et al., 2022). A vacinação contra a COVID-19 e a evidência de coinfeção bacteriana ou fúngica no início do estudo foram critérios de exclusão. Em comparação com aqueles que receberam o SoC, baricitinibe e secuquinumabe, os pacientes que receberam todos os medicamentos investigados tiveram uma recuperação mais rápida para $SpO_2 \geq 94\%$ em ar ambiente, menor necessidade de oxigênio suplementar, menor necessidade de UTI, menor necessidade de ventilação mecânica, menor risco de desenvolver SDRA, menor tempo de internação hospitalar e menor taxa de reinternação (Hasan et al., 2022). Em relação à segurança, aqueles que receberam mais inibidores de citocinas mostraram uma tendência de aumento na taxa de infecções secundárias bacterianas (12,2% vs. 18,5%, $p = 0,079$) e aumento significativo na taxa de infecções fúngicas (6,1% vs. 14,8%) ou eventos adversos, principalmente diarreia grave (4,1% vs. 14,8%). A mortalidade por todas as causas em 60 dias foi nominalmente menor no grupo tratado com o SoC, baricitinibe, secuquinumabe e tocilizumabe, embora não tenha atingido significância estatística (Hasan et al., 2022). Com base nesses resultados, é possível que a combinação de múltiplos inibidores de citocinas seja uma abordagem viável na SDRA. No entanto, estudos com maior qualidade de evidência e avaliações detalhadas de segurança são necessários antes que essa estratégia possa ser considerada fora de ensaios clínicos.

Como já mencionado, ensaios clínicos robustos que incluíram corticosteroides sistêmicos (principalmente dexametasona) em combinação com tocilizumabe ou baricitinibe no tratamento da COVID-19 não identificaram sinais de imunossupressão prejudicial (RECOVERY Collaborative Group, 2021; 2022). No entanto, em algumas circunstâncias, o uso de corticosteroides *per se* pode estar associado a danos (Matthay & Wick, 2020), e inibidores de citocinas são comumente associados a um aumento na incidência de infecções graves (Rose-John et al., 2017). Nesse sentido, a segurança da terapia anti-citocina combinada deve ser analisada caso a caso, dado que diferentes combinações podem apresentar riscos diferentes que afetam, em última análise, a relação risco-benefício. Além disso, é necessário considerar com

cautela variáveis como doses, frequência e momento da intervenção, além da etiologia, presença de infecções e gravidade do quadro. Na SDRA, a identificação de subgrupos específicos que têm maior probabilidade de se beneficiar dessa abordagem (e.g. hiperinflamatório vs. hipoinflamatório) também ajudaria a evitar a exposição indevida a imunossupressores. No entanto, dependendo da estratégia de estratificação, a subfenotipagem em tempo real de pacientes continua sendo um desafio a ser superado (Wick et al., 2021).

1.2.3.2. *Insights de estudos experimentais*

A inibição combinada de citocinas é uma tendência de pesquisa em muitas áreas. Recentemente, um estudo interessante investigou se diferentes combinações de ruxolitinibe, anakinra, anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-6R e anti-IL-18 poderiam melhorar a resposta em relação à monoterapia com anti-IFN- γ em um modelo de HLH (Joly et al., 2023). Utilizando camundongos nocaute para perforina infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica, os autores mostraram que a combinação de um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ e ruxolitinibe, mas nenhuma das outras combinações testadas, foi significativamente superior à neutralização do IFN- γ isoladamente. Inclusive, a monoterapia com anakinra ou anti-IL-6R teve alguns efeitos prejudiciais (Joly et al., 2023). Através do mesmo modelo experimental, Meyer et al. (2020) relataram que a adição de ruxolitinibe ao tratamento com dexametasona leva a um melhor controle da hiperinflamação (Meyer et al., 2020). Em resumo, esses estudos apoiam fortemente a superioridade do tratamento combinado para a HLH, particularmente para as combinações envolvendo neutralização do IFN- γ , um inibidor de JAK e/ou corticosteroides. No entanto, é incerto se e *como* esses resultados são relevantes para a SDRA e se diferem nos modelos clássicos de LPA.

Paralelamente, combinações investigadas nos modelos de LPS ou LPS e ventilação mecânica incluem budesonida e N-acetilcisteína (Li et al., 2022), dexametasona e um anticorpo monoclonal anti-G-CSF (fator estimulador da colônia de granulócitos; Banuelos et al., 2017), dexametasona e halofuginona (Du et al., 2022), e MCC950 e anakinra (Wang et al., 2021). Prednisolona, outro corticosteroide, foi combinada com etoposídeo em um modelo de LPA hiperinflamatória induzida por α -galactosilceramida e LPS, e resultou em maior benefício em comparação com cada

monoterapia (Aoyagi et al., 2019). Dois estudos também investigaram os efeitos da monoterapia com fármacos inovadores capazes de inibir simultaneamente citocinas específicas. Por exemplo, Yang et al. (2017) mostraram efeitos anti-inflamatórios de uma proteína de fusão bispecífica anti-IL-17/anti-TNF em camundongos com inflamação sistêmica induzida por LPS, mas a investigação é limitada a poucos parâmetros. Outro fármaco interessante é o CSL311, um anticorpo monoclonal capaz de inibir a sinalização por GM-CSF, IL-5 e IL-3 através da interação com a subunidade beta comum (β_c) do receptor humano. Os autores utilizaram camundongos transgênicos que expressam o β_c humano como uma plataforma de testes, e o CSL311 mostrou ser eficaz na LPA induzida por LPS intranasal, infecção pelo IAV/H3N2 e exposição aguda à fumaça (Fung et al., 2022; Wang et al., 2022). Por fim, Karki et al. (2021) mostraram que a neutralização simultânea de TNF e IFN- γ reduz significativamente a mortalidade em modelos de sepse induzida por LPS, HLH induzida por Poly I:C e LPS, e infecção por SARS-CoV-2 (Karki et al., 2021).

Embora limitados em sua capacidade individual de generalização, esses estudos apoiam coletivamente a hipótese de que a combinação de drogas anti-citocina desempenha um papel relevante na terapêutica da SDRA. Além disso, eles apontam para os corticosteroides como um dos candidatos imediatos para tais combinações, o que pode servir como ponto de partida para pesquisas clínicas e não clínicas futuras. Ainda assim, seria altamente benéfico explorar abordagens mais seletivas, como a inibição direta de citocinas ou de receptores específicos. Em comparação com fármacos cujos alvos são fatores de transcrição ou quinases, ter citocinas ou receptores como alvos terapêuticos contribui à redução de efeitos colaterais e do risco de imunossupressão. De fato, uma limitação das evidências experimentais disponíveis é que as diferentes combinações de drogas foram predominantemente estudadas em modelos de inflamação estéril, como o do LPS. Compreender como a terapia combinada afeta a defesa do hospedeiro durante ou após uma infecção é crucial, e deve ser especificamente avaliado em pesquisas futuras. Também vale a pena investigar se a terapia combinada anti-citocina pode ser efetivamente pareada a drogas que atuam contra patógenos. Não surpreendentemente, evidências acumuladas sugerem que agir simultaneamente contra a inflamação e a infecção é uma estratégia melhor do que apenas uma ou outra abordagem (Pandey et al., 2023).

Por fim, modelar uma síndrome complexa, heterogênea e parcialmente incompreendida é um desafio por si só, e nenhuma abordagem experimental é representativa de toda a complexidade da SDRA. Assim, à medida que aprendemos mais sobre os subfenótipos da SDRA, descobrir como os modelos experimentais podem melhorar a partir desse conhecimento pode ajudar no desenvolvimento de terapias direcionadas a um subfenótipo específico. Nesse sentido, se os modelos de LPA/SDRA atuais são capazes de expressar ou representar subfenótipos distintos ainda é desconhecido e assunto de pesquisa em andamento (Carla et al., 2020).

1.2.4. Conclusões e perspectivas

Quase todas as citocinas têm efeitos homeostáticos e patogênicos, fazendo da inibição da sinalização em doenças críticas, como a SDRA, um desafio. O tratamento precoce com fármacos anti-citocina pode facilitar infecções primárias ao mesmo tempo em que aumenta o risco de infecções secundárias. Por outro lado, a imunomodulação tardia em uma lesão pulmonar de rápida evolução pode ser difícil de se provar eficaz devido ao estabelecimento da lesão tecidual e do comprometimento da função respiratória. Com base no conhecimento atual, os efeitos da terapia anti-citocina na LPA e SDRA são provavelmente citocina- e patógeno-dependentes, e identificar o momento adequado para a intervenção em cada caso continua sendo um desafio importante que deve ser abordado no desenho de ensaios clínicos e não clínicos. É importante ressaltar que, para muitos casos, ainda não está claro se um aumento inicial ou tardio de uma citocina circulante constitui um alvo passível de intervenção terapêutica, uma consequência menos importante de eventos anteriores, ou simplesmente um “espectador”.

Em maior ou menor grau, todas as principais citocinas e os efeitos de sua inibição foram investigados. Dessa forma, na **Figura 10**, apresenta-se uma visão geral do tratamento anti-citocina para a LPA/SDRA dividida por tipo de pesquisa e nível de evidência. Notavelmente, apenas alguns fármacos têm dados suficientes para sustentar seu status como terapias promissoras (representados em azul). Entre eles, anakinra, tocilizumabe, e baricitinibe são os exemplos mais proeminentes, e os dados atuais apoiam a necessidade da seleção de pacientes guiada por biomarcadores e/ou da combinação com corticosteroides para se obter benefício clínico. De fato, um papel

emergente dos corticosteroides reside nas terapias combinadas, particularmente em associações com drogas capazes de reduzir a ativação da via JAK-STAT, como inibidores de IL-6, IFN- γ ou JAK. No entanto, a soma das evidências clínicas está fortemente enviesada para pacientes com pneumonia grave por infecção com SARS-CoV-2. Portanto, uma droga ou combinação de drogas considerada eficaz nesse contexto específico pode não se traduzir em tratamento eficaz da SDRA de outras fontes. Outra observação interessante é que, com exceção da inibição do inflamassoma NLRP3, todas as estratégias terapêuticas emergentes com bom suporte pré-clínico (vermelho claro na **Figura 10**) são atualmente representadas por um ou mais fármacos com pelo menos algum nível de suporte clínico (azul e amarelo). Isso sugere que, embora falíveis, os modelos animais de LPA são úteis na identificação de terapias anti-citocina candidatas, e que melhorar a pesquisa pré-clínica em termos de validade deve também fortalecer a pesquisa translacional.

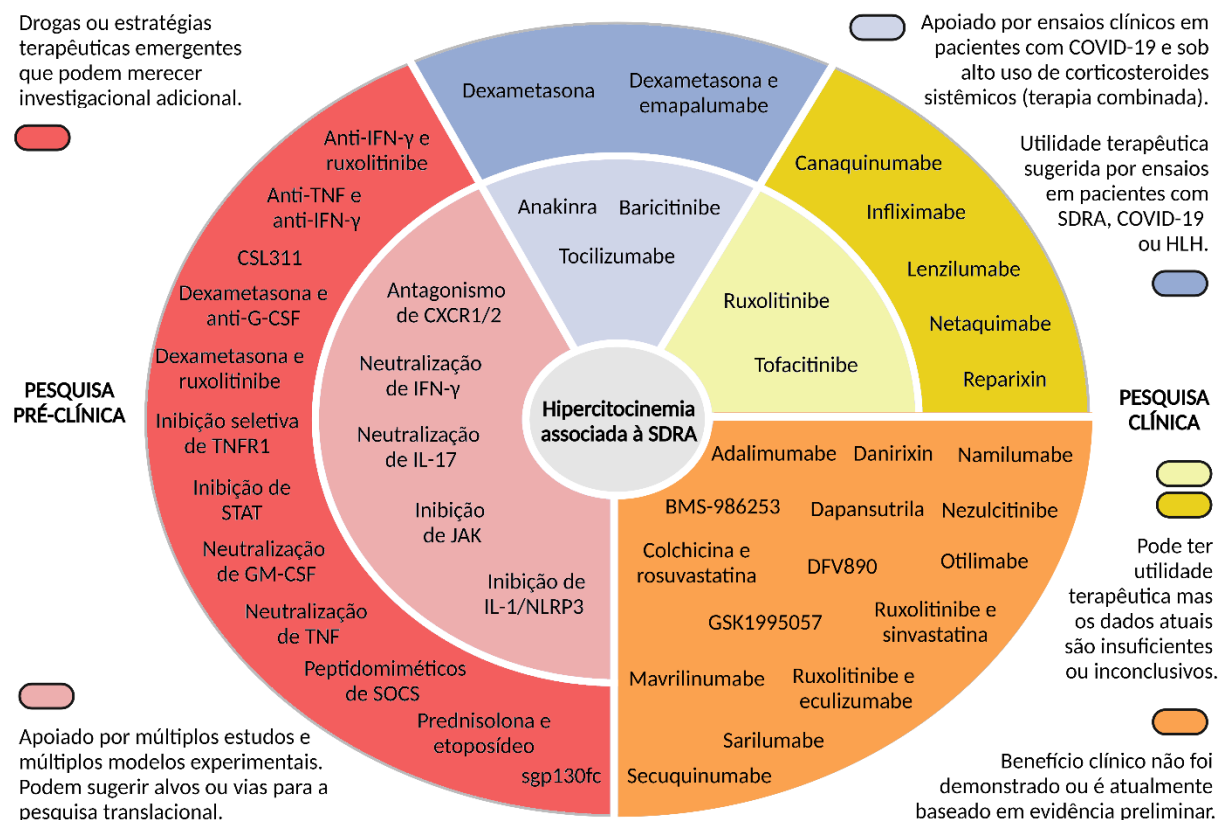


Figura 10. Visão geral do tratamento anti-citocina para a LPA/SDRA de acordo com as evidências atuais. Fármacos e estratégias terapêuticas revisados foram categorizados de acordo com o tipo de pesquisa (pré-clínica ou clínica) e nível de evidência (aumenta no sentido anti-horário e em direção ao centro, conforme indicado pelas cores). Um breve resumo para cada categoria é fornecido na figura. Inclusões na categoria "altamente incerto" (em laranja) não foram subagrupadas por evidências, posto que todos tiveram apenas um estudo revisado e os resultados são negativos ou preliminares. Referências e informações de apoio são encontradas no texto. Criado com BioRender.

No geral, apesar de alguns avanços potencialmente importantes, vários impedimentos relacionados às terapias anti-citocina na LPA/SDRA ainda persistem. Na visão do autor, esforços futuros devem investigar se a terapia combinada anti-citocina é eficaz na SDRA não associada à COVID-19, quais combinações de drogas devem ser priorizadas para testes, quais subgrupos de pacientes têm maior probabilidade de se beneficiar ou de ser prejudicados, e como o uso de modelos experimentais pode ser aprimorado para acomodar a evolução no entendimento dos subfenótipos.

1.3. MODELAGEM EXPERIMENTAL DA LPA/SDRA EM CAMUNDONGOS

1.3.1. Estratégias e validade translacional

Humanos e camundongos diferem consideravelmente quanto à estrutura do sistema respiratório (**Quadro 7**). Somadas a outros fatores, divergências entre as espécies impõem uma dificuldade natural na pesquisa translacional da SDRA (Matute-Bello et al., 2008) que é comum à maioria, se não todos, os modelos animais de condições humanas.

Quadro 7. Comparação do trato respiratório de humanos e camundongos.

Característica	Humano	Camundongo
Respiração nasal	Opcional	Obrigatória
Postura corporal	Bípede	Quadrúpede
Capacidade pulmonar total	6000 ml	1 ml
Taxa respiratória	12-16/min (adulto)	250-300/min (adulto)
Lobação pulmonar	Direito: 3 lobos Esquerdo: 2 lobos	Direito: 4 lobos Esquerdo: 1 lobo
Ramificação das vias aéreas condutoras	17 a 21 gerações, padrão de ramificação dicotômico	13 a 17 gerações, padrão de ramificação monopodial
Espessura da barreira sangue-gás	0.62 μm	0.32 μm
Diâmetro alveolar	210 μm de interceptação linear média	80 μm de interceptação linear média
Células em clava	Presente	Maior número em relação ao humano
BALT	Amplamente ausente em humanos saudáveis	Variável mas quantidade significativa presente em camundongos saudáveis

BALT = tecido linfoide associado ao brônquio. Fonte: traduzido de Aeffner et al., 2015.

Diante de muitas limitações e, por enquanto, nenhum sucesso translacional em termos de farmacoterapia, grande esforço tem sido realizado para dar consistência à definição da SDRA experimental e guiar a pesquisa pré-clínica em termos de validade. Na verdade, posto que a definição da SDRA depende exclusivamente de critérios clínicos específicos, o equivalente pré-clínico é mais precisamente referido como somente LPA. Assim, para que se verifique a validade de um modelo animal de LPA, a *American Thoracic Society (ATS)* sugere a confirmação da presença de ao menos três das quatro características principais: a) evidência histológica de lesão tecidual; b) alteração da integridade da barreira alvéolo-capilar; c) presença de resposta inflamatória; e d) disfunção fisiológica (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022). Sob essa perspectiva, diferentes modelos experimentais podem ser utilizados para o estudo da LPA e a triagem de novas terapias (revisado em Matute-Bello et al., 2008).

De maneira parecida com a condição em humanos, modelos experimentais de LPA podem ser gerados a partir de insultos diretos ou indiretos. Modelos indiretos promovem lesão pulmonar através de um insulto extrapulmonar e incluem modelos ligados à sepse e isquemia-reperfusão. Já os modelos diretos baseiam-se na administração local (i.e., no trato respiratório) de um ou mais insultos, incluindo-se bleomicina, ácido, bactérias, vírus e produtos bacterianos ou virais, além de hiperóxia e ventilação mecânica (Matute-Bello et al., 2008). Há diferenças consideráveis entre estratégias diretas e indiretas (Chimenti et al., 2020; Menezes et al., 2005) e nenhum dos modelos é considerado o “padrão-ouro”. Portanto, a escolha deve estar baseada nas características e nos objetivos particulares da pesquisa (Matute-Bello et al., 2011). A administração de LPS, um glicolípido altamente imunogênico que compõe a membrana externa de bactérias gram-negativas, é um dos modelos de LPA mais comuns atualmente (Matute-Bello et al., 2008; 2011).

1.3.2. Modelo experimental de LPA induzido por LPS

Há pelo menos três décadas de utilização, o modelo experimental de LPA induzido por LPS é uma ferramenta importante no entendimento dos mecanismos de hiperinflamação e dano associados à disfunção respiratória (Chen et al., 2010). Destaca-se, ainda, que doses seguras de LPS são usadas para testar hipóteses diretamente em humanos, e podem servir como uma prova de conceito preliminar para

o desenvolvimento de medicamentos (Janssen et al., 2013). De maneira geral, é um modelo experimental versátil, reprodutível e de rápida indução, além de ser capaz de atender todos os critérios sugeridos pela ATS (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022).

1.3.2.1. Mecanismos de reconhecimento e resposta ao LPS

A resposta imune ao LPS envolve ao menos dois mecanismos principais: a ativação de receptores do tipo Toll 4 (TLR4) e a ativação de caspase-11. Na sinalização mediada por TLR4, monômeros de LPS são transferidos pela proteína ligante de LPS (LBP) à proteína CD14 ancorada na membrana celular. Esse processo requer a formação de um complexo intermediário LBP/LPS/CD14. Em seguida, o LPS é transferido à MD-2, uma proteína ligada ao TLR4, e induz a formação de homodímeros do complexo TLR4/MD-2/LPS (Zamyatina & Heine, 2020).

A partir dessa estrutura, duas vias de sinalização intracelular são ativadas. Na primeira, o complexo (TLR4/MD-2/LPS)₂ ancorado à membrana promove o recrutamento da proteína MyD88 (do inglês *myeloid differentiation primary response protein 88*), seu adaptador TIRAP (do inglês *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*) e quinases da família IRAK (do inglês *IL-1R-associated kinase*). A estrutura resultante, o midossoma, leva à ativação dos fatores de transcrição gênica NF-κB (fator nuclear κB) e AP1 (proteína ativadora 1) que, por fim, induzem rápida expressão de genes inflamatórios (Kieser & Kagan, 2017; Zamyatina & Heine, 2020). Na segunda via de sinalização, o complexo (TLR4/MD-2/LPS)₂ sofre endocitose mediada por CD14 e recruta um outro conjunto de proteínas, a TRIF (do inglês *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ*) e seu adaptador TRAM (do inglês *TRIF-related adaptor molecule*). O resultado é, embora ainda incerto, a formação no endossoma de uma estrutura supramolecular chamada trifossoma (Kieser & Kagan, 2017). A montagem dessa estrutura induz novamente a ativação de NF-κB e AP1, além de resposta mediada pelo fator regulador de interferon 3 (IRF3) que resulta na produção de interferons do tipo I (Kieser & Kagan, 2017, Zamyatina & Heine, 2020).

Em oposição à detecção no ambiente extracelular, o segundo mecanismo principal de resposta ao LPS envolve o reconhecimento da molécula no ambiente

intracelular. Neste caso, a resposta ocorre por ligação direta do LPS à caspase-11 em camundongos (Kayagaki et al., 2011) ou caspase-4 e 5 em humanos (Shi et al., 2014). Embora este seja um processo independente de TLR4, o aumento da expressão de procaspase-11 (cuja presença constitutiva é baixa) é induzido pela ativação do eixo TLR4-TRIF e de receptores de interferon (Napier et al., 2016). Isso evidencia uma importante convergência entre o reconhecimento extra- e intracelular de LPS que promove a amplificação da resposta (Zamyatina & Heine, 2020). Uma vez que o LPS intracelular é reconhecido, a ligação resulta na oligomerização e ativação da caspase-11, que por sua vez cliva a proteína (GSDMD) e libera o fragmento N-terminal (GSDMD^{N-term}), causando piroptose (Kayagaki et al., 2015). Por fim, o efluxo de K⁺ gerado pela piroptose atua como gatilho para o processamento e liberação de IL-1 β e IL-18 através de um processo conhecido como ativação não-canônica do inflamassoma NLRP3 (Rivers-Auty & Brough, 2015). Os mecanismos de reconhecimento e resposta ao LPS descritos acima estão ilustrados na **Figura 11**.

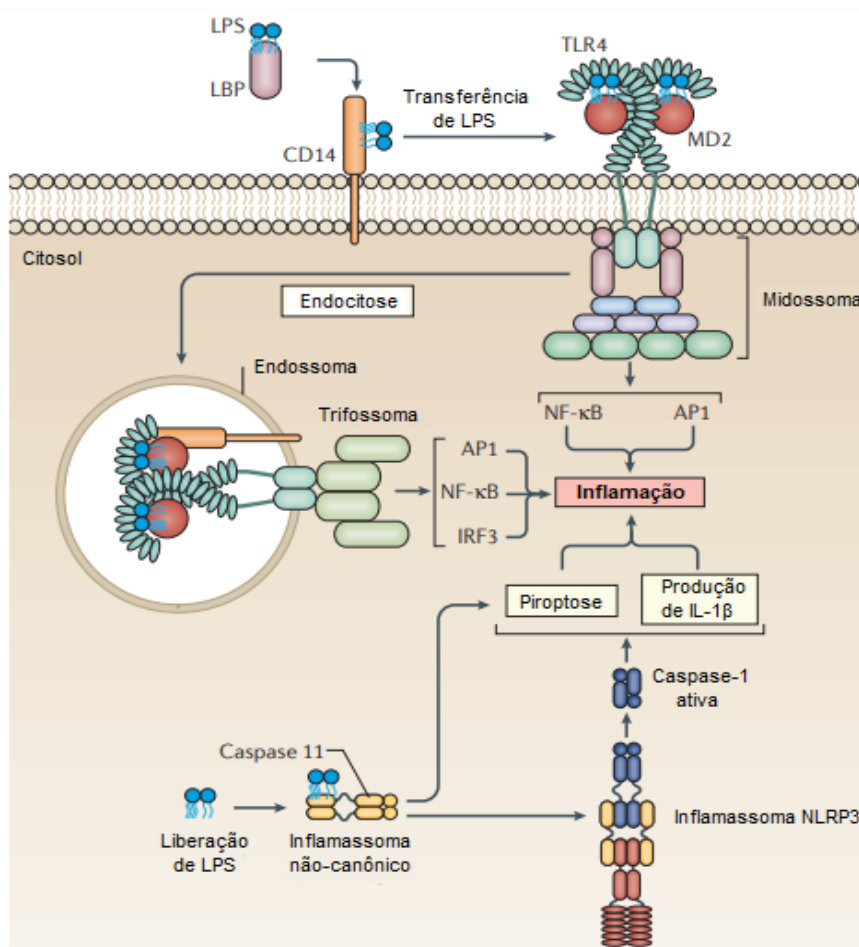


Figura 11. Vias de sinalização celular pró-inflamatória induzidas por LPS. LBP = proteína ligante de LPS. TLR4 = receptor do tipo Toll 4. MD2 = fator de diferenciação mieloide 2. AP1 = proteína ativadora 1. NF-κB = fator nuclear κB. IRF3 = fator regulatório de interferon 3. Fonte: adaptado de Kieser & Kagan (2017).

1.3.2.2. Visão geral e aspectos práticos

No estudo da LPA/SDRA em animais de laboratório, a administração do LPS pode ser local (inalatória, intranasal ou intratraqueal) ou sistêmica (intravenosa ou intraperitoneal), e há variação considerável nos protocolos. Em camundongos, se considerada somente a via intratraqueal, as doses utilizadas variam entre 0,1 e 25 mg/kg dependendo do objetivo (Calkins et al., 2002; Xu et al., 2015), e têm por consequência uma grande amplitude no grau de alterações celulares, moleculares e fisiológicas. A LPA induzida por LPS também sofre influência genética (Alm et al., 2010a; 2010b) e do sexo dos camundongos, com machos sendo em geral mais responsivos do que fêmeas (Card et al., 2006; Carey et al., 2007). Outro fator crítico é o tempo entre o insulto e a avaliação, posto que a resposta imune induzida é bastante dinâmica (Domscheit et al., 2020). Por exemplo, enquanto a expressão local de algumas citocinas tende a ter um pico logo nas primeiras horas, a infiltração de leucócitos no espaço broncoalveolar tem uma ascensão menos abrupta e que pode durar várias horas ou dias (Alm et al., 2010b; Domscheit et al., 2020; Jeyaseelan et al., 2004; Mock et al., 2020; Verjans et al., 2018). A disfunção pulmonar, por sua vez, é observada em fases mais tardias da resposta, mas pode ser limitada ou ausente a depender do protocolo (Bittencourt-Menark et al., 2017; Devos et al., 2017, Kastis et al., 2013; Khadangi et al., 2021; Verjans et al., 2013; 2018). Portanto, na LPA induzida por LPS, é esperado que diferentes indicadores de inflamação e lesão pulmonar tenham perfis dose- e tempo-dependentes também diferentes.

Nesse contexto, e com base nas recomendações da ATS (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022), este trabalho teve como objetivo adicional a caracterização *in loco* do modelo experimental de LPA induzido por LPS. Com isso, objetivou-se assegurar a validade do modelo experimental para o teste da hipótese, além de se investigar o perfil da resposta inflamatória que subsidia a interpretação dos resultados.

1.4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Infecções respiratórias graves e sepse são problemas de saúde pública global com alta prevalência. Uma das principais complicações clínicas é o desenvolvimento

de SDRA, cujo tratamento dispõe de instrumentos e procedimentos avançados mas carece de farmacoterapia específica. Dada a crescente preocupação com bactérias resistentes à antibióticos e a iminência de novas pandemias virais como a de COVID-19, é imperativo que o desenvolvimento de medicamentos para a SDRA seja incluído nos esforços de preparação dos sistemas de saúde global.

Com base na literatura científica atual, uma vertente importante de pesquisa no campo da LPA/SDRA trata da patogênese mediada por citocinas pró-inflamatórias e a capacidade de fármacos inibidores de modificar este processo. Como apresentado na introdução desta tese, estudos recentes têm revelado novas perspectivas no uso desses fármacos, incluindo-se a elegibilidade ao tratamento baseada em biomarcadores e a combinação de duas ou mais drogas. Contudo, devido às lacunas nos dados de eficácia terapêutica, é necessário que mais pesquisas pré-clínicas sejam realizadas para subsidiar os estudos clínicos. Deste modo, este trabalho busca contribuir para a investigação do potencial terapêutico de drogas anti-citocina na LPA/SDRA e para a identificação de combinações dessas drogas que podem justificar a avaliação aprofundada em estudos pré-clínicos e clínicos futuros.

1.5. HIPÓTESE

Ante ao exposto na Introdução deste documento de tese, postulou-se a hipótese de que as combinações de dexametasona e baricitinibe, de anticorpos neutralizantes de TNF e IFN- γ , e de dinaciclibe e MCC950, são superiores à monoterapia no controle da inflamação e de alterações hematológicas, fisiológicas e funcionais em um modelo experimental de LPA induzido por administração intratraqueal de LPS em camundongos.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da monoterapia e coadministração de dexametasona e baricitinibe, de anticorpos neutralizantes de TNF e IFN- γ , e de dinaciclibe e MCC950, sobre parâmetros associados à inflamação, lesão e disfunção pulmonar, em

camundongos da linhagem CD-1 submetidos ao modelo experimental de LPA induzido por instilação intratraqueal de LPS.

1.6.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tempo-dependentes da instilação intratraqueal de LPS e o perfil de alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos e fêmeas;
- Avaliar o perfil de liberação de citocinas no espaço broncoalveolar e os efeitos sexo-dependentes em camundongos submetidos a instilação intratraqueal de LPS;
- Avaliar o perfil de alteração da mecânica respiratória basal e os efeitos sexo-dependentes em camundongos submetidos a instilação intratraqueal de LPS;
- Avaliar os efeitos dose-dependentes da instilação intratraqueal de LPS sobre o peso corporal, indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos;
- Avaliar a farmacocinética da dexametasona e do baricitinibe no plasma e pulmões de camundongos machos *naive* após coadministração única.
- Avaliar os efeitos da monoterapia e do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre o peso corporal, indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica, em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS;
- Avaliar os efeitos da monoterapia e do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a expressão gênica pulmonar em 24 horas após a instilação intratraqueal de LPS em camundongos machos
- Avaliar os efeitos do tratamento com controle isotípico (IgG1 de hamster armênio) sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica, em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS
- Avaliar os efeitos da monoterapia e do cotratamento com anticorpos neutralizantes de TNF e de IFN- γ sobre o peso corporal, indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica, em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS;

- Avaliar os efeitos da monoterapia e do cotratamento com dinaciclib e MCC950 sobre o peso corporal, indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica, em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTOS GERAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos e fêmeas adultos da linhagem não-isogênica CD-1. Esta linhagem foi selecionada por ter sido demonstrada, dentre outras sete linhagens, como uma das mais susceptíveis à LPA induzida por instilação intratraqueal de LPS (Alm et al., 2010; 2010b). Fêmeas foram avaliadas especificamente na fase inicial dos experimentos de padronização (primeiro bloco experimental) e posteriormente, com base nos resultados, somente machos foram utilizados. A idade dos animais no início dos experimentos foi de oito a doze semanas, a menos que especificado, e o peso aproximado foi de 30 ± 5 g para fêmeas e 40 ± 5 g para machos. Os camundongos foram criados em condições livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *specific-pathogen-free*) no biotério de criação do Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP) e transportados ao biotério de manutenção sete dias antes do início dos experimentos. Uma vez obtidos, os camundongos foram mantidos em gaiolas medindo 23,5 x 42,5 x 17,5 cm (L x C x A) conectadas a racks microisoladoras com, no máximo, cinco animais por gaiola, em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade entre 45 e 70%. Foi utilizado ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:30) com acesso livre a água e ração. A ração (Nuvilab CR1®, Nuvital) foi autoclavada e a água foi filtrada, clorada e embalada no equipamento Hydropac® (Lab Products) antes de serem disponibilizados. O CIEnP realiza mensalmente a avaliação da potabilidade da água fornecida aos animais. Todas as gaiolas tiveram forração do tipo maravalha aspen (Souralit®), material para nidificação e um pequeno bloco de madeira aspen para enriquecimento ambiental. A maravalha utilizada foi previamente autoclavada e renovada periodicamente.

2.2. RANDOMIZAÇÃO, CEGAMENTO E BOAS PRÁTICAS CIENTÍFICAS

A fim de reduzir ao máximo os desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados critérios propostos pelo guia ARRIVE (Kilkenny et al., 2010; Lilley et al., 2020; Percie du Sert et al., 2020). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente

aplicados: a) nenhum dado válido foi omitido para o cálculo das médias e análise estatística; b) os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais; c) os experimentos foram realizados de forma cega, ou seja, o experimentador não teve conhecimento prévio sobre o grupo experimental a que pertenceu o animal ou material analisado; d) os experimentos que foram conduzidos em blocos tiveram sempre todos os grupos experimentais representados; e) os métodos de análise estatística foram definidos em planejamento prévio.

A distribuição aleatória dos animais foi realizada por meio de ferramenta de randomização online (random.org). Em experimentos em que não há uma intervenção de interesse (padronização/caracterização), ou que incluíram apenas tratamento prévio, ou no estudo de farmacocinética, os animais foram randomizados antes do início do protocolo. Em experimentos em que o tratamento iniciou somente após a aplicação do modelo, a randomização foi realizada em um processo de duas etapas. Primeiro, os indivíduos foram distribuídos entre controles negativos (sham) e de indução (LPS). Depois, após as instilações intratraqueais de LPS ou salina, os animais que receberam LPS foram novamente randomizados entre os grupos experimentais com um ou mais fármacos de interesse e os respectivos veículos.

2.3. BEM-ESTAR ANIMAL E PONTO FINAL HUMANITÁRIO

As avaliações de peso corporal e bem-estar dos animais ocorreram ao menos uma vez por dia em todos os dias durante os experimentos. O ponto final humanitário foi definido por um escore de sinais clínicos ≥ 4 , sendo atribuído escore de 1 para cada uma das cinco características a seguir: a) piloereção, posição curvada e olhos semifechados; b) respiração abdominal laboriosa com redução de taxa respiratória e/ou cianose; c) letargia ou decúbito prolongado; d) relutância a mover-se frente a estímulo; e e) perda de peso $\geq 20\%$ em relação ao basal. Se detectado um escore igual a 3, a frequência de avaliação foi aumentada para duas vezes por dia (no início da manhã e final da tarde). Verificado o atingimento do ponto final humanitário, o animal foi eutanasiado imediatamente por sobredose de anestésico barbitúrico (pentobarbital, 200 mg/kg i.p.). Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CIEnP (protocolo nº 302/00 e adendo 001).

2.4. MODELO EXPERIMENTAL DE LPA INDUZIDO POR LPS

O modelo experimental de LPA foi induzido a partir de uma única instilação intratraqueal (i.t., método transtraqueal) de LPS (*E. coli* O127:B8; L3129, Sigma-Aldrich) em doses variadas, conforme indicado em cada seção e descrito a seguir. A potência do LPS (em unidades de endotoxina [EU] por mg) foi obtida no certificado de análise fornecido pela fabricante. Para a padronização inicial (primeiro bloco experimental) utilizou-se $7,5 \times 10^6$ EU/kg e, posteriormente, foi realizada uma curva dose-resposta com as doses 0,3, 0,75, 1,5 e $7,5 \times 10^6$ EU/kg (segundo bloco experimental). A partir destes ensaios, a dose de $3,0 \times 10^6$ EU/kg foi selecionada para a subsequente avaliação das drogas de interesse e suas respectivas combinações.

A preparação da solução de LPS foi realizada em solução salina estéril (NaCl 0,9%) na concentração de 5 mg/ml com auxílio de agitação e aquecimento (10 minutos em banho-maria a 50°C). Alíquotas de uso único foram mantidas congeladas (-20°C) em microtubos de baixa-retenção e sonicadas por 5 minutos antes da diluição para a concentração de trabalho. As concentrações de trabalho de LPS foram preparadas imediatamente antes do início do experimento e a solução foi homogeneizada antes de cada instilação. As doses de LPS e os procedimentos de administração foram adaptados de protocolos publicados (Ehrentraut et al., 2019; Helms et al., 2010).

Para aplicação do modelo experimental (**Figura 12**), os animais foram inicialmente anestesiados com associação de ketamina (100 mg/kg, i.p.; Syntec) e xilazina (10 mg/kg i.p.; Ceva) e fixados em posição supina a 45° em plataforma de intubação (ETI-MSE-01, Kent Scientific). A fim de expor com clareza a região do pescoço, uma linha cirúrgica foi utilizada para tracionar os incisivos superiores no sentido oposto ao corpo. A assepsia da região da incisão foi realizada com solução de clorexidina 0,5% (Rioquímica), e solução salina foi utilizada para umedecer os olhos dos animais durante o procedimento e evitar danos por ressecamento à visão. Para anestesia local, foi utilizada uma injeção subcutânea sob a linha de incisão com volume fixo de 60 µL de uma mistura de lidocaína 0,5% (sem broncoconstritor; Bravet) e bupivacaína 0,25% (Cristália), baseado em Durst et al. (2021). Após cerca de 2 minutos, uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm foi realizada na região do pescoço seguido da separação do tecido subjacente e exposição da traqueia. Em seguida, foi realizada instilação intratraqueal de LPS ou salina (sham), em volume de

1 $\mu\text{L/g}$, através de perfuração do ligamento cricotraqueal (região imediatamente acima do primeiro anel traqueal) com agulha G26 acoplada a uma seringa.

Após o procedimento de administração, a incisão foi suturada e os animais foram mantidos em gaiolas separadas, aquecidos, em posição supina e em inclinação positiva (aproximadamente 30°) até a recuperação da anestesia. Quando capazes de retornar para a posição prona, os animais foram devolvidos à caixa-moradia original e periodicamente monitorados conforme descrito no tópico anterior. Não foi utilizado analgesia sistêmica.

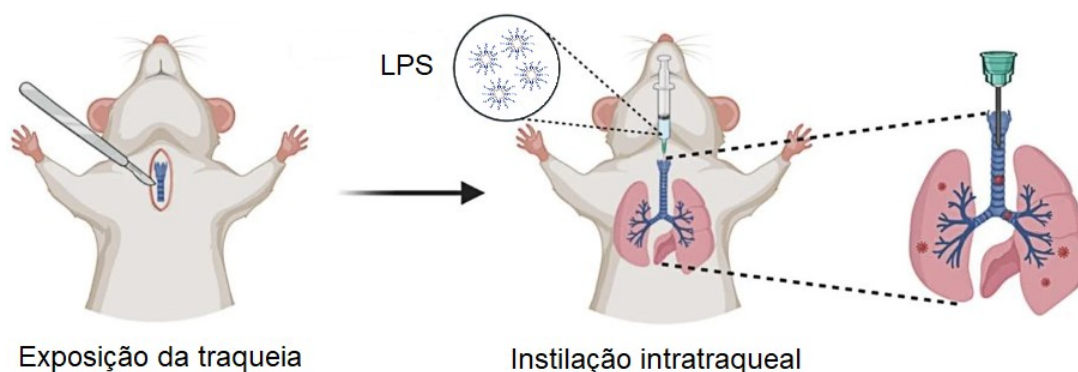


Figura 12. Procedimento de instilação intratraqueal de LPS (método transtraqueal) utilizado na indução do modelo de LPA. Pontos vermelhos na imagem à direita ilustram a distribuição da solução instilada para o trato respiratório inferior. Fonte: adaptado de Hong et al. (2021).

2.5. DROGAS E TRATAMENTOS

A dexametasona (Decadron Injetável, Aché Laboratórios Farmacêuticos) foi diluída em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e administrada na dose de 10 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.; 10 ml/kg) uma vez ao dia por três dias (exceto quando especificado), conforme trabalho prévio (Sefik et al., 2022). O baricitinibe (HY-15315, MedChemExpress) foi preparado em solução 5% DMSO + 45% PEG400 + 10% KOLLIPHOR® RH 40 (2,5% em água ultrapura tipo I) + 40% salina e administrado na dose de 10 mg/kg por gavagem (v.o.; 10 ml/kg) duas vezes ao dia por três dias (exceto quando especificado), conforme trabalho publicado (Fridman et al., 2010). O dinaciclibe (HY-10492, MedChemExpress) foi preparado em solução de 20% hidroxipropil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich) em salina estéril e administrado na dose de 2,5 mg/kg por injeção i.p. (10 ml/kg) duas vezes no primeiro dia e uma vez ao dia nos dois dias subsequentes, com base em estudo publicado (Wu et al., 2022). O MCC950 (PZ0280, Sigma-Aldrich) foi preparado em solução salina estéril e

administrado na dose de 10 mg/kg por gavagem (10 ml/kg) duas vezes no primeiro dia e uma vez ao dia por mais dois dias, com base em estudo publicado (Zeng et al., 2022). Para os casos descritos, animais controle receberam por gavagem e/ou injeção i.p. os mesmos volumes proporcionais contendo apenas as soluções veículo.

Nos experimentos de neutralização com anticorpos monoclonais, foi realizada administração única via i.p com volume fixo de 300 µl de solução salina estéril contendo 500 µg de anticorpo contra TNF murino (T-703, Leinco Technologies), 500 µg de anticorpo contra IFN-γ murino (I-1190, Leinco Technologies) ou 500 µg de cada um dos anticorpos em combinação. Animais controle receberam 500 µg (ou 1000 µg, quando indicado) de controle isotípico (IgG₁ de hamster armênio; P376, Leinco Technologies). A capacidade neutralizante *in vivo* dos anticorpos anti-TNF e anti-IFN-γ foi previamente testada por Karki et al. (2021), trabalho no qual foi baseado o protocolo de tratamento. Os anticorpos foram adquiridos no formato *pathogen-free* (IDEXX Impact), divididos assepticamente em alíquotas de uso único em microtubos de baixa-retenção e mantidos em ultrafreezer (-80°C) até o uso.

As soluções de trabalho das drogas foram preparadas no início ou durante o experimento. O tratamento com dexametasona, baricitinibe, dinaciclibe ou MCC950 foi iniciado 2 horas após a instilação i.t. de LPS. Os anticorpos neutralizantes ou controle isotípico foram administrados 1 hora antes do LPS.

2.6. LAVADO BRONCOALVEOLAR E CONTAGEM DE CÉLULAS

O procedimento para obtenção de FLBA foi adaptado de Van Hoecke et al. (2017). Foram utilizados três ciclos de injeção e aspiração (com “massagem” no tórax) de 1 mL de PBS autoclavado e gelado contendo 0.1 mM EDTA. O fluido foi centrifugado (500 x g, 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi separado e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até posterior análise. O *pellet* com células remanescente foi ressuscitado na mesma solução de PBS/EDTA 0.1 mM e processado conforme descrito a seguir. Nos experimentos de padronização (primeiro e segundo blocos experimentais) a contagem total de células foi realizada por meio da análise da suspensão em analisador hematológico automático veterinário (BC-5300Vet, Mindray). Para todos os experimentos subsequentes, a contagem de células foi realizada manualmente através de diluição em reagente de Turk (Dinâmica) e um

hemocítômetro. Para análise diferencial de leucócitos, uma segunda parte da suspensão de células foi submetida à citocentrifugação (1000 rpm por 5 minutos) e coloração de Romanowsky (Panóptico Rápido, LaborClin), seguida da contagem de 200 células por amostra.

2.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NO FLBA

A quantificação de proteína em amostras de sobrenadante do FLBA foi realizada pelo método de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich) em placas translúcidas de 96 poços e leitura de absorbância em 595 nm, conforme instruções do fabricante. A concentração proteica nas amostras foi determinada a partir da interpolação de curva-padrão de sete pontos (0,1 – 1,4 mg/ml) com solução de albumina sérica bovina (A9418, Sigma-Aldrich).

2.8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO FLBA

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12_{p70}, IL-17, IFN- γ , MCP-1 e TNF foram quantificadas por citometria de fluxo através de kits de *cytometric bead array* (CBA) da BD Biosciences (560485, Mouse Th1/Th2/Th17 Kit; 552364, Mouse Inflammation Kit) conforme instruções do fabricante. A quantificação de TNF (especificamente no primeiro bloco experimental) e de IL-1 β foi realizada por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com kits DuoSet ELISA (DY401 e DY410, R&D Systems) conforme instruções do fabricante.

2.9. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

O sangue foi coletado por punção cardíaca imediatamente após a eutanásia. Em seguida, uma amostra de 90 μ L de sangue foi misturada a 10 μ L de solução 5% EDTA (em água deionizada) e submetida a analisador hematológico automático veterinário (BC-5300Vet, Mindray). Para os resultados foi considerada a porcentagem de neutrófilos e/ou linfócitos encontrados na amostra.

2.10. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES

Somente foram utilizadas para a análise histopatológica amostras de animais não submetidos ao procedimento de lavado broncoalveolar. Após eutanásia, os pulmões foram removidos, inflados e fixados em solução 10% de formalina tamponada, emblocados em parafina e depois seccionados em cortes longitudinais (3 μm) do órgão inteiro. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e 10 fotomicrografias por amostra (único corte; magnificação de 200 vezes) foram obtidas de campos não-redundantes utilizando-se uma câmera acoplada ao microscópio (Eclipse E200, Nikon). As imagens obtidas foram analisadas de maneira digital e quantitativa através do software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), conforme adaptado de publicação prévia (Bermudez et al., 2022). A aquisição e análise das imagens foi realizada de maneira cega por um único observador. Para análise, as imagens foram segmentadas por limiar de cor e a área relativa às regiões não-marcadas (fundo branco) foi medida (**Figura 13**). A fração de área corada foi então calculada pela fórmula $100 - \left(\frac{\text{Área não-marcada}}{\text{Área total}} * 100 \right)$. Para cada animal, a porcentagem de área marcada por H&E foi calculada a partir da média das 10 fotomicrografias.

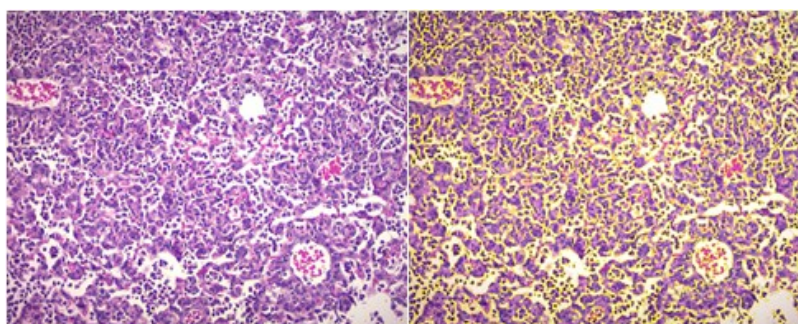


Figura 13. Análise histopatológica por imagem. Exemplo de segmentação (contorno amarelo à direita) entre a área corada por H&E e o fundo branco em fotomicrografia de tecido pulmonar (72 horas após $7,5 \times 10^6$ EU/kg de LPS i.t) por meio de análise de imagem pelo software ImageJ. Magnificação de 200 vezes. Fonte: acervo do autor.

2.11. ANÁLISE DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A avaliação da mecânica respiratória basal foi realizada por meio da técnica de oscilação forçada e da medição da relação pressão-volume, conforme descrito a seguir. Inicialmente, os animais foram anestesiados com injeção de 8 mg/kg (i.p.) de

xilazina (Ceva) seguida, após cinco minutos, de injeção de 50 mg/kg (i.p.) de pentobarbital (Sigma-Aldrich). Após sedação, foi realizada a traqueostomia (com tórax fechado) e canulação com agulha de baixa resistência 18G (XS-CK18, SCIREQ) inserida por uma distância de cinco anéis traqueais e fixada com fio de algodão. Em seguida, os indivíduos foram conectados pela cânula ao sistema flexiVent (SCIREQ), um ventilador mecânico controlado por computador capaz de executar manobras (perturbações) e mensurar propriedades do sistema respiratório de pequenos roedores (**Figura 14A**; Ahookhosh et al., 2023). Para a ventilação mecânica foi utilizado volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 150 respirações/minuto, razão de inspiração e expiração de 2:3 e PEEP de 3 cmH₂O. Após acoplamento do animal e início da ventilação, foi aplicada uma injeção de 0,8 mg/kg (i.p.) do bloqueador neuromuscular pancurônio (P1918, Sigma-Aldrich) a fim de obter paralisia muscular e passividade respiratória. Um aquecedor elétrico foi utilizado para manter os animais aquecidos durante o experimento.

As manobras respiratórias foram executadas de maneira automatizada através de software proprietário flexiWare (versão 8.0, pacote de serviços 4) e um script padrão (*mechanics scan*) contendo quatro perturbações descritas a seguir e ilustradas na **Figura 14B**. A inflação profunda (*Deep Inflation*) infla gradualmente os pulmões por um período de 3 segundos até uma pressão de 30 cmH₂O e mantém um platô por mais 3 segundos. Essa perturbação foi utilizada como manobra de recrutamento e para obtenção da capacidade inspiratória. A perturbação SnapShot-150 é uma oscilação forçada de frequência única (2.5 Hz) cujos dados adquiridos são ajustados ao modelo de compartimento único para fornecer as medidas de resistência sistêmica e elastância sistêmica. Quick Prime-3 é uma oscilação forçada de múltiplas frequências (1 - 20.5 Hz) que mede a impedância de entrada do sistema respiratório e utiliza o modelo de fase constante para calcular a resistência newtoniana, amortecimento tecidual e a elastância tecidual. Por fim, curvas pressão-volume foram construídas com a aplicação de pressão em um formato de escada até 30 cmH₂O seguido de deflação na mesma maneira (manobra PVs-P). A complacência quase-estática, o parâmetro k (formato da porção superior do braço de deflação) e a área entre os braços de inflação e deflação foram extraídos pelo software através da equação Salazar-Knowles.

Para cada animal, a sequência de manobras foi realizada em triplicata e somente foram utilizados dados para os quais o coeficiente de determinação do ajuste ao modelo matemático foi superior ao limite padrão pré-definido (maior que 0,95 para SnapShot-150 e maior que 0,9 para Quick Prime-3 e PVs-P).

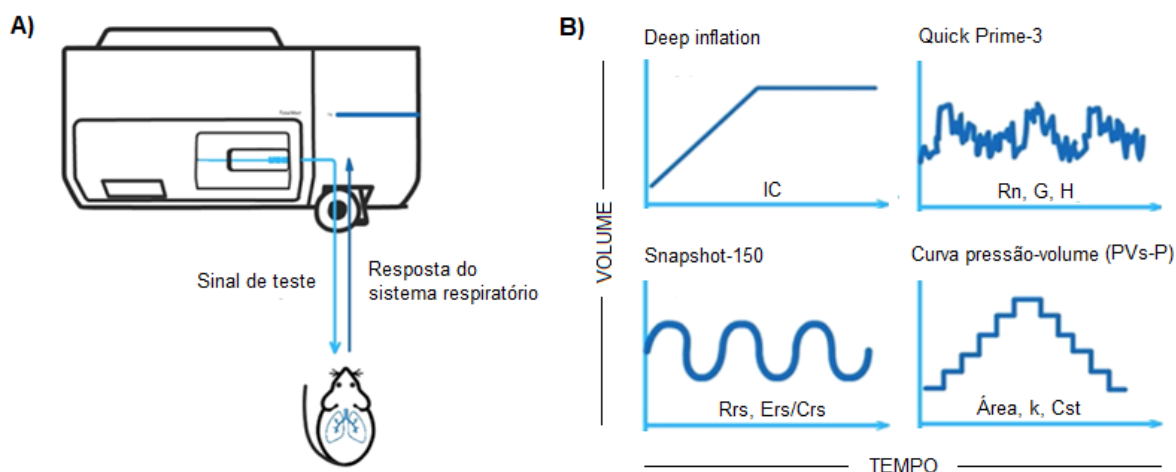


Figura 14. Método de avaliação da mecânica respiratória. (A) Ilustração do funcionamento do ventilador mecânico (flexiVent), (B) representação gráfica (volume vs. tempo) das quatro perturbações utilizadas durante a avaliação e os respectivos parâmetros. IC = capacidade inspiratória, R_{rs} = resistência sistêmica, E_{rs} = elastância sistêmica, C_{rs} = complacência dinâmica, R_n = resistência Newtoniana, G = amortecimento tecidual, H = elastância tecidual, k = parâmetro k, C_{st} = complacência quase-estática. Fonte: adaptado de documentação de suporte da SCIREQ.

2.12. ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA

Para o ensaio de farmacocinética, camundongos machos *naive* da linhagem CD-1 com 14 a 16 semanas de idade receberam coadministração única de dexametasona (10 mg/kg, i.p.) e baricitinibe (10 mg/kg, v.o.) seguido de coleta de sangue (por punção cardíaca) e pulmões após 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas. Cada tempo refere-se a um grupo independente de animais. Após coleta, as amostras foram processadas e analisadas conforme descrito nas seções a seguir.

2.12.1. Quantificação de dexametasona e baricitinibe por LC-MS/MS

Para determinação do baricitinibe e de dexametasona nas amostras de plasma e de pulmão foram utilizados métodos analíticos validados e um equipamento do tipo LC-MS/MS (do inglês, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). O sistema é composto por um espectrômetro de massas com analisador de massas tipo

triploquadrupolo acoplado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência equipado com degaseificador, sistema de bombas quaternário, forno para coluna cromatográfica, amostrador com controle de temperatura e injetor automático. Para a análise do baricitinibe foi utilizado o sistema Xevo TQS - Acquity H-Class (Waters), e a aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software MassLynx versão 4.1. Para a análise de dexametasona foi utilizado o equipamento LCMS-8050 (Shimadzu), e a aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software LabSolutions versão 5.118. As condições instrumentais dos espectrômetros de massas e os parâmetros da cela de colisão estão descritas no **Quadro 8**.

Quadro 8. Condições instrumentais dos espectrômetros de massas e os parâmetros da cela de colisão.

Parâmetro/Analito	Baricitinibe	Dexametasona
Fonte de ionização	Electrospray	Electrospray
Gás nebulizante	Nitrogênio (150 L/hora)	Nitrogênio (120 L/hora)
Gás secante	Nitrogênio (800 L/hora)	Nitrogênio (600 L/hora)
Tensão do capilar	3.000 V	4.000 V
Temperatura da fonte	400°C	526°C
Voltagem do cone	30 V	18 V
Gás de colisão	Argônio (0,15 mL/min)	Argônio (0,15 mL/min)
Energia de colisão	30 V	9 eV

Utilizando-se as condições otimizadas foram encontradas as seguintes transições de massas para as substâncias analisadas: baricitinibe – íon precursor: 372,20 m/z, fragmento majoritário: 251,03 m/z; dexametasona – íon precursor: 393,10 m/z, fragmento majoritário: 373,20 m/z; midazolam (padrão interno) – íon precursor: 326,20 m/z, fragmento majoritário: 291,00 m/z.

Para a separação cromatográfica dos analitos dos demais componentes da matriz foram utilizadas as seguintes colunas cromatográficas de fase reversa: Kinetex C18 (2,1 mm x 50 mm, tamanho da partícula de 2,6 µm; Phenomenex) para o baricitinibe e Cortecs T3 (2,1 mm x 50 mm, tamanho da partícula de 2,7 µm; Waters) para a dexametasona. Os solventes constituintes da fase móvel para o baricitinibe consistem em água ultrapura tipo I contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B). No caso da dexametasona, utilizou-se água ultrapura tipo I contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila também contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente B). Para a separação dos analitos de outros interferentes da matriz foi aplicado o modo de eluição por gradiente linear. O **Quadro 9** apresenta a programação do gradiente utilizado nos métodos analíticos. A taxa de fluxo da fase

móvel foi ajustada para 300 µL/min. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 1 µL. A temperatura do forno foi ajustada para 30 °C e a do amostrador foi mantida em 5 °C sempre que amostras, controles de qualidade ou calibradores permaneceram no interior do equipamento.

Quadro 9. Composição da fase móvel e gradiente dos métodos analíticos desenvolvidos.

Baricitinibe			Dexametasona		
Tempo (min)	% Água com 0,1% de ác. fórmico	% Acetonitrila	Tempo (min)	% Água com 0,1% de ác. fórmico	% Acetonitrila com 0,1% de ác. fórmico
0,00	95	5	0,00	95	5
1,00	30	70	1,00	50	50
2,00	0	100	5,00	5	95
5,50	0	100	6,00	5	95
6,00	95	5	6,10	95	5
7,00	95	5	7,00	95	5

2.12.2. Extração dos compostos em amostras de plasma

Para obtenção do plasma, o sangue coletado foi centrifugado por 17 minutos a 4.000 rpm em temperatura de 10°C, seguido da separação do sobrenadante e congelamento das amostras em ultrafreezer (-80°C) até o uso. Então, o procedimento de extração de dexametasona e baricitinibe do plasma, descrito a seguir, foi aplicado no preparo dos calibradores, controles de qualidade (CQs) e nas amostras de plasma de animais tratados no estudo de farmacocinética.

Inicialmente, para confecção dos calibradores e controles de qualidade de validação do método, a fortificação das amostras de plasma com os fármacos de interesse foi realizada adicionando-se 5 µL de calibrador a 45 µL de plasma “branco”, nas concentrações estipuladas para a curva de calibração e para os CQs. Depois, em 50 µL de volume de cada amostra (plasma + solução de trabalho, no caso dos controles de validação) foi adicionado 150 µL da solução de padrão interno em acetonitrila. As amostras foram agitadas em vórtex por 10 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5 minutos a 14.000 rpm e 10°C) e 150 µL do sobrenadante foi transferido para o *vial* de injeção. Por fim, foi injetado 1 µL no sistema de LC-MS/MS.

2.12.3. Extração dos compostos em amostras de tecido pulmonar

Para processamento das amostras de tecido pulmonar, os pulmões foram coletados, lavados em solução salina, pesados e posteriormente homogeneizados no equipamento Precellys 24 (Bertin Technologies) utilizando-se três ciclos de 4.000 rpm por 30 segundos. Depois, foi adicionado 1 mL de acetonitrila aos homogenatos seguido de agitação em vórtex por 3 minutos e de centrifugação (4.000 rpm por 10 minutos a 10°C). Então, foi feita a separação do sobrenadante seguido de nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos em 10°C. Por fim, o sobrenadante foi novamente coletado e as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o uso.

Para os calibradores e controles de validação, pulmões de camundongos CD-1 não-tratados foram coletados, homogeneizados e alíquotados em frações individuais de 100 mg. Em seguida, a fortificação com os compostos foi realizada adicionando-se 25 µL de calibrador preparado em acetonitrila a 100 mg de homogenato de pulmão “branco” nas concentrações estipuladas para a curva de calibração e para os CQs. Depois, os controles foram agitados em vórtex por 10 segundos e deixados em repouso por 1 minuto. Nessa mistura (pulmão + solução de trabalho) foi então adicionado 600 µL de acetonitrila contendo o padrão interno e os controles foram novamente agitados em vórtex por 3 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm em 10°C. Por fim, para todas as amostras (amostras do estudo e os controles), 200 µL do sobrenadante foi transferido para o vial de injeção e 1 µL foi injetado no sistema de LC-MS/MS.

2.13. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PULMONAR

Para análise de expressão gênica pulmonar, camundongos machos da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina e depois tratados com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma administração), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas administrações), ou dexametasona e baricitinibe simultaneamente (protocolos de tratamento idênticos à monoterapia). O tratamento com as drogas de interesse foi iniciado duas horas após a instilação de LPS. Após aproximadamente 24 horas, os pulmões foram coletados e

armazenados em ultrafreezer (-80°C) até posterior processamento. Então, utilizou-se a técnica de RT-qPCR (do inglês *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) para quantificar a expressão de oito genes de interesse associados à resposta imune (*Il1b*, *Nlrp3*, *Il6*, *Tnf*, *Ifng*, *Nos2*, *Icam1* e *Il10*), conforme descrito a seguir.

Inicialmente, o tecido do pulmão de cada animal foi triturado e homogeneizado utilizando os tubos BeadBug (Sigma-Aldrich) e o equipamento Precellys 24 (Bertin Technologies) a 4000 rpm por 30 segundos em temperatura ambiente. A lise do tecido e o isolamento do RNA total foi realizada conforme protocolo do PureLink RNA Mini kit (Thermo Fisher). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 850 ng totais de RNA e os reagentes do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher), de acordo com instruções do fabricante. O RT-qPCR foi realizado de acordo com sistema TaqMan (Thermo Fisher), utilizando o TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher) e os iniciadores com sonda FAM-MGB (primers forward e reverse) dos genes murinos *Icam1* (Mm00516024_g1), *Nos2* (Mm013098998_m1), *Tnf* (Mm00443258_m1), *Nlrp3* (Mm00840904_m1), *Ifng* (Mm99999071_m1), *Il10* (Mm00439614_m1), *Il6* (Mm00446190_m1), *Il1b* (Mm01336189_m1) e o controle endógeno *Gapdh* (Cat.4352932E) (Thermo Fisher).

A solução de cDNA, iniciadores e TaqMan master mix foi pipetada em placas de ciclagem rápida de 96 poços (MicroAmp™ Fast 0,1 mL), totalizando 10 µl por poço. As reações de PCR foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Thermo Fisher) de acordo com o **Quadro 10**. Para o cálculo da expressão relativa dos genes, utilizou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fold Change), onde: ΔCt = Ct do gene alvo na amostra - Ct do gene endógeno *Gapdh* na amostra; e $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt do gene alvo da amostra para o grupo tratado - ΔCt do gene alvo da amostra do grupo controle (sham). Assim, as alterações na expressão do RNAm nos grupos tratados são relativas à expressão do RNAm no grupo controle.

Quadro 10. Configuração dos ciclos da reação de RT-qPCR.

-	Incubação	Ativação da polimerase	PCR (40 ciclos)	
Estágio	Incubação 1	Incubação 2	Desnaturação	Anelamento
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tempo	2 minutos	20 segundos	1 segundo	20 segundos

2.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA E TAMANHO AMOSTRAL

Para os ensaios de padronização e caracterização do modelo experimental, o tamanho amostral foi definido de maneira empírica com base em testes pilotos e dados disponíveis na literatura. Ambos os sexos foram incluídos em experimentos iniciais (primeiro bloco experimental), mas somente machos foram utilizados em análises subsequentes. Para os experimentos envolvendo a triagem de fármacos, o número de animais foi calculado a partir da análise *a priori* de poder estatístico (Charan & Kantharia, 2013) através do software G*Power (versão 3.1.9.7). Esta análise mostrou um tamanho amostral de 10 animais por grupo de forma a obter-se um poder > 90% de detectar um tamanho de efeito estimado de 0,6 (ANOVA de uma via com 5 grupos), assumindo-se um nível de significância de 5%. Os experimentos foram planejados com tamanho amostral igual entre os grupos, mas, em ocasiões específicas, falha técnica na coleta ou processamento de amostras foi responsável por leve disparidade.

Todos os métodos de análise estatística foram definidos *a priori* durante o planejamento dos experimentos. Dados de peso corporal (exceto para a curva tempo-resposta) foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido por teste *post hoc* de Tukey. Nesses casos, a esfericidade da amostra não foi assumida, tendo sido aplicada a correção de Geisser-Greenhouse. Para a análise de peso corporal durante a curva tempo-resposta foi utilizada ANOVA de duas vias sem medidas repetidas, visto que os grupos para cada tempo são independentes. Para ensaios com uma única variável e mais de dois grupos, dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável. Em caso de dados não-paramétricos, estes foram analisados por teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn quando aplicável. Para comparações entre apenas dois grupos utilizou-se o teste *t* não-pareado para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Em todos os casos, o nível de significância considerado foi $p < 0,05$, sendo representado nos gráficos através do número crescente de símbolos os valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$.

Quanto a parâmetros específicos, os dados de contagem total de células e quantificação de proteína foram analisados e representados na forma de \log_{10} . De

modo similar, alguns dos dados da quantificação de citocinas foram transformados em log₂ para garantir a distribuição Gaussiana dos valores, mas representados em sua forma natural por questão de consistência ao longo do trabalho. Cada caso está descrito na respectiva seção de resultados e na legenda dos gráficos. Dados de expressão gênica foram analisados e representados na forma de log₂. Por fim, o método de Grubbs (alfa = 0,001) foi utilizado para remover um único *outlier* na quantificação de IL-6 e MCP-1 no bloco experimental 8. Ambos os resultados (com e sem o *outlier*) foram representados. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 8 (versão 8.2.0, GraphPad Software).

2.15. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

A fim de facilitar a compreensão deste trabalho, os blocos experimentais foram ilustrados e detalhados imediatamente antes da apresentação dos respectivos dados na seção “Resultados”. O **Quadro 11** mostra um resumo desses experimentos.

Quadro 11. Resumo dos blocos experimentais.

Nº	Dose de LPS	Tempo de avaliação	Sexo dos animais	Descrição resumida
1	7,5 x 10 ⁶ EU/kg	6 a 72 horas	M e F	Caracterização da LPA e avaliação tempo-resposta em machos e fêmeas
2	0,3, 0,75, 1,5 e 7,5 x 10 ⁶ EU/kg	3 dias	M	Avaliação dose-resposta do LPS
3	Não se aplica	0,5 a 24 horas	M	Ensaio de farmacocinética da combinação “dexametasona + baricitinibe”
4	3,0 x 10 ⁶ EU/kg	3 dias	M	Avaliação dos efeitos da combinação “dexametasona + baricitinibe” sobre a LPA induzida por LPS
5	3,0 x 10 ⁶ EU/kg	24 horas	M	Avaliação dos efeitos do LPS e da combinação “dexametasona + baricitinibe” sobre a expressão gênica pulmonar
6	3,0 x 10 ⁶ EU/kg	3 dias	M	Avaliação dos efeitos do controle isotípico IgG1 sobre a LPA induzida por LPS
7	3,0 x 10 ⁶ EU/kg	3 dias	M	Avaliação dos efeitos da combinação “anti-TNF + anti-IFN-γ” sobre a LPA induzida por LPS
8	3,0 x 10 ⁶ EU/kg	3 dias	M	Avaliação dos efeitos da combinação “dinaciclibe + MCC950” sobre a LPA induzida por LPS

M = machos. F = fêmeas. LPS = lipopolissacarídeo. LPA = lesão pulmonar aguda

3. RESULTADOS

3.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

No primeiro bloco de experimentos, camundongos machos e fêmeas da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e avaliados após 6, 24, 48 e 72 horas (grupos independentes). Os parâmetros analisados incluem o peso corporal, a contagem total de células no FLBA, a quantificação de proteína no FLBA, a porcentagem de linfócitos no sangue e a histopatologia pulmonar. Além disso, também foi realizada a quantificação de citocinas no FLBA (em 6 horas após a instilação) e a avaliação de mecânica respiratória (após 72 horas). Exceto quando indicado (peso corporal e hematologia), os controles saudáveis para cada período de tempo foram agrupados em um único grupo “sham”. Isso se deve à constatação da ausência de efeito tempo-resposta da instilação de solução salina nos parâmetros em questão e a necessidade de otimização do uso de animais. A **Figura 15** ilustra o delineamento experimental.

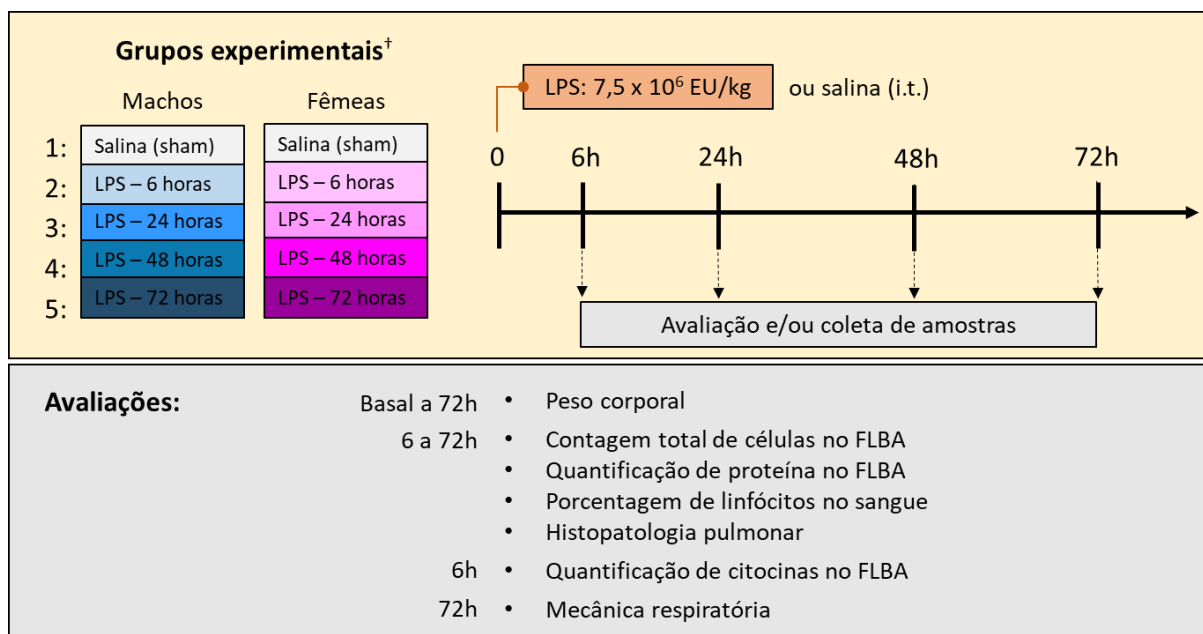


Figura 15. Delineamento do primeiro bloco experimental. Camundongos machos e fêmeas da linhagem CD-1 receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 6, 24, 48 e 72 horas quanto ao peso corporal e indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica. [†]Animais controle para cada um dos tempos foram agrupados em um único grupo sham, exceto para as medidas de peso corporal e hematologia. i.t. = intratraqueal. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar.

3.1.1. Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos e fêmeas submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A avaliação inicial do efeito tempo-resposta da instilação de LPS foi conduzida de maneira independente em machos e fêmeas. Por isso, os resultados para cada sexo foram analisados separadamente. Dados de peso corporal foram analisados por meio de ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se as variáveis independentes “tratamento” (sham vs. LPS) e “tempo” (6, 24, 48 e 72 horas). A contagem de células, a quantificação de proteína e parte dos dados de porcentagem de linfócitos no sangue foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. A porcentagem de linfócitos no sangue para o tempo de 6 horas foi analisada por teste *t* não-pareado.

Em machos, o monitoramento do peso corporal revelou efeito de tratamento ($F_{(1,72)} = 438,8$; $p < 0,0001$), tempo ($F_{(3,72)} = 46,84$; $p < 0,0001$), e interação entre ambos os fatores ($F_{(3,72)} = 77,29$; $p < 0,0001$). Análise *post hoc* da interação mostrou forte redução de peso em relação ao controle saudável nos tempos de 24, 48 e 72 horas ($p < 0,0001$), além de progressividade constante da redução no grupo “LPS” (6 vs. 24 horas, $p < 0,0001$; 24 vs. 48 horas, $p < 0,0001$; e 48 vs. 72 horas, $p = 0,0004$), chegando a uma perda média superior a 20% do peso inicial no último ponto (**Figura 16A**). A análise da infiltração de células no FLBA ($F_{(4,50)} = 130,0$; $p < 0,0001$) revelou efeito significativo do LPS a partir de 24 horas em relação ao controle ($p < 0,0001$), com maior aumento seguido de platô em 48 e 72 horas ($p = 0,0271$ e $0,0200$, respectivamente, comparado a 24 horas) (**Figura 16B**). Diferença significativa na quantificação de proteína no FLBA ($F_{(4,50)} = 61,09$; $p < 0,0001$) foi encontrada em 6 ($p = 0,0076$), 24 ($p = 0,0002$), 48 ($p < 0,0001$) e 72 horas ($p < 0,0001$), com perfil crescente da alteração (24 vs. 48 horas, $p = 0,0002$; 48 vs. 72 horas, $p = 0,0010$) e sem sinal aparente de estabilização (**Figura 16C**).

Por fim, análise da porcentagem de linfócitos no sangue (**Figura 16D**) revelou ausência de efeito do LPS em 6 horas após a instilação ($t_{(18)} = 1,222$; $p = 0,2373$). Porém, neste tempo, uma menor porcentagem de linfócitos é observada no próprio grupo “sham” (em relação ao padrão esperado de 70-80%), possivelmente como uma

consequência transitória do procedimento cirúrgico utilizado para a instilação intratraqueal. Por essa razão, a análise para o tempo de 6 horas foi realizada separadamente. Nos tempos posteriores ($F_{(3,36)} = 107,8$; $p < 0,0001$), foi encontrado efeito estatisticamente significativo do LPS em 24, 48 e 72 horas ($p < 0,0001$, comparado ao controle), além de recuperação parcial no último tempo ($p = 0,0027$ e $0,0092$ comparado a 24 e 48 horas, respectivamente).

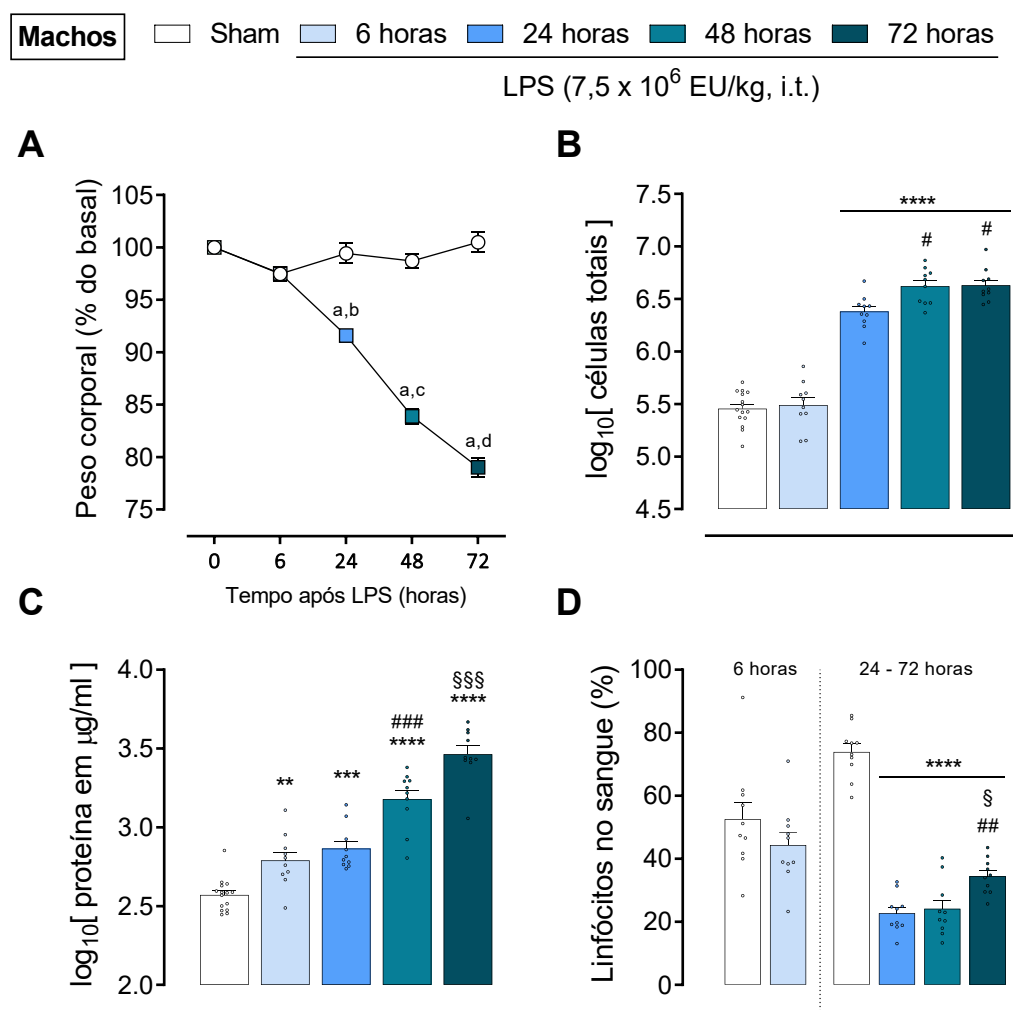


Figura 16. Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em machos. Camundongos CD-1 machos receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 6, 24, 48 e 72 horas. (A) Peso corporal. ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey, onde $p < 0,05$ em $a =$ LPS vs. sham, $b =$ LPS 24 horas vs. 6 horas, $c =$ LPS 48 horas vs. 24 horas, $d =$ LPS 72 horas vs. 48 horas. $n = 10/\text{grupo}$. (B) Contagem total de células e (C) quantificação de proteína no FLBA. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 15$ (sham) ou $10/\text{grupo}$. (D) Porcentagem de linfócitos no sangue. Teste *t* não-pareado (6 horas; $n = 10/\text{grupo}$) ou ANOVA de uma via (24-72 horas; $n = 10/\text{grupo}$) seguido de teste *post hoc* de Tukey. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. $\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$ e $\#\#\#p < 0,001$ comparado ao grupo 24 horas. $\$p < 0,05$ e $\$\$\$p < 0,001$ comparado ao grupo 48 horas. Dados representados como média + E.P.M.

Em fêmeas, resultados similares foram obtidos, mas com algumas diferenças. No peso corporal, foi encontrado efeito significativo para os fatores tratamento ($F_{(1,68)} = 211,5$; $p < 0,0001$), tempo ($F_{(3, 68)} = 41,69$; $p < 0,0001$), e interação entre tratamento e tempo ($F_{(3,68)} = 41,03$; $p < 0,0001$). Análise *post hoc* da interação mostrou o mesmo padrão observado em machos, onde há forte redução de peso em relação ao controle saudável nos tempos de 24 ($p = 0,0049$), 48 ($p < 0,0001$) e 72 horas ($p < 0,0001$), além de progressividade constante da redução no grupo “LPS” (6 vs. 24 horas, $p = 0,0004$; 24 vs. 48 horas, $p = 0,0003$; e 48 vs. 72 horas, $p = 0,0004$), chegando a uma perda média superior a 20% ao fim do protocolo (**Figura 17A**).

Em relação à infiltração de células no FLBA ($F_{(4,49)} = 85,93$; $p < 0,0001$), foi identificado aumento estatisticamente significativo em 24 horas ($p < 0,0001$), com manutenção do efeito em 48 e 72 horas, mas sem um segundo aumento (progressão) como observado em machos (**Figura 17B**). Para a quantificação de proteína, ($F_{(4,48)} = 29,67$; $p < 0,0001$) foi encontrada diferença significativa a partir de 24 horas ($p < 0,0001$) e, assim como em machos, com um perfil crescente da alteração (6 vs 24 horas, $p = 0,0264$; 24 vs 72 horas, $p = 0,0074$). Porém, em fêmeas, não houve diferença estatística entre os dois últimos tempos ($p = 0,1113$), embora os dados não sejam perfeitamente compatíveis com um platô (**Figura 17C**).

Por último, análise da porcentagem de linfócitos no sangue revelou ausência de efeito do LPS em 6 horas após a instilação ($t_{(12)} = 0,852$; $p = 0,4087$). Já nos tempos de 24, 48 e 72 horas ($F_{(3,26)} = 7,203$; $p = 0,0011$) há um efeito uniforme e estatisticamente significativo do LPS ($p < 0,01$, comparado ao “sham”), porém o impacto sobre a porcentagem de linfócitos é menor do que o observado em machos (47,15% vs. 22,72%, respectivamente, em 24 horas) e não há um perfil tempo-resposta evidente (**Figura 17D**).

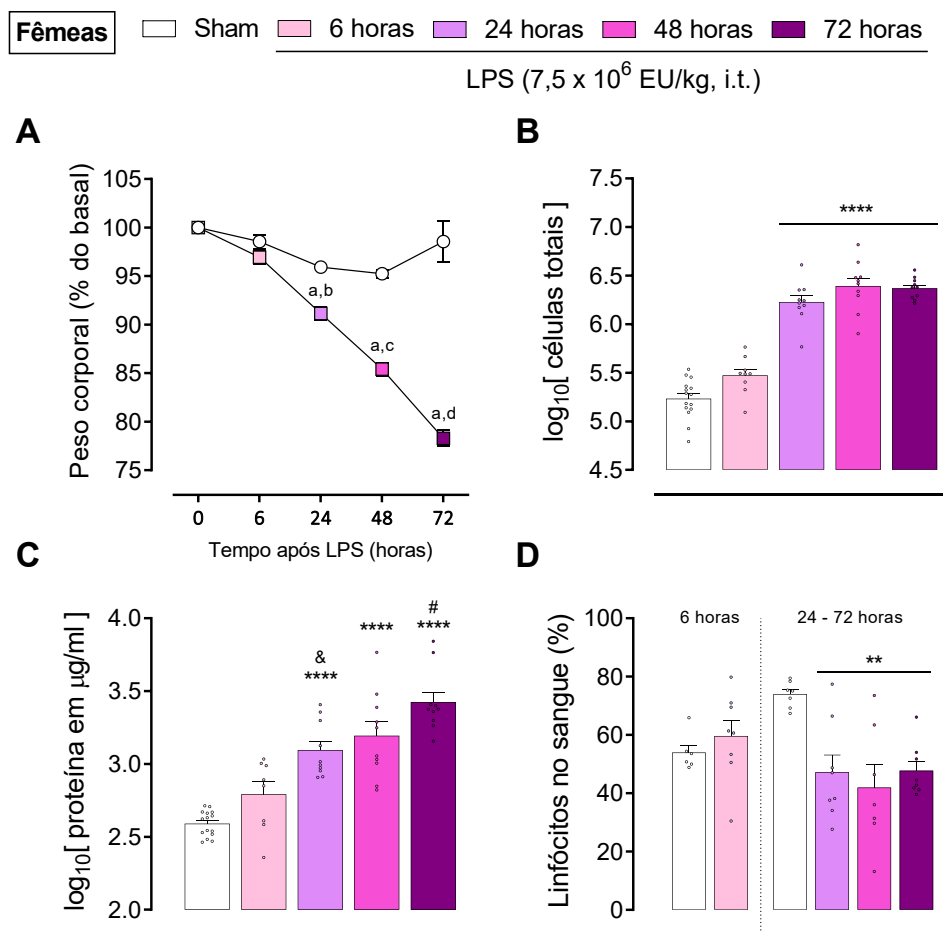


Figura 17. Perfil tempo-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em fêmeas. Camundongos CD-1 fêmeas receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 6, 24, 48 e 72 horas. (A) Peso corporal. ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey, onde $p < 0,05$ em a = LPS vs. sham, b = LPS 24 horas vs. 6 horas, c = LPS 48 horas vs. 24 horas, d = LPS 72 horas vs. 48 horas. $n = 8$ (sham 72 horas), 9 (sham 48 horas e LPS 6 horas) ou 10/grupo. (B) Contagem total de células. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. $n = 15$ (sham), 9 (LPS 6h) ou 10/grupo (C) quantificação de proteína no FLBA. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. $n = 15$ (sham), 8 (LPS 6h) ou 10/grupo. (D) Porcentagem de linfócitos no sangue. Teste *t* não-pareado (6 horas; $n = 6$ para o grupo controle e 8 para o LPS) ou ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (24-72 horas; $n = 7$ para o grupo controle e 48 horas, $n = 8$ para 24 e 72 horas). ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. & $p < 0,05$ comparado ao grupo 6 horas. # $p < 0,05$ comparado ao grupo 24 horas. Dados representados como média + E.P.M.

Para análise histopatológica, foi mensurada a área relativa do tecido pulmonar marcada por H&E como um indicador de consolidação pulmonar (i.e., perda de espaço aerado). Nesta análise de tamanho amostral reduzido, machos e fêmeas foram agrupados. De uma perspectiva qualitativa, análise macroscópica dos pulmões revelou sinais de hemorragia, descoloração e endurecimento de partes do tecido em 48 e 72 horas, em especial no último tempo (não mostrado). Em análise microscópica (**Figura 18A**), foi observado um efeito progressivo do LPS de maneira similar ao

observado anteriormente, a exemplo do peso corporal e infiltração de células ou proteína no FLBA. Nenhuma mudança significativa foi encontrada em animais controle ou em 6 horas após a instilação de LPS. Já em 24 horas, foi observada grande heterogeneidade no tecido (lesões multifocais), com partes pouco ou moderadamente afetadas e o restante em aparente normalidade. Em 48 e 72 horas a lesão tecidual se tornou mais evidente e espalhada, com destaque à extensa infiltração de células (sobretudo neutrófilos) no espaço alveolar e notável perda de espaço aerado.

Na análise quantitativa, uma ANOVA de uma via revelou diferença estatisticamente significativa na porcentagem de área marcada por H&E entre pelo menos dois grupos ($F_{(4,19)} = 32,34$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Tukey apontou aumento de área marcada em 48 ($p < 0,001$) e 72 horas ($p < 0,0001$) comparado ao grupo controle, além de diferença entre os dois últimos tempos (48 vs. 72 horas, $p < 0,01$), indicando progressividade da lesão (**Figura 18B**). Diferença entre 24 e 48 horas não atingiu significância estatística ($p = 0,0731$), provavelmente em razão do tamanho amostral reduzido no primeiro tempo.

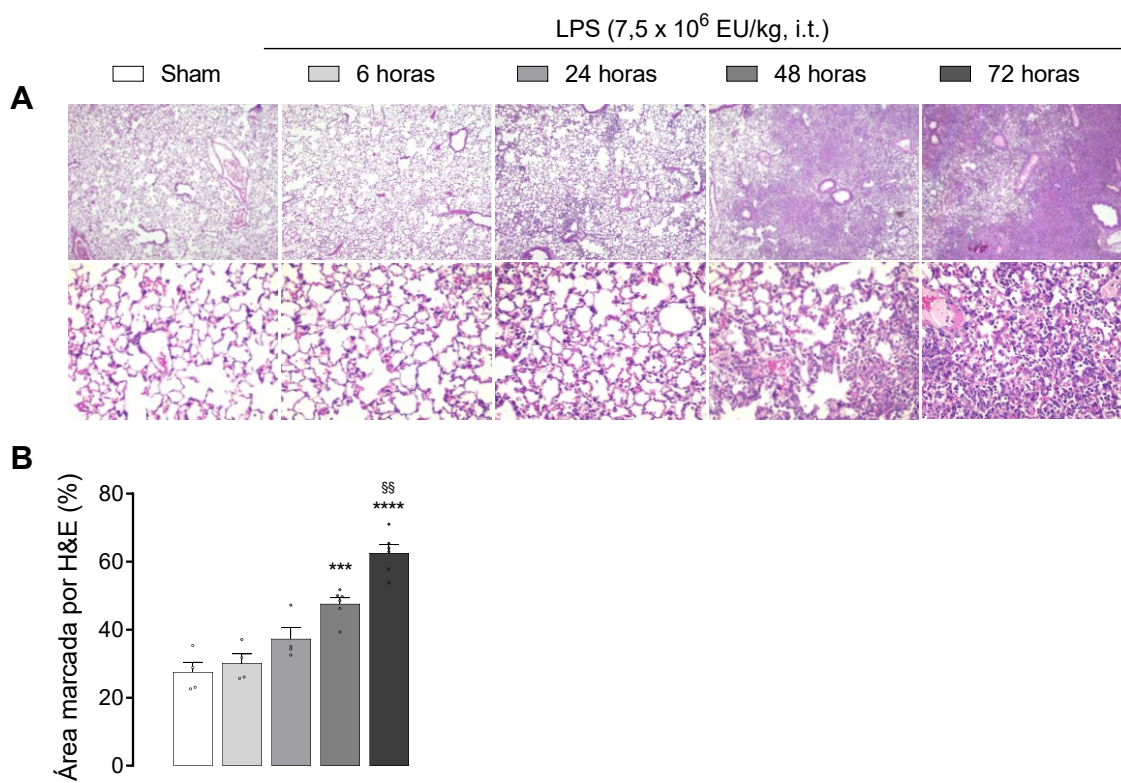


Figura 18. Perfil tempo-resposta das alterações histopatológicas nos pulmões. Camundongos CD-1 machos e fêmeas receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 6, 24, 48 e 72 horas. (A) Imagens representativas da histopatologia pulmonar e (B) porcentagem de área alveolar marcada por H&E. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 4$ (sham, 6 horas e 24 horas) ou 6 (48 e 72 horas) por grupo. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. §§ $p < 0,01$ comparado ao grupo 48 horas. Dados representados como média + E.P.M. Magnificação de 40x (superior) e 200x (inferior).

3.1.2. Liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos machos e fêmeas após 6 horas da instilação intratraqueal de LPS

Feitas as avaliações tempo-resposta, objetivou-se caracterizar a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar durante a fase inicial da lesão. Para isso, machos e fêmeas de camundongos CD-1 receberam instilação intratraqueal de LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg, i.t.) e, após 6 horas, o FLBA foi coletado para posterior análise por ELISA (IL-1 β e TNF) ou CBA (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12_{p70}, IL-17, IFN- γ e MCP-1). Os resultados da quantificação de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 foram transformados em log₂ para a análise estatística.

Resultados de quantificação das citocinas IL-2 (**Figura 19B**), IL-4 (**Figura 19C**), IL-17A (**Figura 19G**) e IFN- γ (**Figura 19H**) ficaram abaixo do limite inferior da faixa de confiabilidade do ensaio (20 pg/ml), sugerindo que essas não estão presentes em quantidades relevantes na amostra. Para esses casos, não foi realizada análise estatística. Dados referentes às outras citocinas foram analisados por ANOVA de duas vias (fator “sexo” e “tratamento”), sendo encontrado unicamente um efeito estatístico para o fator tratamento: IL-1 β ($F_{(1,16)} = 189,0$; $p < 0,0001$; **Figura 19A**), IL-6 ($F_{(1,16)} = 198,7$; $p < 0,0001$; **Figura 19D**), IL-10 ($F_{(1,16)} = 9,403$; $p = 0,0074$; **Figura 19E**), IL-12_{p70} ($F_{(1,16)} = 4,788$; $p = 0,0438$; **Figura 19F**), MCP-1 ($F_{(1,16)} = 66,41$; $p < 0,0001$; **Figura 19I**) e TNF ($F_{(1,16)} = 160,5$; $p < 0,0001$; **Figura 19J**). Desse modo, observou-se aumento simultâneo de múltiplas citocinas na fase inicial da inflamação induzida pelo LPS, principalmente IL-1 β , IL-6, MCP-1 e TNF. Maior presença dessas citocinas, além de IL-10 e IL-12_{p70}, foi encontrada de maneira similar em machos e fêmeas.

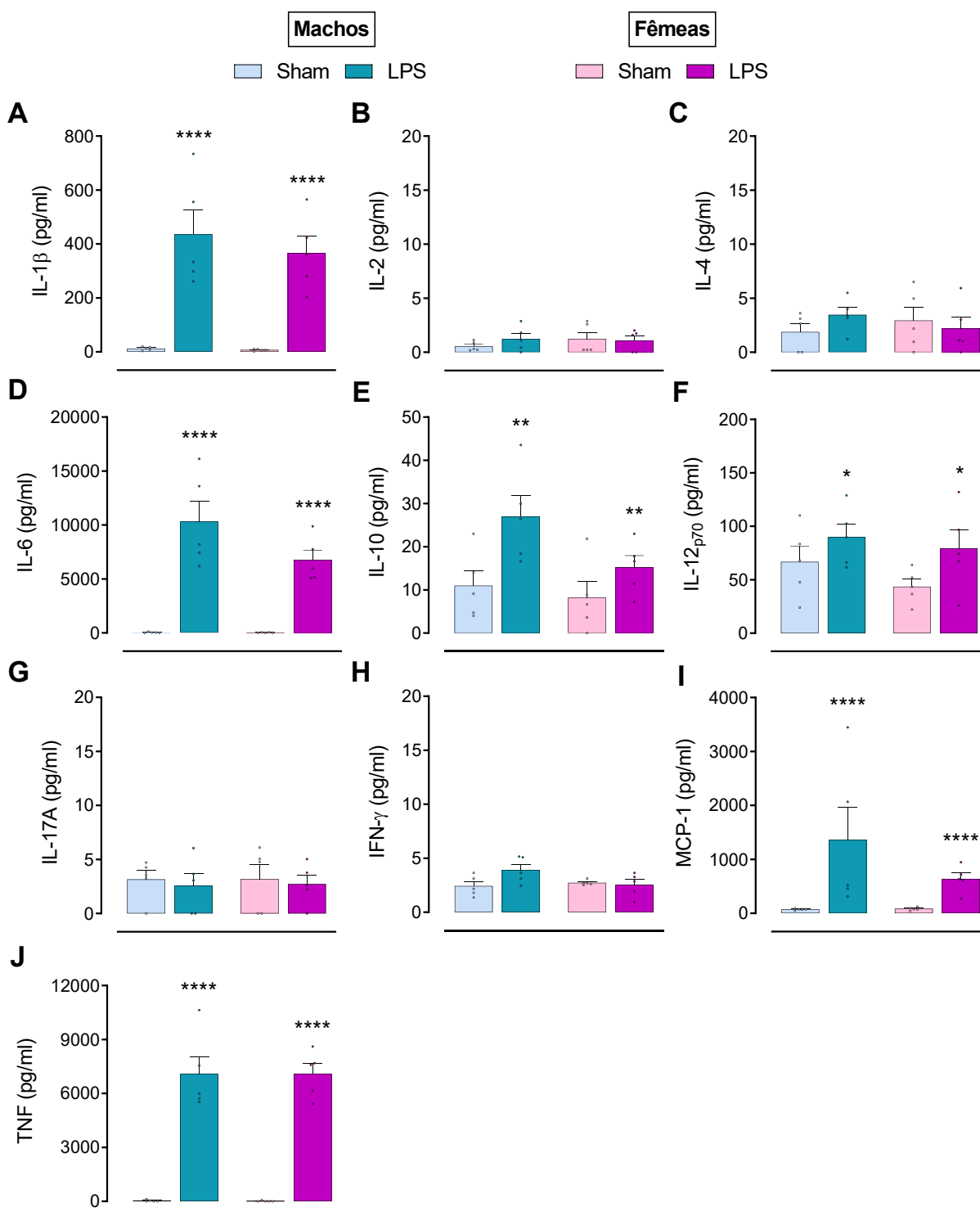


Figura 19. Liberação de citocinas no espaço broncoalveolar na fase inicial da LPA. Camundongos CD-1 machos e fêmeas receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e o FLBA foi coletado após 6 horas. Quantificação de (A) IL-1 β , (B) IL-2, (C) IL-4, (D) IL-6, (E) IL-10, (F) IL-12_{p70}, (G) IL-17, (H) IFN- γ , (I) MCP-1 e (J) TNF por ELISA (A e J) ou CBA (B-I). ANOVA de duas vias. $n = 5$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao respectivo grupo sham. Dados representados como média + E.P.M.

3.1.3. Alterações de mecânica respiratória basal em camundongos machos e fêmeas após 72 horas da instilação intratraqueal de LPS

A fim de expandir a caracterização do modelo para a função pulmonar, machos e fêmeas de camundongos CD-1 foram avaliados paralelamente quanto à mecânica respiratória basal após 72 horas da instilação de LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg, i.t.). Este tempo foi escolhido a partir das análises tempo-resposta, com base na maior magnitude de alterações e na menor dispersão dos dados em relação à média central. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável, considerando-se as variáveis independentes “tratamento” (sham vs. LPS) e “sexo” (machos vs. fêmeas).

Nesta análise, foi encontrado um efeito significativo e isolado do fator tratamento ($F_{(1,16)} = 127,2$; $p < 0,0001$) no parâmetro de resistência sistêmica, indicando um aumento da resistência induzido pelo LPS que é equivalente em machos e fêmeas (**Figura 20A**). Para a elastância sistêmica, contudo, foi encontrado efeito significativo dos fatores tratamento ($F_{(1,16)} = 108$; $p < 0,0001$), sexo ($F_{(1,16)} = 5,968$; $p = 0,0265$) e da interação entre ambos ($F_{(1,16)} = 12$; $p = 0,0032$). Análise *post hoc* revelou que a instilação de LPS aumentou a elastância sistêmica tanto em machos ($p = 0,0008$) quanto em fêmeas ($p < 0,0001$), mas que a alteração é maior em fêmeas ($p = 0,0036$; **Figura 20B**). Em relação à resistência newtoniana, foi observado efeito significativo e isolado do fator tratamento ($F_{(1,16)} = 6,316$; $p = 0,0231$), demonstrando um aumento da resistência nas vias aéreas condutoras induzido pelo LPS de maneira semelhante em ambos os sexos (**Figura 20C**). Se considerado o amortecimento tecidual, relativo à resistência tecidual, foi encontrado efeito significativo do fator tratamento ($F_{(1,16)} = 129,2$; $p < 0,0001$) e da interação entre tratamento e sexo ($F_{(1,16)} = 7,543$; $p = 0,0143$). A análise *post hoc* mostrou que o aumento induzido pelo LPS neste parâmetro está presente em ambos machos e fêmeas ($p < 0,0001$), com maior prejuízo relativo em fêmeas ($p = 0,0331$; **Figura 20D**). De maneira similar, análise da elastância tecidual revelou efeito significativo para o fator tratamento ($F_{(1,16)} = 60,49$; $p < 0,0001$) e interação entre tratamento e sexo ($F_{(1,16)} = 10,09$; $p < 0,0059$). Análise *post hoc* indicou que o aumento de elastância tecidual induzido por LPS em machos ($p = 0,0232$) e fêmeas ($p < 0,0001$) é também mais pronunciado em fêmeas ($p = 0,0118$; **Figura 20E**). Na capacidade inspiratória, a instilação de LPS está associada

a uma redução do volume pulmonar máximo (medido a 30 cmH₂O de pressão) em ambos os sexos, tendo sido encontrado um efeito significativo e isolado do fator tratamento ($F_{(1,16)} = 50,67$; $p < 0,0001$; **Figura 20F**).

Além da avaliação do sistema respiratório como um todo (**Figuras 20A-B**) e do particionamento da resposta em vias aéreas condutoras (**Figura 20C**) e parênquima pulmonar (**Figura 20D-F**), informações importantes podem ser obtidas a partir da construção da curva pressão-volume. Essa curva avalia a distensibilidade do sistema respiratório do fim da expiração até a capacidade total do pulmão. Por essa razão, a representação gráfica de cada grupo contém dois “braços”, sendo o inferior e o superior representativos da inflação e deflação dos pulmões, respectivamente (**Figura 20J**). Nessa análise, foi observado um deslocamento para baixo da curva pressão-volume dos grupos “LPS” em relação aos respectivos controles, sugerindo menor distensibilidade do sistema respiratório. Notadamente, a curva pressão-volume de fêmeas se destaca por estar mais abaixo da dos machos, sugerindo heterogeneidade entre os sexos no desenvolvimento de rigidez do sistema respiratório. Análise do parâmetro K, que representa o formato da porção superior do braço de deflação da curva pressão-volume, revelou efeito significativo da interação entre sexo e tratamento ($F_{(1,16)} = 7,364$; $p = 0,0153$). Neste caso, a análise *post hoc* mostrou que um efeito do LPS no formato da curva de deflação foi somente detectado em fêmeas ($p = 0,0436$; **Figura 20G**).

Por fim, na complacência quase-estática, foi observado efeito significativo e isolado de tratamento ($F_{(1,16)} = 62,14$; $p < 0,0001$), com forte redução induzida pelo LPS em ambos os sexos (**Figura 20I**). Não foi encontrada diferença estatística significativa na área da curva pressão-volume (**Figura 20H**), relativo à histerese, ou diferenças basais (grupos controle) entre machos e fêmeas em quaisquer parâmetros.

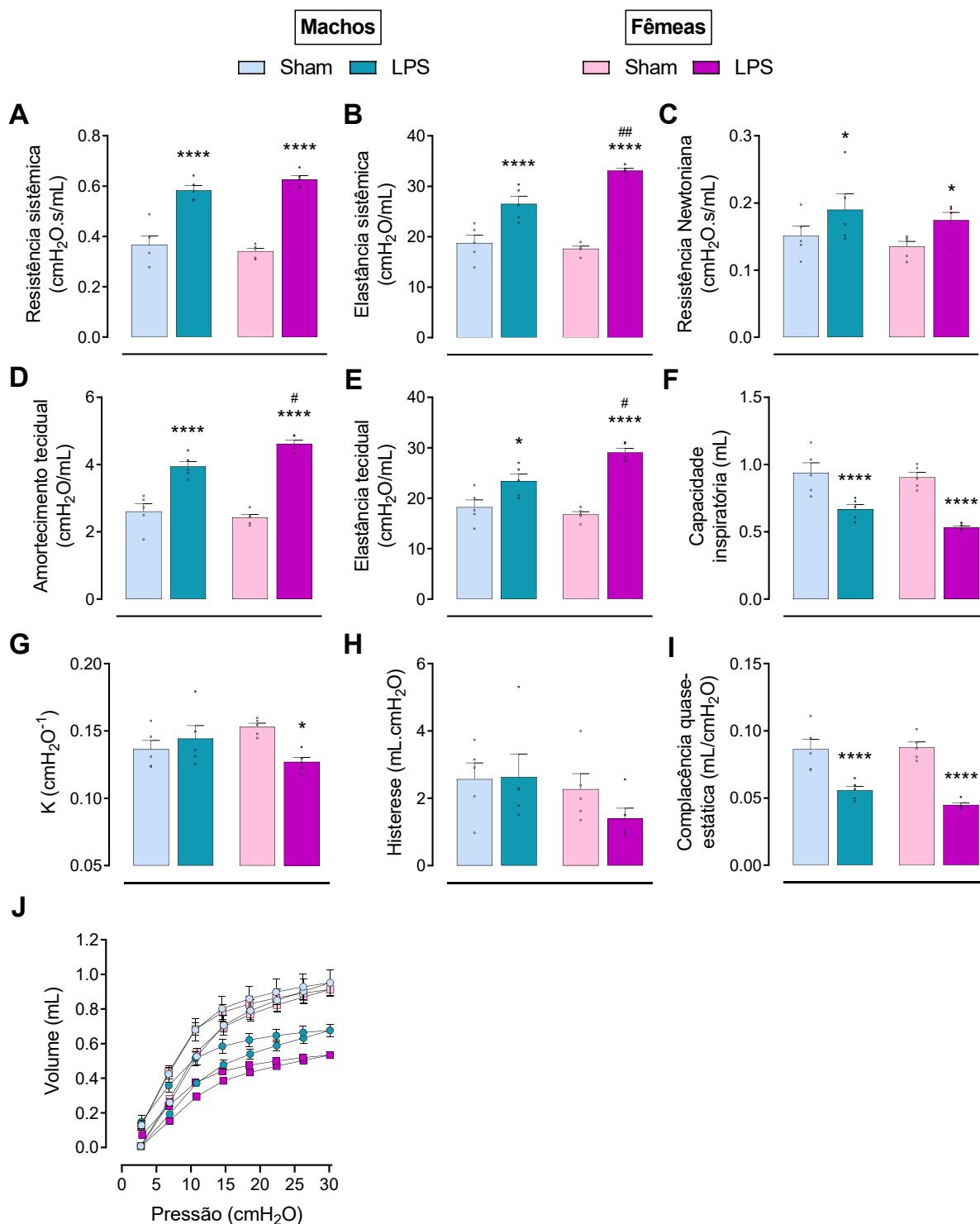


Figura 20. Alterações de mecânica respiratória basal. Camundongos CD-1 machos e fêmeas receberam instilação intratraqueal solução salina (sham) ou LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 72 horas. (A) Resistência sistêmica, (B) elastância sistêmica, (C) resistência Newtoniana, (D) amortecimento tecidual, (E) elastância tecidual, (F) capacidade inspiratória, (G) parâmetro K, (H) histerese, (I) complacência quase-estática, (J) curva pressão-volume. ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* de Tukey (A-I). $n = 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparado ao grupo LPS em machos. Dados representados como média + E.P.M.

Após conclusão da avaliação tempo-resposta, definiu-se 72 horas como o tempo padrão para avaliação de desfechos. Além disso, com base nos perfis de resposta, optou-se por utilizar apenas camundongos machos nos experimentos subsequentes. Por fim, dada a gravidade da LPA obtida nesses experimentos, uma análise dose-resposta para o LPS foi realizada. O objetivo foi otimizar o protocolo e obter um grau de lesão compatível com o objetivo translacional, mas que não resultasse em mortalidade, ainda que reduzida, durante a execução do estudo.

3.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

No segundo bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou doses decrescentes de LPS (7,5, 1,5, 0,75 ou 0,3 x 10⁶ EU/kg) e avaliados após três dias. Os parâmetros analisados incluem o peso corporal (uma vez ao dia), a contagem total e diferencial (polimorfonucleares, ou PMN) de células no FLBA, a quantificação de proteína no FLBA, a porcentagem de linfócitos no sangue, a histopatologia pulmonar e a mecânica respiratória basal. A **Figura 21** ilustra o delineamento experimental.

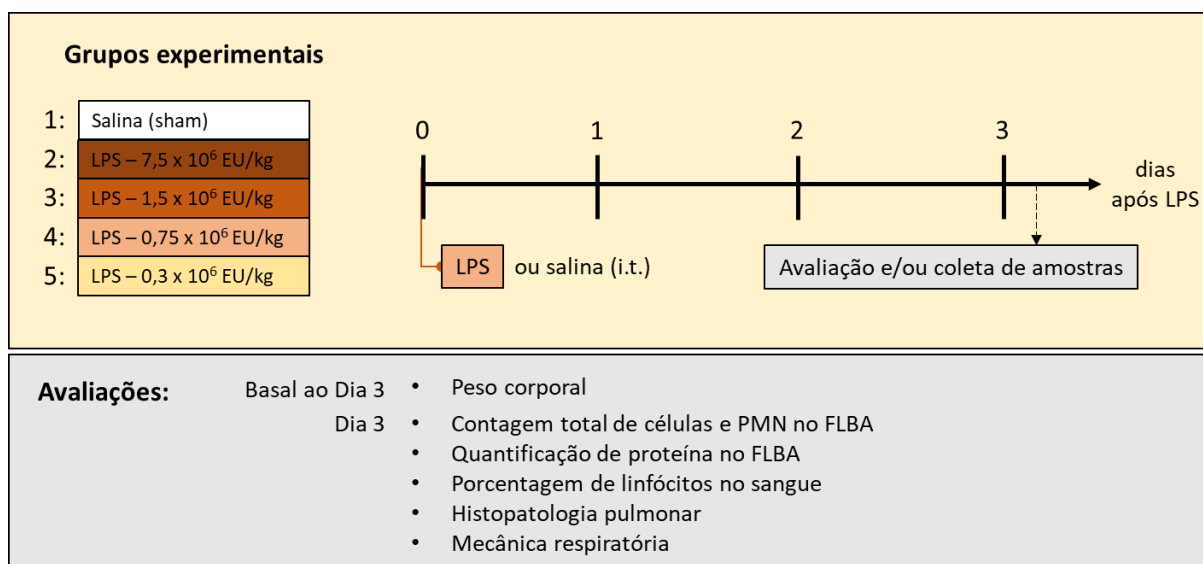


Figura 21. Delineamento do segundo experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou doses decrescentes de LPS (7,5, 1,5, 0,75 ou 0,3 x 10⁶ EU/kg) e foram avaliados uma vez ao dia quanto ao peso corporal e após três dias para os indicadores de inflamação, lesão e função pulmonar, e alteração hematológica. i.t. = intratraqueal. PMN = células polimorfonucleares. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar.

3.2.1. Perfil dose-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

Dados de peso corporal foram analisados por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse seguido de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se as variáveis independentes “tratamento” (sham e diferentes doses de LPS) e “tempo” (dias 1, 2 e 3). Todos os outros parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”.

A análise do peso corporal revelou efeito significativo de tempo ($F_{(1,511, 83,13)} = 131.6$; $p < 0,0001$), tratamento ($F_{(4,55)} = 41,85$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(8,110)} = 20.52$; $p < 0,0001$). Análise subsequente da interação mostrou que todas as doses de LPS causaram redução de peso similar em relação ao controle saudável no primeiro dia ($p < 0,01$). Contudo, a partir do segundo dia, diferenças entre os grupos tornam-se visíveis (**Figura 22A**). Por exemplo, a redução de peso foi significativamente menor na dose de $0,3 \times 10^6$ EU/kg do que nas doses de $1,5$ ou $7,5 \times 10^6$ EU/kg ($p = 0,0353$ e $p = 0,0195$, respectivamente), e essa diferença fica ainda mais evidente no dia seguinte ($p < 0,01$). No terceiro dia, há também uma diferença estatisticamente significativa entre as doses de $0,75$ e $7,5 \times 10^6$ EU/kg ($p = 0,0248$). No geral, os resultados mostram uma relação tempo e dose-dependente entre o LPS e o peso corporal, sendo que as duas doses mais elevadas foram associadas a uma redução equivalente e progressiva de 19,5-20,5%, enquanto as doses mais baixas resultaram em aparente estabilidade do peso corporal do segundo para o terceiro dia e um provável início de recuperação.

Se considerada a contagem total de células no FLBA ($F_{(4,55)} = 103,9$; $p < 0,0001$), todas as doses de LPS foram associadas a um aumento significativo do número de células se comparado ao grupo “sham” ($p < 0,0001$). Menor infiltração de células no espaço broncoalveolar é observada à medida em que se reduz a dose (**Figura 22B**), tendo sido observada diferença estatística entre a dose mais baixa ($0,3 \times 10^6$ EU/kg) e as duas mais altas ($7,5$ ou $1,5 \times 10^6$ EU/kg; $p = 0,0366$ e $p = 0,0038$, respectivamente). Resultados similares foram observados na porcentagem de PMN

($F_{(4,55)} = 448,7$; $p < 0,0001$; **Figura 22C**), onde há diferença significativa entre todas as doses de LPS e o grupo controle ($p < 0,0001$) e entre a dose de 0,3 e a doses de 7,5 ($p < 0,0001$), 1,5 ($p = 0,0005$) e $0,75 \times 10^6$ EU/kg ($p = 0,0036$). Na quantificação de proteína ($F_{(4,55)} = 48,66$; $p < 0,0001$; **Figura 22D**), mais uma vez todas as doses geraram alteração significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), sendo que há menor comprometimento da barreira alvéolo-capilar nas duas doses mais baixas ($0,75$ e $0,3 \times 10^6$ EU/kg) em relação à dose de $7,5 \times 10^6$ EU/kg ($p < 0,0001$ e $p = 0,0005$, respectivamente) ou na dose mais baixa em relação à dose de $1,5 \times 10^6$ EU/kg ($p = 0,0066$).

Na análise hematológica (**Figura 22E**), menor porcentagem de linfócitos circulantes foi observada nas doses de 7,5, 1,5 e $0,75 \times 10^6$ EU/kg em relação ao controle “sham” ($p < 0,0001$) e à dose mais baixa de LPS ($p < 0,01$). Neste parâmetro, não foi encontrada diferença significativa entre animais que receberam a dose de $0,3 \times 10^6$ EU/kg e os controles saudáveis, embora haja uma tendência de redução ($p = 0,0639$). Efeito similar foi observado na análise histopatológica, onde as duas doses mais baixas não foram associadas a um grau estatisticamente significativo de consolidação pulmonar, embora o tamanho amostral seja pequeno ($n = 3$, **Figura 22F**). Em contrapartida, as doses de 1,5 ($p = 0,0017$) e $7,5 \times 10^6$ EU/kg (com base no primeiro bloco experimental) mostram maior porcentagem da área alveolar marcada por H&E. Este resultado é concordante com os outros indicadores de inflamação e lesão avaliados e apoia um menor grau de alteração pulmonar em animais que receberam doses menores de LPS. Contudo, fica também evidente pelo conjunto de resultados que, com poucas exceções, diferenças estatísticas são em geral apenas observadas na comparação entre as doses em extremos opostos da resposta (7,5 e $1,5$ vs. $0,3 \times 10^6$ EU/kg).

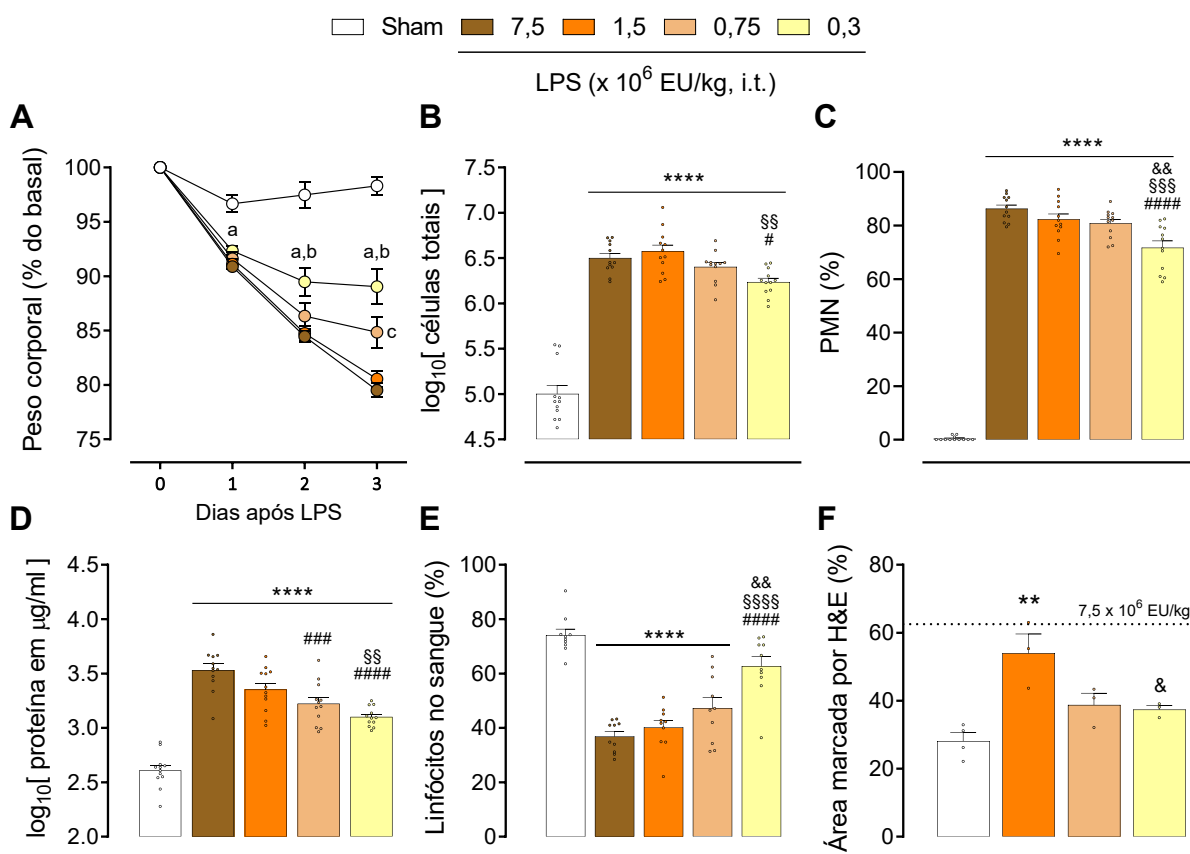


Figura 22. Perfil dose-resposta das alterações de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. Camundongos CD-1 machos receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS em doses decrescentes (7,5, 1,5, 0,75 ou 0,3 x 10⁶ EU/kg) e foram avaliados após 72 horas. (A) Peso corporal, onde p < 0,05 em ^a = todos os grupos vs. sham, ^b = 0,3 vs. 1,5 e 7,5 x 10⁶ EU/kg, ^c = 0,75 vs. 7,5 x 10⁶ EU/kg. n = 12/grupo. (B) Contagem total de células, (C) porcentagem de PMN e (D) quantificação de proteína no FLBA, (E) porcentagem de linfócitos no sangue e (F) porcentagem de área alveolar marcada por H&E (linha pontilhada indica a média obtida para a dose de 7,5 x 10⁶ EU/kg em experimento anterior). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse (A) ou ANOVA de uma via (B-F) seguido de teste *post hoc* de Tukey. n = 12/grupo (B-D), 10/grupo (E) e 3/grupo (F). **p < 0,01 e ****p < 0,0001 comparado ao grupo sham. #p < 0,05, ###p < 0,001 e ####p < 0,0001 comparado à dose de 7,5 x 10⁶ EU/kg. \$p < 0,05, \$\$p < 0,01, \$\$\$p < 0,001 e \$\$\$\$p < 0,0001 comparado à dose de 1,5 x 10⁶ EU/kg. &p < 0,01 comparado à dose de 0,75 x 10⁶ EU/kg. Dados representados como média + E.P.M.

3.2.2. Perfil dose-resposta das alterações de mecânica respiratória basal em camundongos machos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

Em continuidade da investigação do perfil dose-resposta, animais submetidos à instilação intratraqueal de doses decrescentes de LPS foram também avaliados quanto às alterações de mecânica respiratória basal. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey.

Neste estudo, diferenças estatisticamente significativas entre pelo menos dois grupos foram encontradas em todos os parâmetros (**Figura 23**), sendo: resistência sistêmica ($F_{(4,55)} = 19,84$; $p < 0,0001$), elastância sistêmica ($F_{(4,55)} = 17,40$; $p < 0,0001$), resistência Newtoniana ($F_{(4,55)} = 5,846$; $p = 0,0005$), amortecimento tecidual ($F_{(4,55)} = 18,23$; $p < 0,0001$), elastância tecidual ($F_{(4,55)} = 17,46$; $p < 0,0001$), capacidade inspiratória ($F_{(4,55)} = 34,31$; $p < 0,0001$), parâmetro K ($F_{(4,55)} = 5,242$; $p < 0,0012$), histerese ($F_{(4,55)} = 7,582$; $p < 0,0001$) e complacência quase-estática ($F_{(4,55)} = 42,86$; $p < 0,0001$). De maneira independente da dose, efeitos da instilação de LPS foram encontrados em quase todos os parâmetros quando comparado ao grupo “sham” ($p < 0,05$). Isso sugere que mesmo doses pequenas de LPS são capazes de causar alterações quantificáveis na mecânica respiratória. As exceções são resistência Newtoniana e parâmetro K (**Figuras 23C e 23G**), nas quais somente animais que receberam as doses de $7,5$ e $1,5 \times 10^6$ EU/kg de LPS diferenciaram-se dos controles saudáveis ($p = 0,0003$ e $p = 0,0076$, respectivamente).

Também foram observadas diferenças nas doses entre si, o que apoia a extensão para a mecânica respiratória do efeito dose-resposta observado no experimento anterior. A dose de $7,5 \times 10^6$ EU/kg foi associada a maior aumento de resistência sistêmica em comparação com todas as outras doses ($p = 0,0343$ vs. $1,5 \times 10^6$ EU/kg; $p = 0,0001$ vs. $0,75 \times 10^6$ EU/kg; $p < 0,0001$ vs. $0,3 \times 10^6$ EU/kg; **Figura 23A**), e maior elastância sistêmica, amortecimento tecidual e elastância tecidual do que nas duas doses mais baixas ($p < 0,05$; **Figuras 23B, 23D e 23E**). Além disso, uma diferença não-significativa entre as doses de $7,5$ e $1,5 \times 10^6$ EU/kg de LPS foi observada na elastância sistêmica e amortecimento tecidual ($p = 0,0581$, $p = 0,0864$, respectivamente).

Nos parâmetros associados à capacidade inspiratória e à curva pressão-volume (parâmetro K, histerese e complacência quase-estática), apenas efeitos mais modestos da variação da dose foram encontrados. Há diferenças limítrofes entre as doses de $7,5$ e $0,3 \times 10^6$ EU/kg ou $7,5$ e $0,5 \times 10^6$ EU/kg na capacidade inspiratória ($p = 0,0684$; **Figura 23F**) e complacência quase-estática ($p = 0,0728$; **Figura 23I**), respectivamente, além de uma diferença significativa entre a dose mais alta e mais baixa neste último parâmetro ($p = 0,0359$). Por fim, análise da curva pressão-volume mostra que todas as doses causaram deslocamento para baixo e achatamento da curva (**Figura 23J**), corroborando a observação inicial de que houve um prejuízo

associado ao LPS mesmo quando este foi administrado em doses baixas. É também possível observar um perfil dose-resposta nesta curva, sendo que os grupos de animais que receberam doses mais altas de LPS estão, na ordem crescente, mais distantes do grupo “sham”.

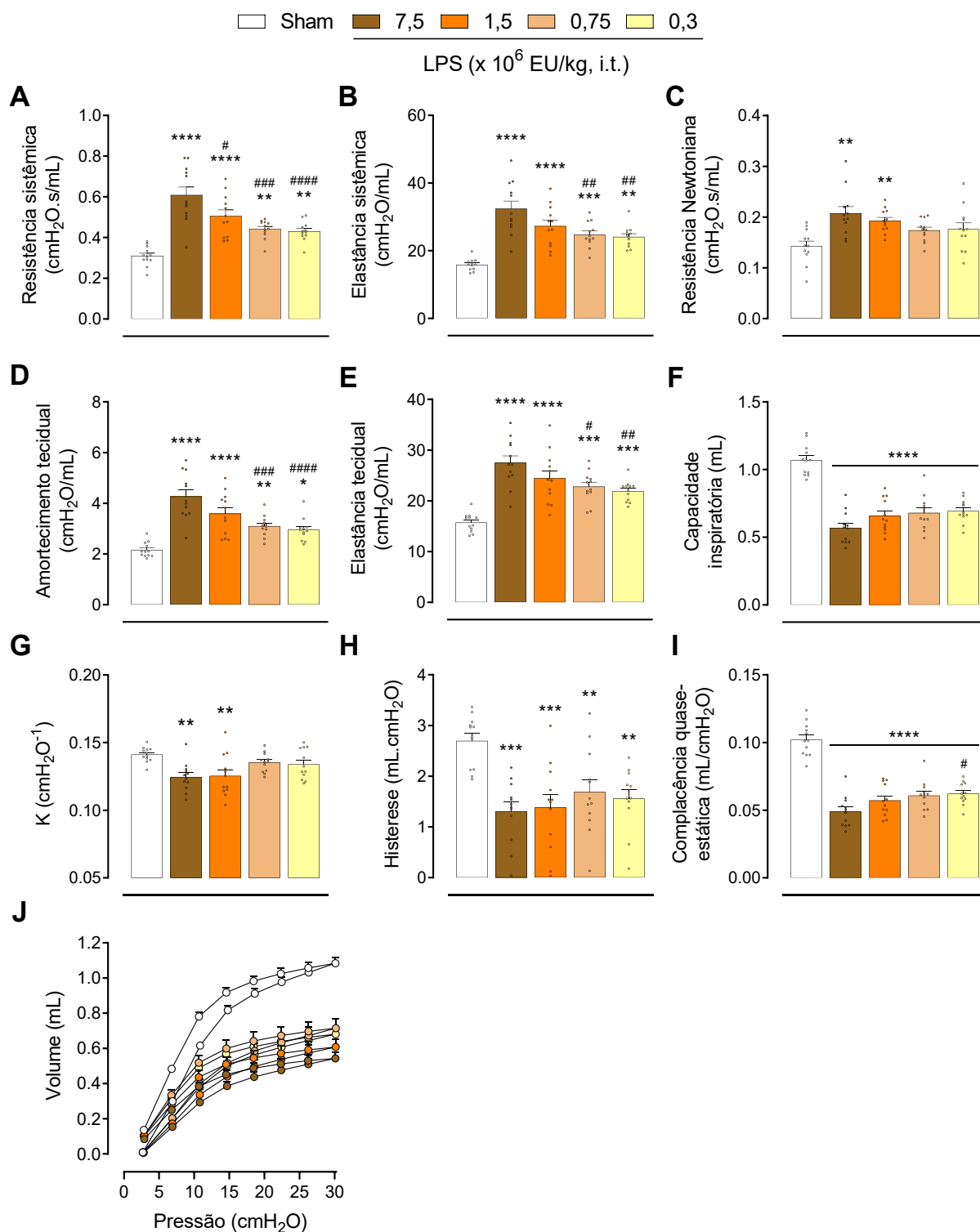


Figura 23. Perfil dose-resposta das alterações de mecânica respiratória basal. Camundongos CD-1 machos receberam instilação intratraqueal de solução salina (sham) ou LPS em doses decrescentes ($7,5$, $1,5$, $0,75$ ou $0,3 \times 10^6$ EU/kg) e foram avaliados após 72 horas. (A) Resistência sistêmica, (B) elastância sistêmica, (C) resistência Newtoniana, (D) amortecimento tecidual, (E) elastância tecidual, (F) capacidade inspiratória, (G) parâmetro K, (H) histerese, (I) complacência quase-estática, (J) curva pressão-volume. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (A-I). $n = 12$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ comparado à dose de $7,5 \times 10^6$ EU/kg. Dados representados como média + E.P.M.

Com base nos resultados de mecânica respiratória e na análise anterior de peso corporal, de indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e da alteração hematológica, uma dose de $3,0 \times 10^6$ EU/kg de LPS foi selecionada para a continuidade dos experimentos.

3.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

3.3.1. Estudo simplificado da farmacocinética do cotratamento com dexametasona e baricitinibe

No terceiro bloco de experimentos, camundongos machos *naive* da linhagem CD-1 receberam coadministração única de dexametasona (10 mg/kg, i.p.) e baricitinibe (10 mg/kg, v.o.) seguido de coleta de sangue e dos pulmões em 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas após o tratamento (grupos independentes por tempo). As amostras foram então processadas e as concentrações plasmática e pulmonar dos fármacos foi determinada por LC-MS/MS. A **Figura 24** ilustra o delineamento experimental.

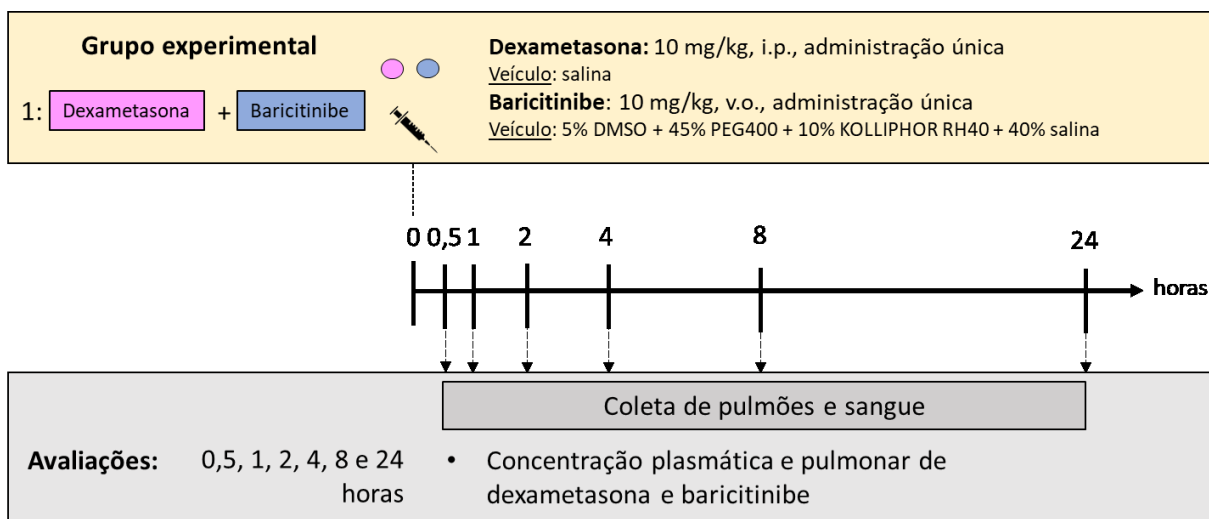


Figura 24. Delineamento do terceiro bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam coadministração única de dexametasona (10 mg/kg, i.p.) e baricitinibe (10 mg/kg, v.o.). Sangue e pulmões foram coletados após 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas da administração ($n = 5$ /tempo) e a concentração plasmática e pulmonar dos fármacos foi determinada por LC-MS/MS.

O ensaio de farmacocinética revelou que, após coadministração única de dexametasona e baricitinibe, ambos os fármacos atingiram e mantiveram concentrações relevantes por pelo menos 8 horas no plasma (**Figura 25A**) e nos pulmões (**Figura 25B**) dos camundongos. Nos dois casos, o pico da concentração

ocorreu entre 0,5 e 2 horas, e este tempo foi semelhante entre os compartimentos. Notavelmente, a dexametasona foi detectada em concentrações muito maiores do que o baricitinibe durante o período de 0,5 a 4 horas após o tratamento, tanto no plasma quanto nos pulmões. Já em 8 horas, essa diferença é bastante reduzida (plasma) ou desaparece (pulmões), demonstrando que a maior concentração inicial de dexametasona é também acompanhada de menor tempo de meia-vida. Em 24 horas, os dois fármacos apresentaram concentrações próximas ou abaixo do limite de quantificação do método, definido como 10 ng/ml (plasma) ou 100 ng/g (pulmões) para a dexametasona e 3 ng/ml (plasma) ou 30 ng/g (pulmões) para o baricitinibe.

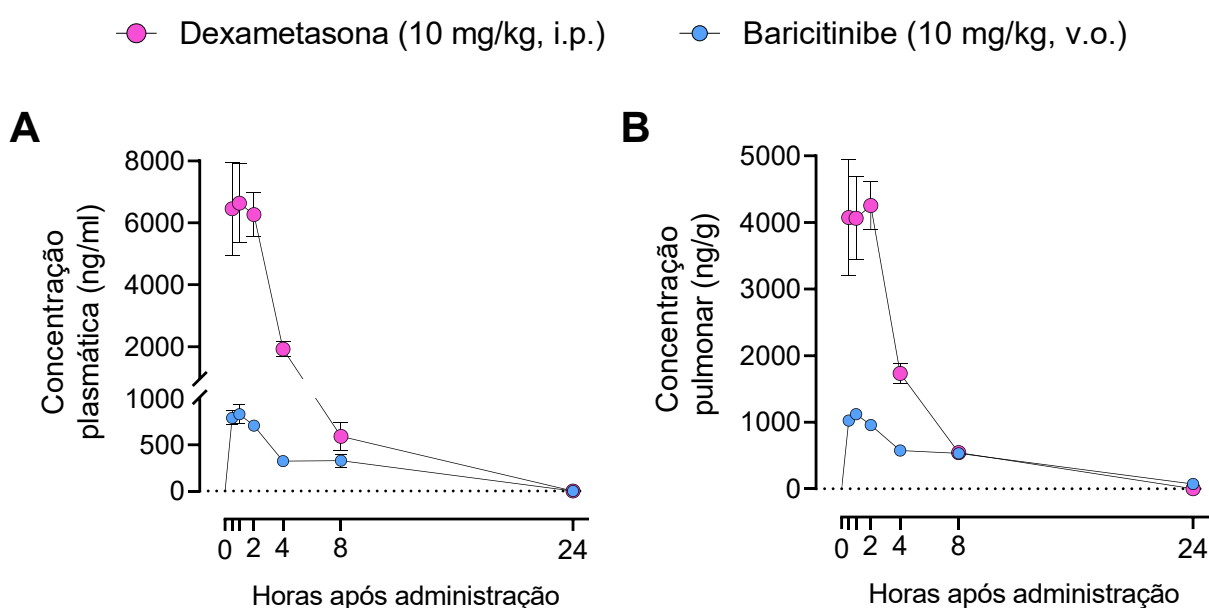


Figura 25. Avaliação da farmacocinética da dexametasona e baricitinibe após coadministração. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam coadministração única de dexametasona (10 mg/kg, i.p.) e baricitinibe (10 mg/kg, v.o.). Sangue e pulmões foram coletados após 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas da administração e a concentração dos fármacos foi determinada. (A) Concentração plasmática e (B) pulmonar. $n = 5$ /tempo. Dados representados como média \pm E.P.M.

Com base nestes resultados e na literatura, definiu-se o regime de administração repetida dos fármacos para o estudo de eficácia. No caso da dexametasona, o protocolo foi mantido em 10 mg/kg uma vez ao dia, conforme Sefik et al. (2022). Para o baricitinibe, a administração foi mantida em 10 mg/kg, mas com frequência de duas vezes ao dia, conforme Fridman et al. (2010). Neste caso, foi considerada a concentração plasmática e pulmonar média aproximadamente 6 e 4 vezes menor que a dexametasona, respectivamente, além do caráter reversível da interação com os alvos JAK1 e JAK2 (Jorgensen et al., 2020). Há também a possibilidade de interação farmacocinética via indução da CYP3A4 pela

dexametasona (Jacobs et al., 2022; Jorgensen et al., 2020), embora este fenômeno seja provavelmente pouco relevante ao protocolo utilizado devido (ver discussão).

3.4. QUARTO BLOCO EXPERIMENTAL

No quarto bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina e depois tratados por três dias com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia), ou dexametasona e baricitinibe simultaneamente (protocolos de tratamento idênticos à monoterapia). O tratamento com as drogas de interesse foi iniciado duas horas após a instilação de LPS. O peso corporal foi registrado diariamente durante o protocolo e, após o terceiro dia, foi avaliada a contagem total e diferencial de células no FLBA, a quantificação de proteína total e de citocinas no FLBA, a porcentagem de linfócitos e neutrófilos no sangue, a histopatologia pulmonar, e a mecânica respiratória basal. A **Figura 26** ilustra o delineamento experimental.

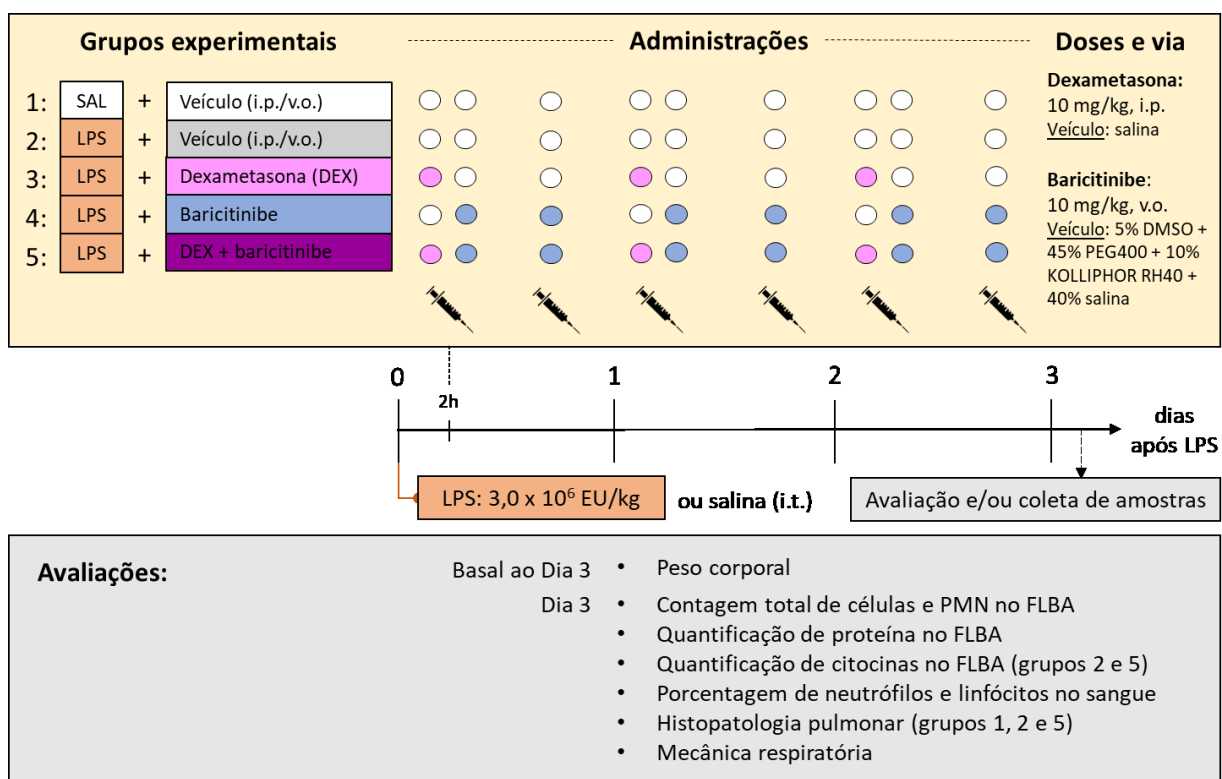


Figura 26. Delineamento do quarto bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou salina, seguido de tratamento por três dias com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia) ou cotratamento com dexametasona e baricitinibe. Os animais foram avaliados quanto ao peso corporal e indicadores de função, inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar. PMN = células polimorfonucleares.

3.4.1. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de peso corporal foi realizada por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse seguido de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se as variáveis independentes “tempo” (dias 1, 2 e 3) e “tratamento” (sham, veículo, dexametasona, baricitinibe ou dexametasona + baricitinibe). Todos os outros parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”.

Na análise de peso corporal, foi encontrado efeito significativo do fator tempo ($F_{(1,654, 90,99)} = 13,99$; $p < 0,0001$), tratamento ($F_{(4, 55)} = 64,56$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(8, 110)} = 30,98$; $p < 0,0001$). Análise subsequente da interação mostrou que o LPS causou redução progressiva do peso em animais do grupo “veículo”, e que esse efeito foi limitado pelos três tratamentos estudados ($p < 0,0001$), mas de maneira diferente (**Figura 27A**). No caso do tratamento com dexametasona, há uma recuperação parcial no segundo dia, mas uma nova redução ao fim do protocolo. No dia 3, a média de peso corporal em relação ao basal no grupo “dexametasona” é significativamente maior que no grupo “veículo” ($p < 0,0001$) mas menor do que nos grupos “baricitinibe” ($p < 0,0001$) e “dexametasona + baricitinibe” ($p = 0,0003$). Isso indica que a dexametasona é capaz de mitigar a perda inicial de massa corpórea, mas que o efeito terapêutico é menor e mais curto do que o observado na presença de baricitinibe (sozinho ou combinado). Já para o tratamento com baricitinibe, animais deste grupo somente diferenciam-se do grupo “sham” no primeiro dia, indicando neutralização do efeito do LPS sobre o peso em 48 horas após o insulto. O efeito da terapia combinada acompanhou o benefício individual do baricitinibe, com a diferença de que a recuperação de peso é menos expressiva na presença da dexametasona e está associada a uma redução em relação ao grupo “sham” ($p = 0,0160$ no dia 2; $p = 0,0021$ no dia 3).

Na contagem total de células no FLBA ($F_{(4,55)} = 140,9$; $p < 0,0001$), todos os grupos que receberam LPS apresentaram aumento da celularidade no espaço

broncoalveolar ($p < 0,0001$) e nenhum tratamento reverteu este efeito (**Figura 27B**). Quanto à comparação entre os tratamentos, foi observada uma tendência de aumento para a dexametasona e uma tendência de redução na terapia combinada, o que resultou em diferença estatística entre estes dois grupos ($p = 0,0406$). Para a contagem diferencial de células ($F_{(4,53)} = 676,4$; $p < 0,0001$; **Figura 27C**), como esperado, todos grupos apresentaram aumento da porcentagem de PMNs em relação ao grupo “sham” ($p < 0,0001$). Contudo, em relação ao veículo, há um aumento não-significativo nos animais que receberam apenas dexametasona ($p = 0,1249$) e uma redução significativa naqueles que receberam apenas baricitinibe ($p < 0,0001$). Este efeito do baricitinibe foi neutralizado quando na presença do corticosteroide, uma vez que a associação dos fármacos resultou em porcentagem significativamente maior de PMNs em relação ao baricitinibe sozinho ($p = 0,0001$) e ausência de diferença em relação ao veículo. Em paralelo, há uma redução limítrofe entre a terapia combinada e a monoterapia com dexametasona ($p = 0,0583$), que é similar à diferença na contagem total de células e sugere um antagonismo entre os fármacos nesses parâmetros.

Em relação à quantificação de proteína ($F_{(4,55)} = 46,85$; $p < 0,0001$; **Figura 27D**), o prejuízo associado à instilação de LPS em relação aos controles saudáveis ($p < 0,0001$) foi reduzido tanto pelas monoterapias ($p = 0,0212$ vs. dexametasona; $p = 0,0005$ vs. baricitinibe) quanto pela terapia combinada ($p < 0,0001$). Todavia, o efeito terapêutico é mais proeminente quando há o cotratamento, sendo observada diferença estatística em relação à monoterapia com dexametasona ($p = 0,0070$).

Na análise hematológica, diversos efeitos foram observados para a porcentagem de neutrófilos ($F_{(4,55)} = 38,99$; $p < 0,0001$) e de linfócitos ($F_{(4,55)} = 45,89$; $p < 0,0001$), e assemelham-se ao exposto na contagem diferencial de células no FLBA. Primeiro, um aumento na proporção de neutrófilos circulantes foi observado no grupo “LPS + veículo” ($p < 0,0001$), e essa alteração é ainda maior sob o tratamento com dexametasona ($p = 0,0040$ vs. veículo; **Figura 27E**). A mesma relação na direção oposta foi observada na porcentagem de linfócitos, onde a redução esperada em resposta ao LPS é acentuada pelo corticosteroide ($p = 0,0069$ vs. veículo; **Figura 27F**). Este padrão da dexametasona foi também estendido ao cotratamento, embora neste caso não haja significância estatística em relação ao tratamento com veículo ($p = 0,1076$ para neutrófilos, $p = 0,0916$ para linfócitos). Por fim, a monoterapia com o

baricitinibe foi o único tratamento associado ao reestabelecimento parcial do perfil hematológico, sendo este associado a menor porcentagem de neutrófilos em relação aos outros tratamentos ($p < 0,01$), embora ainda maior do que no grupo “sham” ($p = 0,0331$). De maneira complementar, camundongos que receberam baricitinibe apresentam contagem de linfócitos próxima à de controles saudáveis ($p = 0,0204$), e significativamente maior do que o tratamento com veículo ($p = 0,0003$), dexametasona ($p < 0,0001$) ou dexametasona + baricitinibe ($p < 0,0001$). Em resumo, o LPS gerou as alterações hematológicas esperadas, mas os tratamentos tiveram efeitos opostos: enquanto a presença da dexametasona (sozinha ou combinada) acentua as alterações, a monoterapia com baricitinibe promove reversão parcial do quadro.

Na análise histopatológica ($F_{(4,25)} = 23,42$; $p < 0,0001$), todos os animais que receberam LPS tiveram presença significativa de congestão do tecido pulmonar (indicado pela cobertura da marcação por H&E) em relação ao controle “sham” ($p < 0,001$), exceto para a combinação de fármacos onde há um efeito limítrofe ($p = 0,0581$). Animais tratados somente com dexametasona não obtiveram benefício terapêutico evidente. Em contrapartida, a monoterapia com baricitinibe e a terapia combinada foram associados à redução da congestão pulmonar em relação ao veículo ($p = 0,0088$ e $p < 0,0001$, respectivamente), em especial na combinação dos fármacos onde também há uma diferença em relação à dexametasona ($p = 0,0011$) e maior proximidade aos animais saudáveis. Esses resultados estão alinhados a outros parâmetros avaliados e, dada a importância da análise histopatológica, contribuem fortemente à evidência de superioridade da combinação dos fármacos.

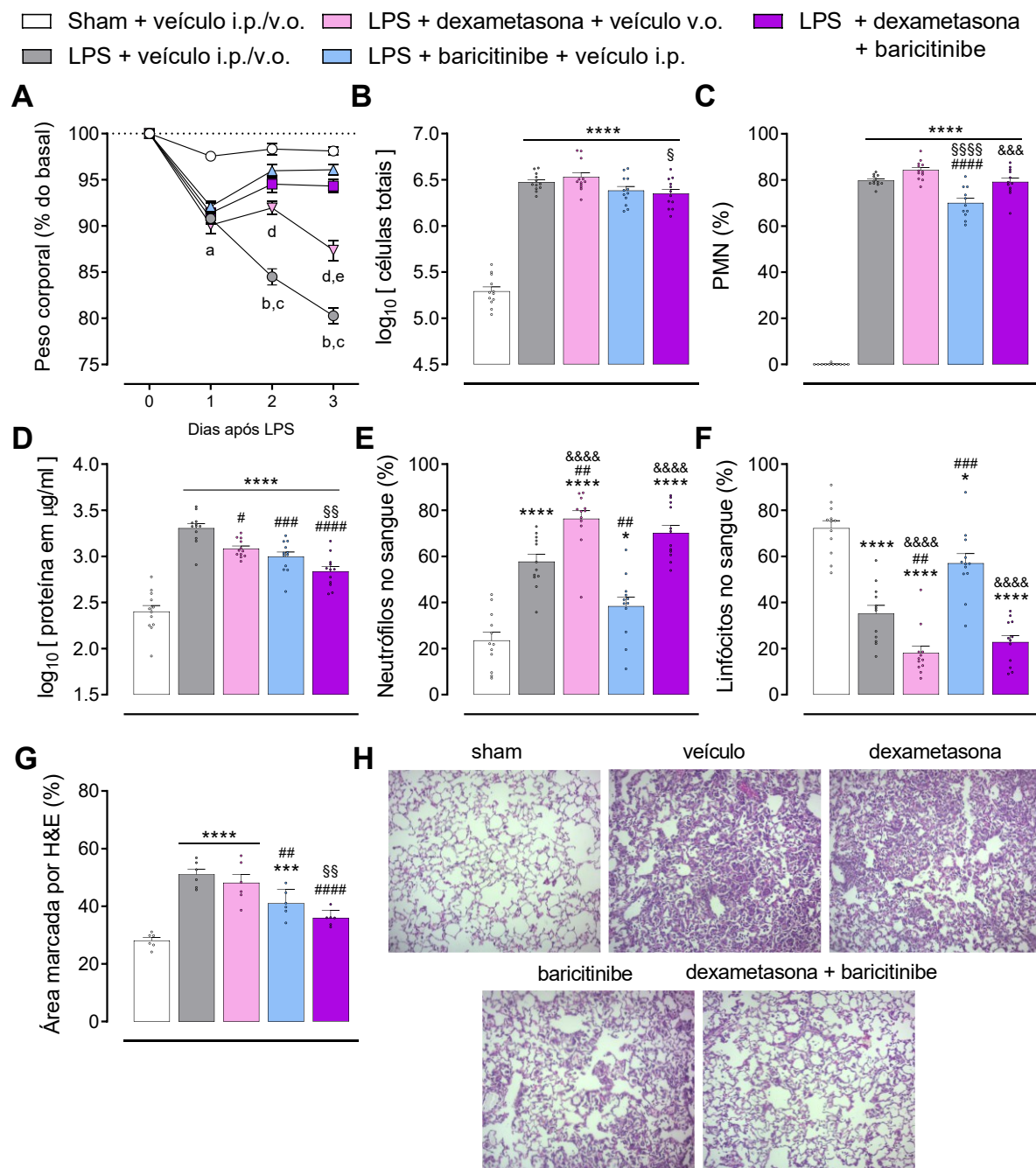


Figura 27. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. Dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia) e/ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Peso corporal, onde $p < 0,05$ em ^a = todos vs. sham, ^b = todos vs. sham, exceto baricitinibe, ^c = veículo vs. dexametasona, baricitinibe ou dexametasona + baricitinibe, ^d = dexametasona vs. baricitinibe, ^e = dexametasona vs. dexametasona + baricitinibe. (B) Contagem total de células e (C) porcentagem de PMN no FLBA. (D) Quantificação de proteína no FLBA. (E) Porcentagem de neutrófilos e (F) linfócitos no sangue. (G) Porcentagem de área alveolar marcada por H&E e (H) imagens representativas da histopatologia pulmonar (200x). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse (A) ou ANOVA de uma via (B-G) seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 12/\text{grupo}$ (A, B, D-F), 11 (sham e baricitinibe) ou 12/grupo (C), ou 6/grupo (G). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,0001$ comparado ao grupo dexametasona. &&&& $p < 0,0001$ comparado ao grupo baricitinibe. Dados representados como média + E.P.M.

3.4.2. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de mecânica respiratória foi realizada por meio de ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”. Nesta análise, foi encontrada significância estatística em quase todos os parâmetros avaliados (**Figura 28**), incluindo-se resistência sistêmica ($F_{(4,45)} = 20,15$; $p < 0,0001$), elastância sistêmica ($F_{(4,45)} = 18,40$; $p < 0,0001$), amortecimento tecidual ($F_{(4,45)} = 17,09$; $p < 0,0001$), elastância tecidual ($F_{(4,45)} = 13,65$; $p < 0,0001$), capacidade inspiratória ($F_{(4,45)} = 20,15$; $p < 0,0001$), histerese ($F_{(4,45)} = 20,15$; $p < 0,0001$) e complacência quase-estática ($F_{(4,45)} = 20,15$; $p < 0,0001$). Nestes casos, animais que receberam LPS e apenas solução veículo tiveram prejuízo significativo em relação aos controles “sham” ($p < 0,0001$). Também em todos os casos citados, com a única exceção do tratamento com dexametasona no parâmetro amortecimento tecidual ($p = 0,1019$; **Figura 28D**), tanto a monoterapia quanto a combinação das drogas de interesse reduziram os prejuízos induzidos pelo LPS ($p < 0,05$). Contudo, há diferenças potencialmente relevantes entre os tratamentos.

Primeiro, ao longo dos diferentes parâmetros, há uma tendência constante de menor prejuízo relativo em animais que receberam baricitinibe ou, principalmente, dexametasona + baricitinibe. Da perspectiva estatística, a terapia combinada teve um resultado diretamente superior à monoterapia com dexametasona nos parâmetros de resistência sistêmica ($p = 0,0174$; **Figura 28A**) e amortecimento tecidual ($p = 0,0039$; **Figura 28D**). O tratamento com baricitinibe foi superior ao tratamento com dexametasona apenas no amortecimento tecidual ($p = 0,0403$). Ainda, animais tratados com baricitinibe ou com a combinação das drogas se diferenciam dos controles saudáveis em apenas um (capacidade inspiratória, **Figura 28F**) ou nenhum parâmetro, respectivamente, sugerindo proteção quase total contra as alterações de mecânica respiratória. Em contraste, embora em melhor condição que animais do grupo “LPS + veículo”, animais tratados com dexametasona mantiveram alterações significativas em relação aos controles “sham” ($p < 0,05$), sugerindo um benefício apenas parcial.

Na resistência newtoniana e no parâmetro K, não foi observado diferença estatística. Há, contudo, a mesma tendência geral de maior prejuízo em animais que apenas receberam os veículos em comparação àqueles que receberam os tratamentos de interesse (**Figura 28C e 28G**). No gráfico de curva pressão-volume, todas as curvas pertencentes a grupos que receberam LPS estão deslocadas para baixo em relação aos animais saudáveis, corroborando o perfil restritivo da LPA induzida por LPS (**Figura 28J**). Porém, as curvas relativas ao tratamento somente com dexametasona ou com baricitinibe estão sobrepostas e possuem menor deslocamento em relação ao veículo. Isso indica uma mitigação do prejuízo à distensibilidade do sistema respiratório além de uma equivalência entre os tratamentos nesta avaliação. A curva relativa ao cotratamento, por sua vez, destaca-se por estar ainda mais próxima da dos animais do grupo “sham”, sugerindo assim uma superioridade em relação às monoterapias. Essa interpretação é condizente com a menor congestão pulmonar em animais que receberam os dois fármacos, conforme descrito na seção anterior.

□ Sham + veículo i.p./v.o. ■ LPS + dexametasona + veículo v.o. ■ LPS + dexametasona + baricitinibe
 ■ LPS + veículo i.p./v.o. ■ LPS + baricitinibe + veículo i.p.

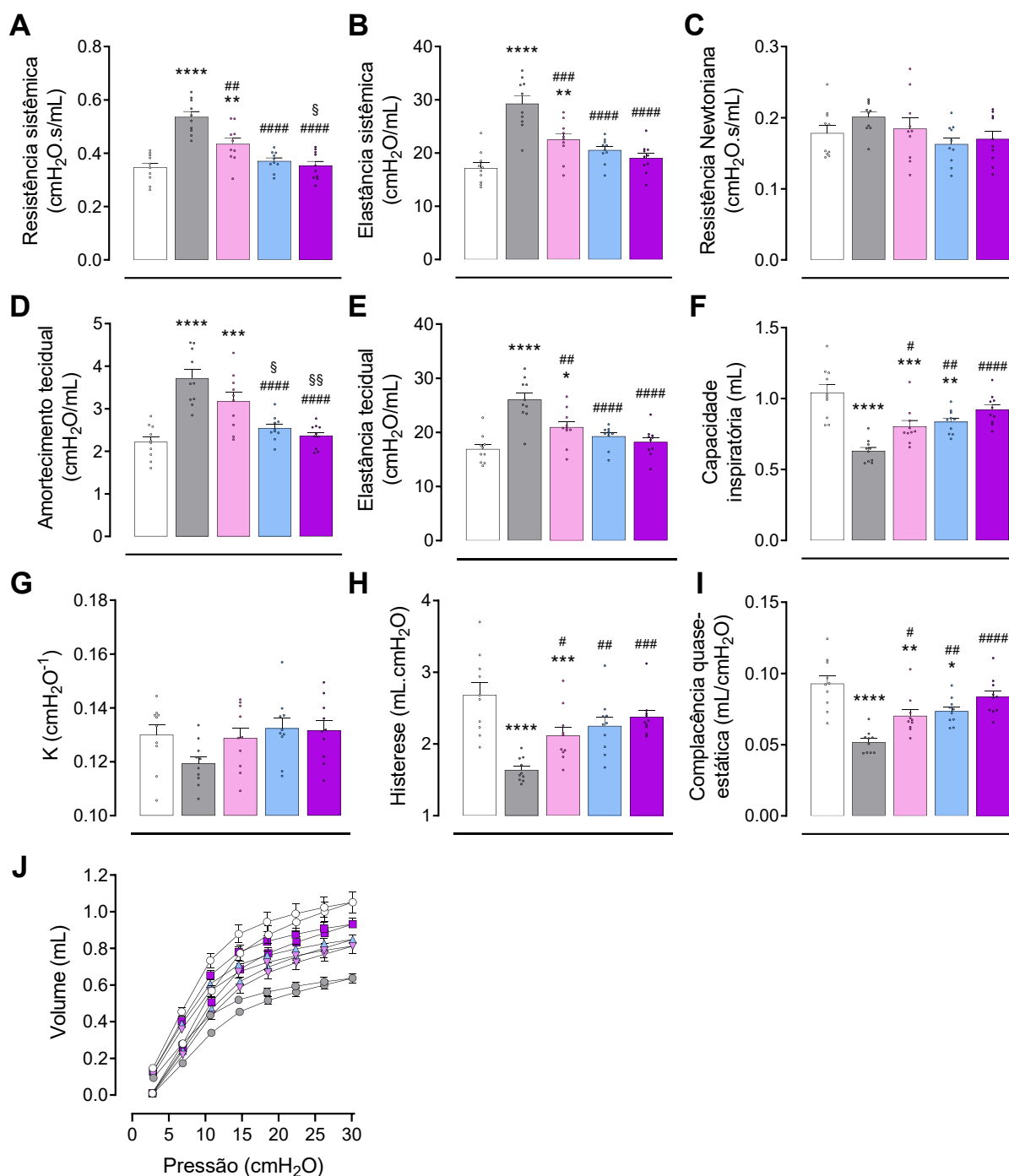


Figura 28. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a mecânica respiratória. Dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia) e/ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Resistência sistêmica, (B) elastância sistêmica, (C) resistência Newtoniana, (D) amortecimento tecidual, (E) elastância tecidual, (F) capacidade inspiratória, (G) parâmetro K, (H) histerese, (I) complacência quase-estática, (J) curva pressão-volume. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (A-I). $n = 10$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ comparado ao grupo dexametasona. Dados representados como média + E.P.M.

3.4.3. Efeitos do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de liberação de citocinas no espaço broncoalveolar foi realizada por meio de teste t não-pareado comparando-se os grupos “LPS + veículo” e “LPS + dexametasona + baricitinibe”. Com a exceção de IL-10 (que inclui diversas amostras para as quais não houve detecção da citocina), os dados foram transformados em log2 na análise estatística a fim de garantir a distribuição Gaussiana dos valores. Para a representação gráfica, foi utilizada a forma natural dos dados.

Nesta análise, foi encontrada diferença estatística significativa na quantificação de IL-6 ($t_{(18)} = 10,34$; $p < 0,0001$; **Figura 29A**), IL-12_{p70} ($t_{(16)} = 3,428$; $p = 0,0035$; **Figura 29C**), IFN- γ ($t_{(18)} = 7,419$; $p < 0,0001$; **Figura 29D**), MCP-1 ($t_{(18)} = 3,290$; $p = 0,0041$; **Figura 29E**) e TNF ($t_{(18)} = 9,150$; $p < 0,0001$; **Figura 29F**), com redução clara das citocinas em animais tratados com dexametasona e baricitinibe. Teste t para os níveis de IL-10 revelou apenas um efeito limítrofe ($p = 0,0762$), com tendência de redução sob a terapia combinada (**Figura 29B**). No geral, esses são resultados concordantes com os resultados obtidos nos experimentos anteriores e mostram amplo efeito anti-inflamatório da combinação de fármacos. De particular importância, apesar de não ter sido detectado no FLBA em 6 horas após a instilação de LPS, os níveis de IFN- γ apresentaram a maior média entre as citocinas avaliadas em 72 horas, sugerindo liberação tardia. Juntamente à IL-6, a presença de IFN- γ foi fortemente estimulada pela instilação de LPS, e quase totalmente suprimida pela combinação de dexametasona e baricitinibe.

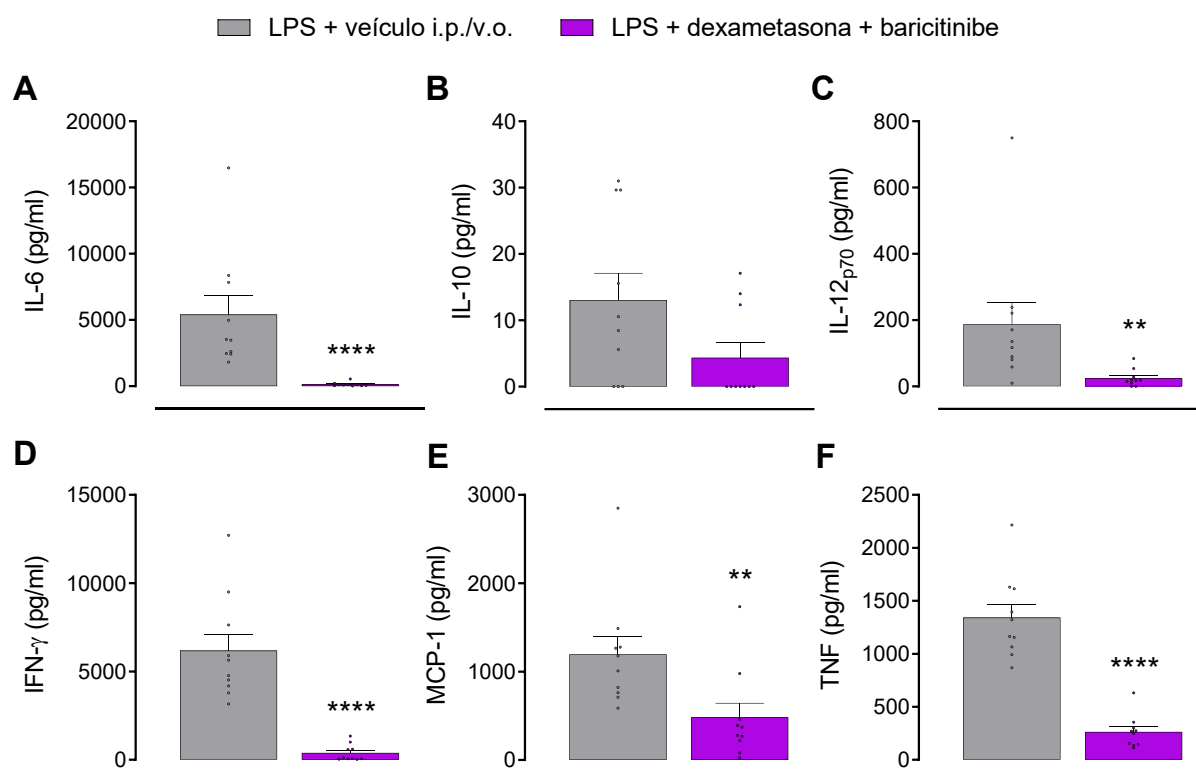


Figura 29. Efeitos do cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar. Dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia) ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg). Quantificação de (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IL-12_{p70}, (D) IFN- γ , (E) MCP-1 e (F) TNF por CBA. Os dados foram transformados em log2, exceto para IL-10, e analisados por teste *t* não-pareado. $n = 10$ /grupo, exceto na análise de IL-12 onde $n_{\text{dex+bar}} = 8$ após transformação em log2. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. Dados representados como média + E.P.M.

3.5. QUINTO BLOCO EXPERIMENTAL

No quinto bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina e depois tratados com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dexametasona (10 mg/kg, i.p., uma administração), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas administrações), ou dexametasona e baricitinibe simultaneamente (protocolos de tratamento idênticos à monoterapia). O tratamento com as drogas de interesse foi iniciado duas horas após a instilação de LPS. Após aproximadamente 24 horas, os pulmões foram coletados e armazenados até posterior processamento. Em seguida, utilizou-se a técnica de RT-qPCR para quantificar a expressão de oito genes de interesse associados à resposta imune. A **Figura 30** ilustra o delineamento experimental.

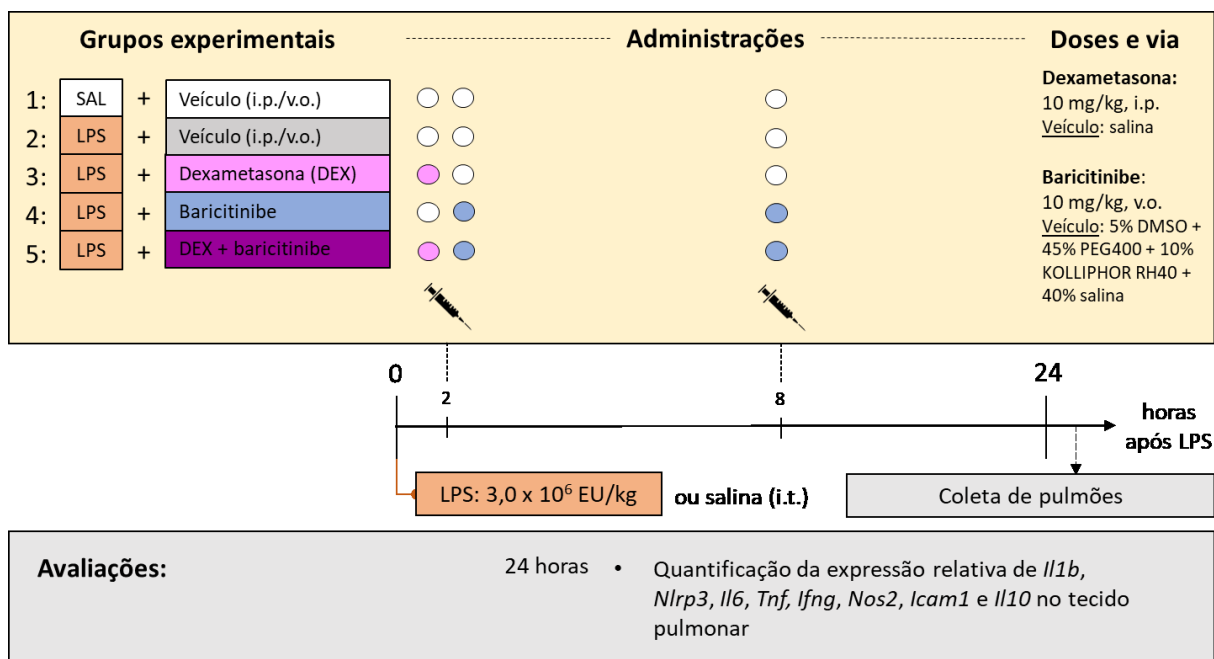


Figura 30. Delineamento do quinto bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou salina, seguido de tratamento com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dexametasona (10 mg/kg, i.p, administração única), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas administrações) ou cotratamento com dexametasona e baricitinibe. Após aproximadamente 24 horas da instilação de LPS, os pulmões foram coletados e posteriormente processados para análise de expressão gênica por RT-qPCR.

3.5.1. Efeitos da monoterapia ou cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a expressão pulmonar de oito genes de interesse em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

Os genes selecionados para análise de expressão codificam as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ , além das proteínas NLRP3 (PRR constituinte do inflamassoma NLRP3), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS; gene *Nos2*) e a molécula de adesão celular 1 (ICAM-1). A análise estatística dos dados foi realizada por meio de ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável. Na análise de *Il10*, especificamente, o grupo controle foi desconsiderado na comparação estatística visto que quatro das cinco amostras analisadas não tiveram expressão quantificável deste gene.

No ensaio de RT-qPCR, foi observada superexpressão dos genes *Il1b* ($F_{(4,21)} = 15,70$; $p < 0,0001$; **Figura 31A**), *Nlrp3* ($F_{(4,21)} = 15,94$; $p < 0,0001$; **Figura 31B**), *Il6* ($F_{(4,21)} = 9,685$; $p = 0,0001$; **Figura 31C**), *Tnf* ($F_{(4,21)} = 21,01$; $p < 0,0001$; **Figura 31D**), *Ifng* ($F_{(4,21)} = 20,92$; $p < 0,0001$; **Figura 31E**), *Nos2* ($F_{(4,20)} = 10,65$; $p < 0,0001$; **Figura 31F**) e *Icam1* ($F_{(4,21)} = 12,42$; $p < 0,0001$; **Figura 31G**). Em todos os casos, há um

aumento estatisticamente significativo de RNAm no grupo “LPS + veículo” em relação ao controle saudável ($p < 0,001$), evidenciando um perfil pró-inflamatório multialvo da transcrição pulmonar em 24 horas após a instilação de LPS. A expressão de *Il10* seguiu o mesmo padrão e mostra-se também aumentada, a despeito da ausência de comparação estatística com o grupo “sham” (**Figura 31H**).

Quanto ao efeito dos tratamentos, a expressão de *Il1b*, *Nlrp3* e *Tnf* não foi afetada significativamente pelos fármacos, apesar de tendências (comparado ao veículo) envolvendo um aumento na monoterapia com dexametasona e redução sob o baricitinibe ou terapia combinada (**Figuras 31A, 31B e 31D**). A análise da expressão relativa de *Il6* também não mostrou diferença estatística entre os tratamentos (**Figura 31C**), porém há efeitos limítrofes para o baricitinibe ou a combinação dos fármacos em relação ao veículo ($p = 0,0543$ e $p = 0,0603$, respectivamente) ou à dexametasona ($p = 0,0693$ e $p = 0,0776$, respectivamente).

A expressão de *Ifng* e *Nos2*, por outro lado, mostram resultados claros de efeito farmacológico. No primeiro caso (**Figura 31E**), há uma redução parcial associada à dexametasona ($p = 0,0130$), além de efeito do baricitinibe ($p = 0,0002$) e redução total com a combinação dos fármacos ($p < 0,0001$ vs. veículo, $p = 0,0042$ vs. dexametasona). No caso do *Nos2* (**Figura 31F**), não houve efeito do corticosteroide e há redução total da expressão na monoterapia com o baricitinibe ($p = 0,0005$ vs. veículo, $p = 0,0048$ vs. dexametasona), assim como redução significativa na combinação de ambos ($p = 0,0149$). Quanto ao *Icam1*, não houve diferença entre os fármacos e o veículo, porém há novamente uma tendência da ampliação do efeito do LPS pela dexametasona, mesmo na combinação dos fármacos (**Figura 31G**). O efeito do baricitinibe é oposto, apresentando um efeito limítrofe à significância estatística no que diz respeito à comparação com a dexametasona ($p = 0,0673$). De maneira semelhante, se comparado ao veículo, há tendências na expressão de *Il10* que sugerem aumento induzido pela dexametasona e redução na monoterapia com baricitinibe ($p = 0,1081$ vs. dexametasona; **Figura 31H**).

Em resumo, em 24 horas após o LPS, uma única administração de dexametasona foi associada à ausência de efeito sobre a expressão dos genes avaliados, com exceção de uma redução parcial da expressão de *Ifng*. Um ponto interessante é a tendência consistente de aumento na expressão dos outros genes, o que inclui os associados a citocinas pró-inflamatórias e morte celular (*Il1b*, *Nlrp3*, *Tnf*),

molécula de adesão importante para a infiltração de neutrófilos nos pulmões (*Icam1*), e a citocina anti-inflamatória IL-10 (*Il10*). Em paralelo, o baricitinibe e a combinação de fármacos tiveram efeitos semelhantes entre si, e forte supressão da expressão de *Ifng* e *Nos2* sugerem envolvimento importante destes genes na eficácia sobre a LPA.

□ Sham + veículo i.p./v.o. ■ LPS + dexametasona + veículo v.o. ■ LPS + dexametasona + baricitinibe
 ■ LPS + veículo i.p./v.o. ■ LPS + baricitinibe + veículo i.p.

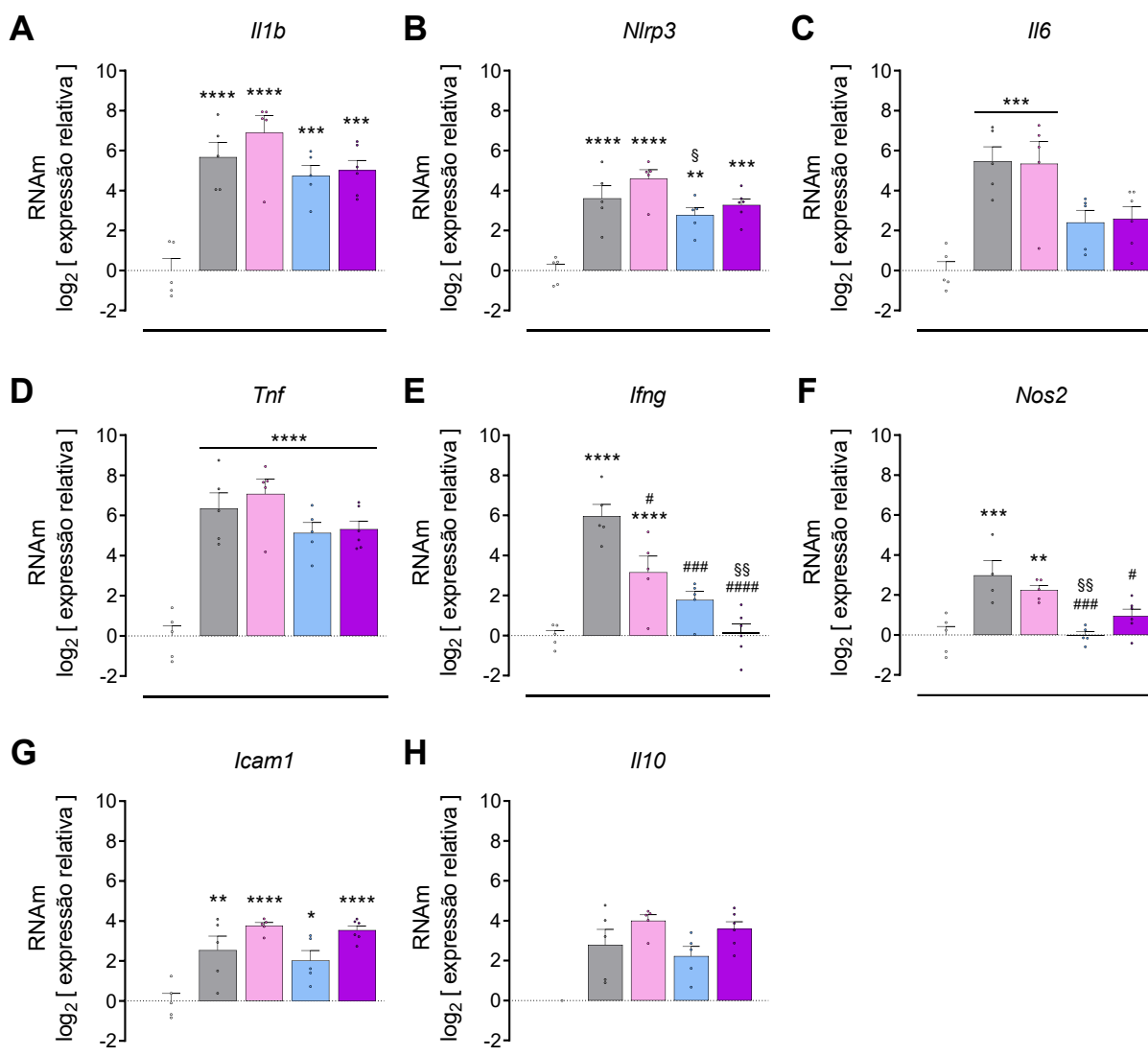


Figura 31. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dexametasona e baricitinibe sobre a expressão pulmonar relativa de oito genes de interesse. Dexametasona (10 mg/kg, i.p., administração única), baricitinibe (10 mg/kg, v.o., duas administrações) e/ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por 24 horas a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. Expressão relativa de RNAm para os genes (A) *Il1b*, (B) *Nlrp3*, (C) *Il6*, (D) *Tnf*, (E) *Ifng*, (F) *Nos2*, (G) *Icam1* e (H) *Il10*. Os dados foram normalizados pela expressão do gene de referência *Gapdh* e posteriormente pela média do grupo controle (sham) para cada gene. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 5$ ou 6 (dexametasona + baricitinibe) por grupo, exceto em (F) onde $n_{LPS+veículo} = 4$. A expressão de *Il10* (H) só foi quantificável em um único indivíduo do grupo sham, sendo este grupo desconsiderado na análise estatística. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ comparado ao grupo dexametasona. Dados representados como média + E.P.M.

3.6. SEXTO BLOCO EXPERIMENTAL

Apesar de solução salina ser comumente utilizada como um controle negativo em estudos com administração de anticorpos *in vivo*, existem falhas essenciais a este uso que podem comprometer a interpretação dos dados. Isso se deve ao fato de que a solução salina não reproduz o efeito da ativação generalizada e não-específica de receptores Fc (expresso em células do sistema imune) que é gerada pela administração de um anticorpo exógeno. Por isso, para um controle apropriado deve ser utilizado um controle isotípico, que é um anticorpo que detém as mesmas características, mas sem a capacidade neutralizante. Logo, posto que este estudo investiga a eficácia de anticorpos neutralizantes, primeiro foi avaliado se a presença do controle isotípico poderia afetar parâmetros de interesse na LPA.

No sexto bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 receberam administração única (i.p.) de solução veículo (300 μ l) ou duas doses independentes de controle isotípico (IgG1 de hamster armênio; 500 ou 1000 μ g). Uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) e monitorados por três dias. O peso corporal foi registrado diariamente durante o protocolo e, após o terceiro dia, foi avaliada a contagem total de células no FLBA, a quantificação de proteína no FLBA, e a porcentagem de linfócitos no sangue. A **Figura 32** ilustra o delineamento experimental.

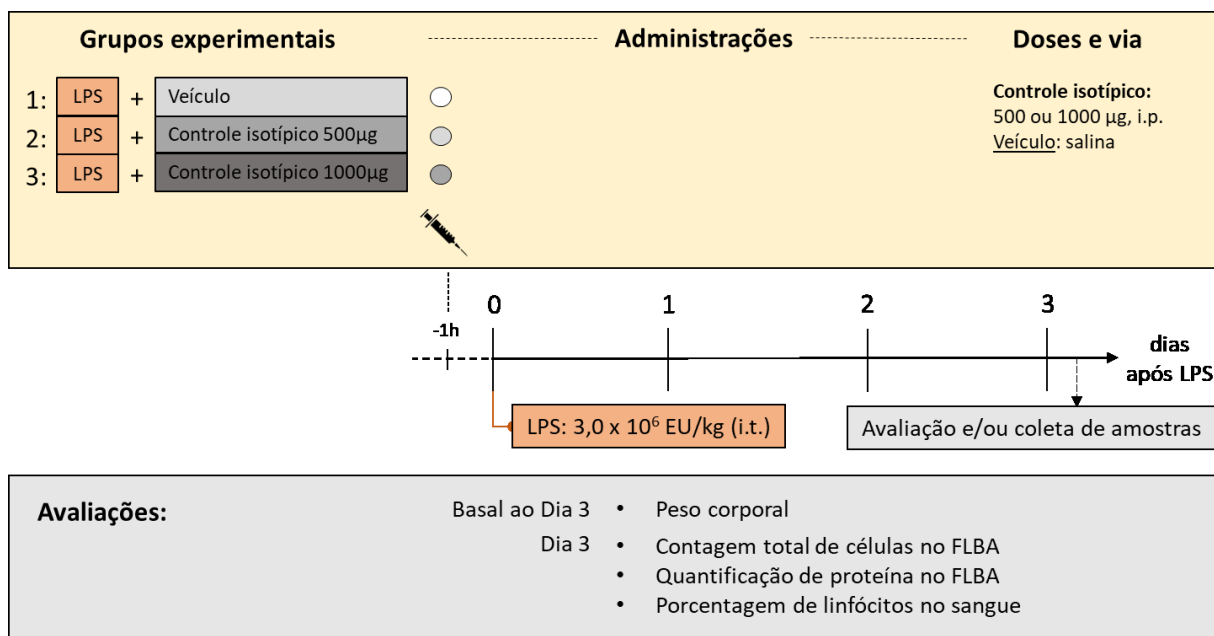


Figura 32. Delineamento do sexto bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam administração única (i.p.) de solução veículo (300 µl) ou duas doses de controle isotópico (500 ou 1000 µg). Uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS (3,0 x 10⁶ EU/kg) e monitorados por três dias, sendo avaliados quanto ao peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar.

3.6.1. Efeitos do tratamento com controle isotópico sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de peso corporal foi realizada por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse, considerando-se as variáveis independentes “tempo” (dias 1, 2 e 3) e “tratamento” (LPS seguido de veículo, 500 µg ou 1000 µg de controle isotópico). Nesta análise, foi encontrado efeito significativo e isolado do fator tempo ($F_{(1,485, 31,19)} = 325,4$; $p < 0,0001$), indicando que o LPS induziu perda progressiva de peso corporal ao longo dos dias de maneira independente da presença ou da dose de controle isotópico ($p < 0,0001$; **Figura 33A** – efeito não apontado no gráfico).

O restante dos dados foi analisado por ANOVA de uma via. Neste caso, não foi observada significância estatística na contagem total de células no FLBA ($F_{(2,21)} = 0,01003$; $p = 0,9900$; **Figura 33B**), na quantificação de proteína no FLBA ($F_{(2,21)} = 0,1784$; $p = 0,8379$; **Figura 33C**) ou na porcentagem de linfócitos no sangue ($F_{(2,21)} = 1,132$; $p = 0,3412$; **Figura 33D**). Logo, de maneira alinhada ao peso corporal, a

ausência de efeito nestes dados indica que a administração de controle isotópico não afeta significativamente parâmetros importantes da LPA induzida por LPS.

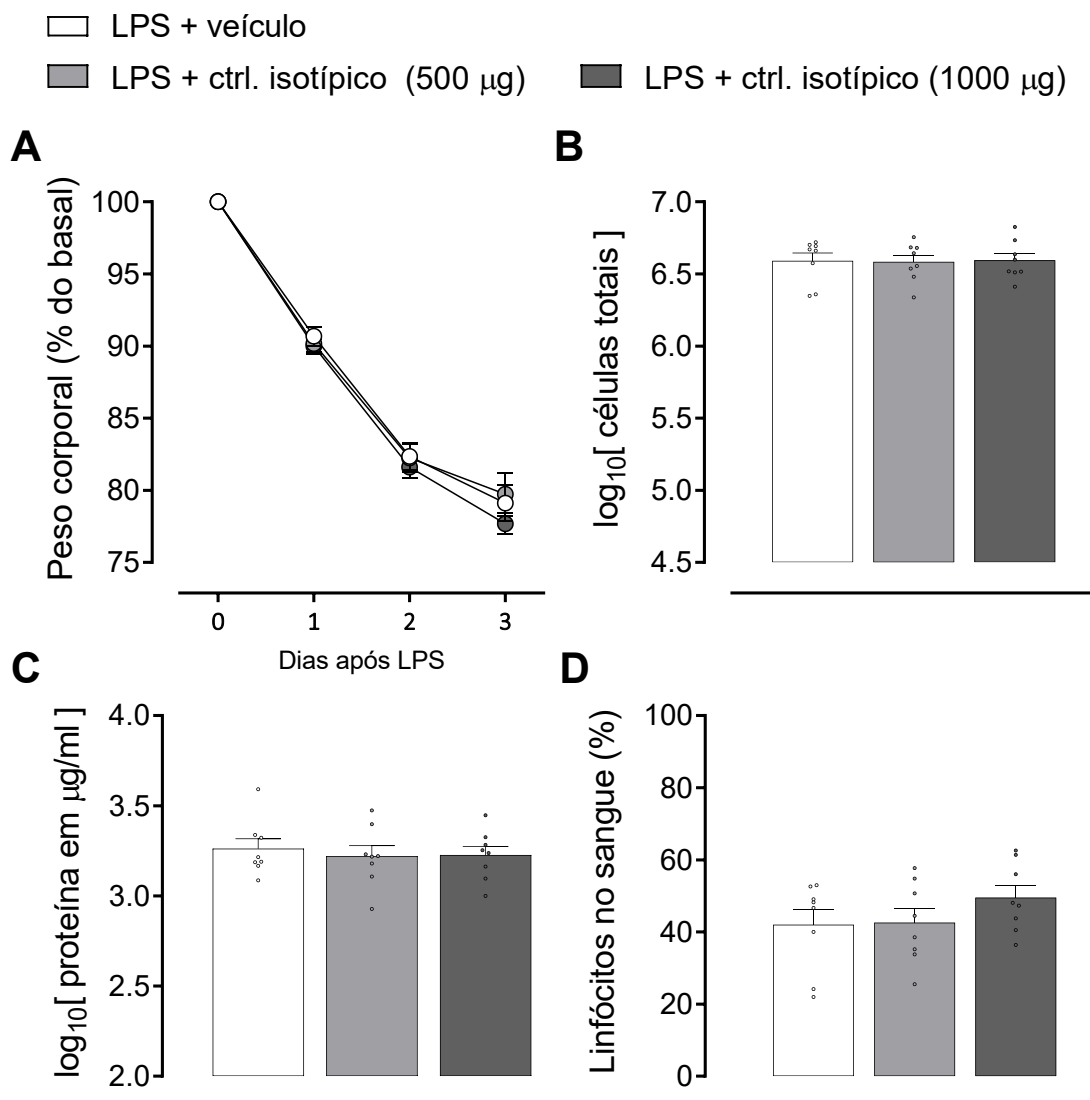


Figura 33. Efeitos do tratamento com controle isotópico sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. Controle isotópico (500 ou 1000µg) ou solução veículo (300 µl) foram administrados a camundongos CD-1 machos (injeção única, i.p.) uma hora antes da instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg). (A) Peso corporal, (B) contagem total de células no FLBA, (C) quantificação de proteína no FLBA e (D) porcentagem de linfócitos no sangue. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse seguido de teste *post hoc* de Tukey (A) ou ANOVA de uma via (B-D). n = 8/grupo. Dados representados como média + E.P.M.

3.7. SÉTIMO BLOCO EXPERIMENTAL

No sétimo bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 receberam administração única (i.p.) de solução veículo (300 µl), controle isotópico (500 µg), anti-TNF (500 µg), anti-IFN- γ (500 µg) ou anti-TNF e anti-IFN- γ

simultaneamente (500 µg cada). Aproximadamente uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) e monitorados por três dias. O peso corporal foi registrado diariamente durante o protocolo e, após o terceiro dia, foi avaliada a contagem total e diferencial de células no FLBA, a quantificação de proteína total e citocinas no FLBA, a porcentagem de linfócitos e neutrófilos no sangue, a histopatologia pulmonar, e a mecânica respiratória basal. O delineamento experimental está ilustrado na **Figura 34**.

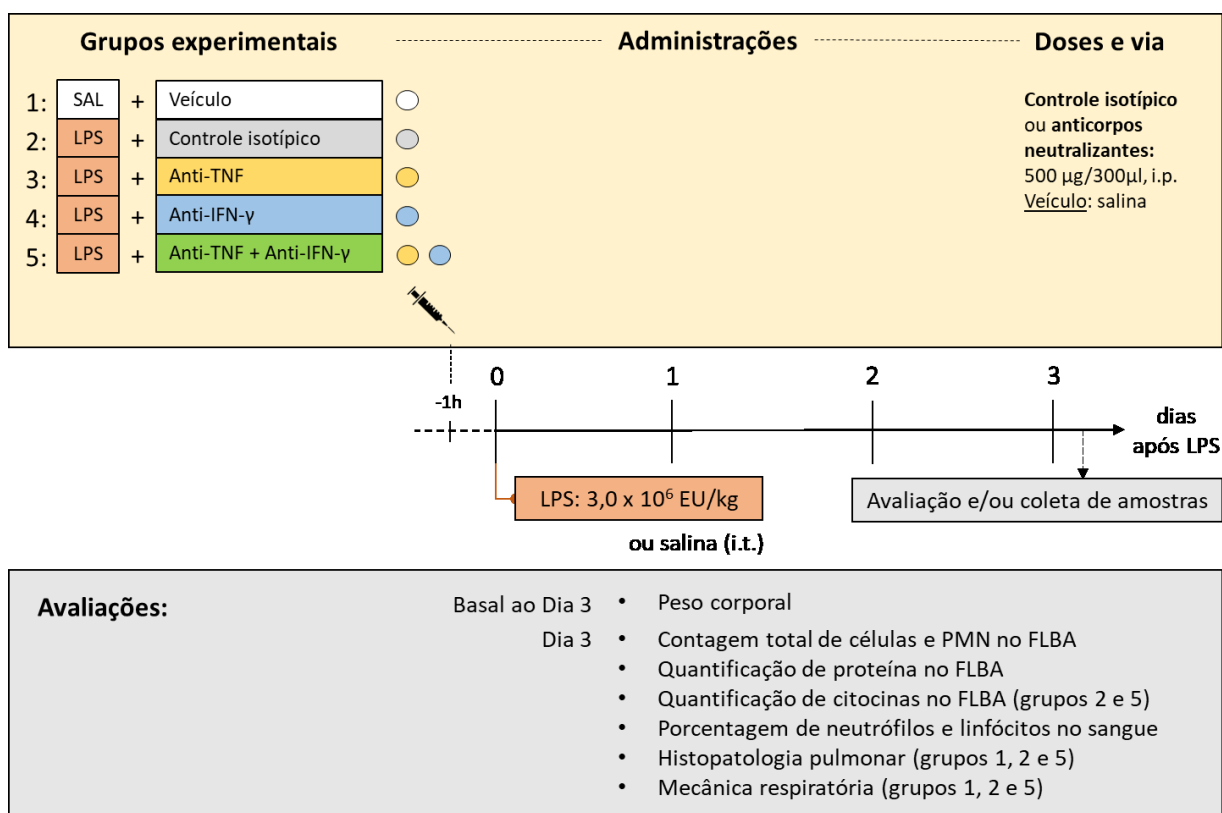


Figura 34. Delineamento do sétimo bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam administração única (i.p.) de solução veículo (300 µl), controle isotípico (500 µg), anti-TNF (500 µg), anti-IFN-γ (500 µg) ou anti-TNF e anti-IFN-γ simultaneamente (500 µg cada). Uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina e monitorados por três dias, sendo avaliados quanto ao peso corporal, indicadores de função, inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar. PMN = células polimorfonucleares.

3.7.1. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN-γ sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de peso corporal foi realizada por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse seguido de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se as variáveis independentes “tempo” (dias 1, 2 e 3) e “tratamento” (sham, controle isotópico, anti-TNF, anti-IFN- γ , anti-TNF + anti-IFN- γ). Todos os outros parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável.

Na análise de peso corporal, foi encontrado efeito significativo do fator tempo tratamento ($F_{(4, 45)} = 19,08$; $p < 0,0001$) e da interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(8, 90)} = 7,451$; $p < 0,0001$). Análise subsequente da interação mostrou que, entre os grupos que receberam LPS, só os tratados com controle isotópico ou monoterapia neutralizante tiveram redução de peso diferente do controle sham no primeiro ($p < 0,001$) e no segundo dia ($p < 0,05$; **Figura 35A**). Ao terceiro dia, todos os grupos, inclusive o que recebeu a combinação de anticorpos neutralizantes, apresentaram redução significativa de peso em relação ao basal se comparado aos controles saudáveis ($p < 0,05$). Porém, o cotratamento foi associado a uma perda de peso significativamente menor do que no grupo “controle isotópico” (dias 2 e 3, $p < 0,0001$), além de menor perda de peso do que no tratamento com anti-TNF (dia 3; $p = 0,0383$). Ambas as monoterapias tiveram um efeito heterogêneo sobre o peso corporal, com uma maior (anti-IFN- γ) ou menor (anti-TNF) porção dos animais demonstrando algum benefício e o restante alinhado ao tratamento com controle isotópico.

Na contagem total de células no FLBA ($F_{(4,45)} = 121,8$; $p < 0,0001$), todos os grupos que receberam LPS apresentaram aumento da infiltração de células no espaço broncoalveolar ($p < 0,0001$; **Figura 35B**) e nenhum efeito dos tratamentos de interesse foi observado. Já na porcentagem de PMN ($F_{(4,42)} = 260,6$; $p < 0,0001$; **Figura 35C**), camundongos tratados com anti-IFN- γ ou, em especial, com a combinação anti-TNF + anti-IFN- γ , apresentaram menor frequência de PMNs em relação a células mononucleares se comparados ao grupo “controle isotópico” ($p = 0,0386$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Há também uma redução significativa de PMN sob o tratamento combinado em comparação com a monoterapia com anti-TNF ($p = 0,0016$) e uma forte tendência se comparado ao anti-IFN- γ ($p = 0,0507$). Esses resultados sugerem que, embora não tenha sido identificada alteração no influxo total de células, há muito

menos PMNs (majoritariamente neutrófilos) no espaço broncoalveolar de animais que receberam a combinação de anticorpos neutralizantes.

Superioridade do cotratamento é também observada na quantificação total de proteína no FLBA ($F_{(4,45)} = 45,20$; $p < 0,0001$; **Figura 35D**), onde todos os grupos têm um aumento associado à instilação de LPS ($p < 0,0001$) mas este efeito é significativamente limitado no grupo com terapia combinada em relação ao controle isotópico ($p < 0,0001$) ou anti-IFN- γ ($p = 0,0009$). A neutralização única do TNF também reduziu a concentração de proteína no espaço broncoalveolar ($p = 0,0071$ vs. controle isotópico), e esse efeito é nominalmente menor do que no cotratamento, mas estatisticamente equivalente ($p = 0,3053$).

Na análise hematológica (**Figura 35E**), dados da frequência de neutrófilos ($F_{(4,45)} = 5,398$; $p = 0,0012$) mostram um aumento estatisticamente significativo em animais tratados com controle isotópico em relação ao controle saudável ($p = 0,0008$). Este aumento não foi observado nas monoterapias, mas é limítrofe para o anti-TNF ($p = 0,0546$). Além disso, em animais tratados com a combinação de anticorpos neutralizantes, o número de neutrófilos é menor do que no grupo “controle isotópico” ($p = 0,0209$). Em relação à contagem de linfócitos ($F_{(4,45)} = 7,636$; $p < 0,0001$), houve redução em animais que receberam controle isotópico ($p < 0,0001$), anti-TNF ($p = 0,0075$) e anti-IFN- γ ($p = 0,0464$), mas não no grupo com o cotratamento ($p = 0,6851$). Para este grupo, há uma maior porcentagem de linfócitos em relação ao controle isotópico ($p = 0,0049$), indicando um benefício direto do tratamento. No geral, os dados indicam que a neutralização simultânea de TNF e IFN- γ , mas não individual, reduz de maneira estatisticamente significativa as alterações hematológicas induzidas pelo LPS. Ainda, esta redução do efeito ocorre ao ponto em que o grupo que recebeu o cotratamento tem valores próximos e estatisticamente equivalentes aos controles saudáveis.

Na análise histopatológica ($F_{(2,15)} = 32,86$; $p < 0,0001$), foi encontrado aumento da marcação por H&E tanto no grupo “controle isotópico” ($p < 0,0001$) quanto no grupo “anti-TNF + anti-IFN- γ ” ($p = 0,0124$), indicando prejuízo nos dois casos em relação ao “sham”. Todavia, a congestão pulmonar é significativamente menor nos animais que receberam os anticorpos neutralizantes ($p = 0,0007$), em conformidade com os outros indicadores de inflamação e lesão pulmonar avaliados no FLBA, além do peso corporal e hematologia. Assim, tem-se que a neutralização específica das citocinas

TNF e IFN- γ foi capaz de mitigar o prejuízo em todas as análises realizadas, incluindo-se a histopatologia.

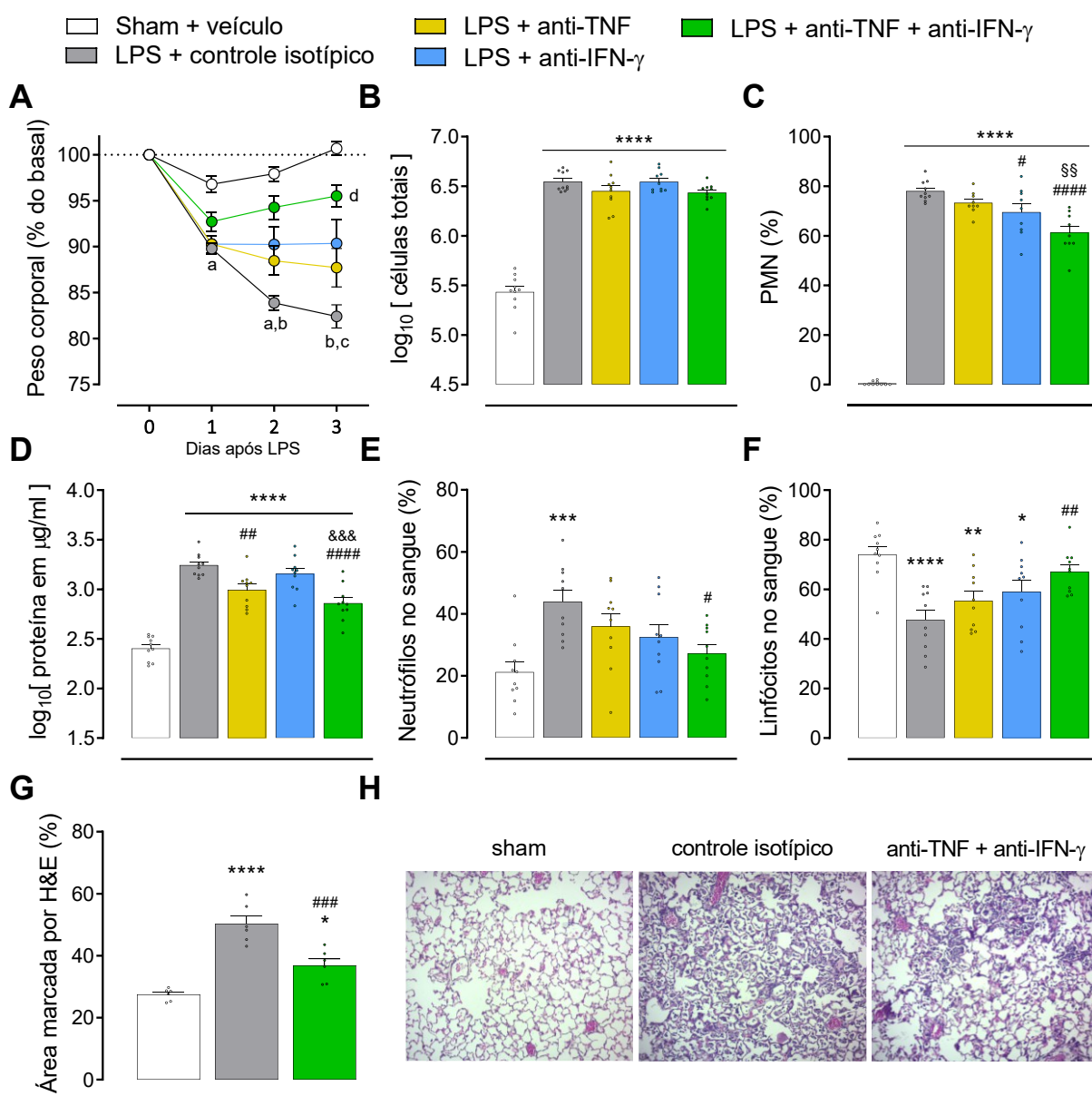


Figura 35. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. Controle isotópico (500 μg), anti-TNF (500 μg), anti-IFN- γ (500 μg), anti-TNF + anti-IFN- γ (500 μg cada) ou solução veículo (300 μl) foram administrados a camundongos CD-1 machos (injeção única, i.p.) uma hora antes da instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Peso corporal, onde $p < 0,05$ em ^a = todos vs. sham, exceto anti-TNF + anti-IFN- γ , ^b = controle isotópico vs. anti-TNF + anti-IFN- γ , ^c = todos vs. sham, ^d = anti-TNF + anti-IFN- γ vs. anti-TNF. (B) Contagem total de células e (C) porcentagem de PMN no FLBA. (D) Quantificação de proteína no FLBA. (E) Porcentagem de neutrófilos e (F) linfócitos no sangue. (G) Porcentagem de área alveolar marcada por H&E e (H) imagens representativas da histopatologia pulmonar (200x). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse (A) ou ANOVA de uma via (B-G) seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$ (A, B, D-F), 9 a 10 (C; anti-TNF, anti-IFN- γ e anti-TNF + anti-IFN- γ = 9) ou 6 animais por grupo (G). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. §§ $p < 0,01$ comparado ao grupo anti-TNF. && $p < 0,001$ comparado ao grupo anti-IFN- γ . Dados representados como média + E.P.M.

3.7.2. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de mecânica respiratória foi realizada por meio de ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”. Nesta análise, foi encontrada significância estatística em quase todos os parâmetros avaliados (**Figura 36**), incluindo-se resistência sistêmica ($F_{(2,27)} = 28,70$; $p < 0,0001$), elastância sistêmica ($F_{(2,27)} = 43,41$; $p < 0,0001$), amortecimento tecidual ($F_{(2,27)} = 29,55$; $p < 0,0001$), elastância tecidual ($F_{(2,27)} = 46,78$; $p < 0,0001$), capacidade inspiratória ($F_{(2,27)} = 56,61$; $p < 0,0001$), histerese ($F_{(2,27)} = 18,25$; $p < 0,0001$) e complacência quase-estática ($F_{(2,27)} = 39,41$; $p < 0,0001$). Nestes casos, animais que receberam LPS e o controle isotópico tiveram prejuízo significativo em relação aos controles saudáveis ($p < 0,0001$). Já os animais previamente tratados com anticorpos neutralizantes de TNF e IFN- γ apresentaram, nos mesmos parâmetros, prejuízo significativamente menor do que os que receberam controle isotópico. Ainda, apenas foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo “anti-TNF + anti-IFN- γ ” e o grupo “sham” nos parâmetros de elastância sistêmica (**Figura 36B**), elastância tecidual (**Figura 36E**), capacidade inspiratória (**Figura 36F**) e complacência quase-estática (**Figura 36I**), sendo os valores do grupo tratado bastante próximos àqueles do controle negativo. No mais, um efeito marginal foi observado na medida da histerese (**Figura 36H**, $p = 0,0515$). Dessa forma, considerada toda a análise, demonstra-se que o tratamento não somente reduz os efeitos do LPS como também está associado à prevenção quase completa dos prejuízos em relação aos animais saudáveis.

Por fim, no gráfico de curvas pressão-volume, observa-se que a curva referente ao grupo “controle isotópico” está achatada e deslocada para baixo, enquanto a do grupo tratado com a associação de anticorpos aproxima-se da do grupo “sham” (**Figura 36J**). Assim, em acordo com a avaliação de capacidade inspiratória, entende-se que a distensibilidade do sistema respiratório é muito maior no grupo “anti-TNF + anti-IFN- γ ” do que entre os que apenas receberam o controle isotópico, embora ainda exista um prejuízo observável em relação aos animais saudáveis para valores de pressão maior ou igual a 15 cmH₂O.

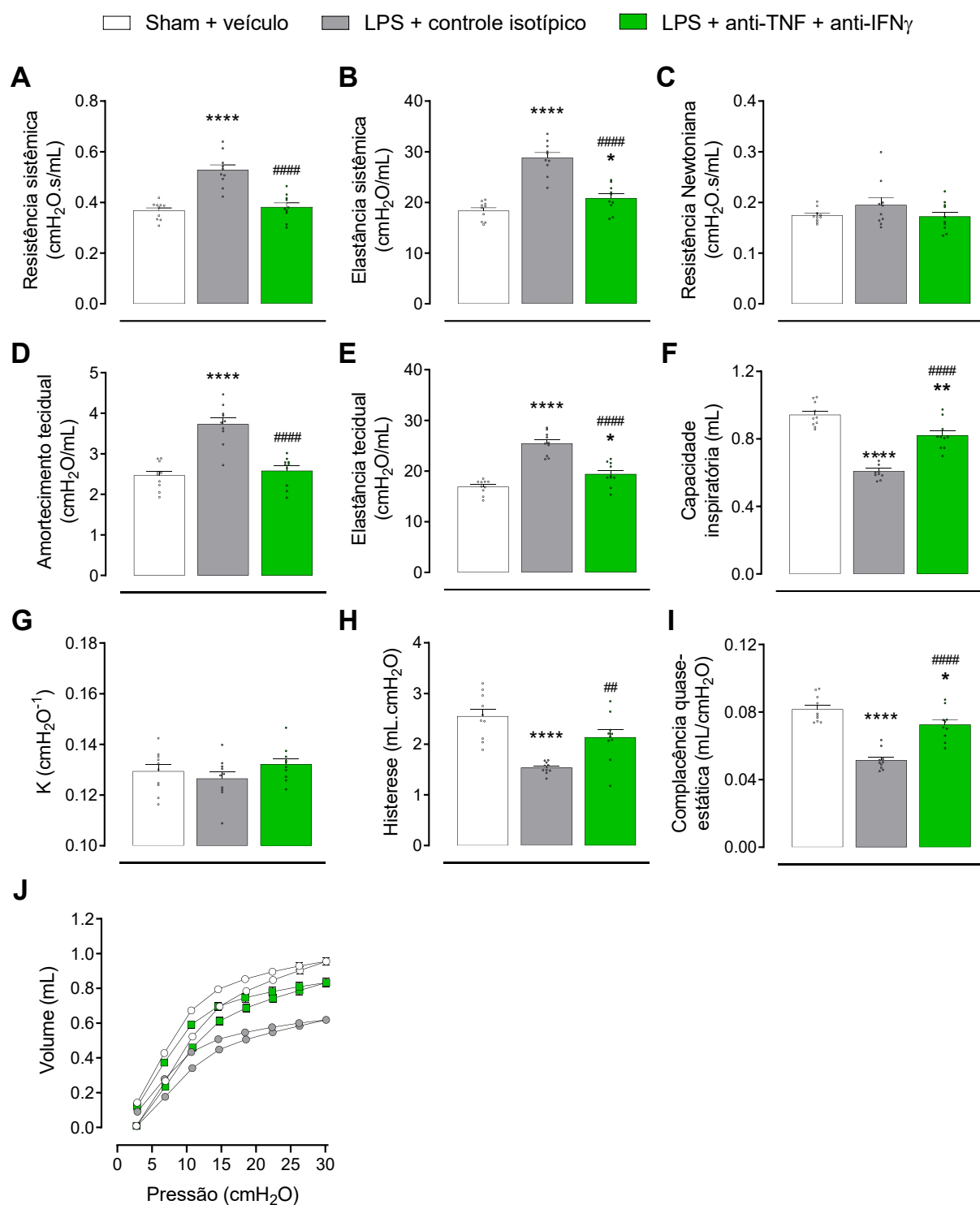


Figura 36. Efeitos da monoterapia e cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a mecânica respiratória. Controle isotópico (500 μ g), anti-TNF (500 μ g), anti-IFN- γ (500 μ g) ou solução veículo (300 μ l) foram administrados a camundongos CD-1 machos (injeção única, i.p.) uma hora antes da instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Resistência sistêmica, (B) elastância sistêmica, (C) resistência Newtoniana, (D) amortecimento tecidual, (E) elastância tecidual, (F) capacidade inspiratória, (G) parâmetro K, (H) histerese, (I) complacência quase-estática, (J) curva pressão-volume. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (A-I). $n = 10$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. ### $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle isotópico. Dados representados como média + E.P.M.

3.7.3. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de liberação de citocinas no espaço broncoalveolar foi realizada por meio de teste t não-pareado (IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1 e TNF) ou teste de Mann-Whitney (IFN- γ) comparando-se os grupos “LPS + controle isotópico” e “LPS + anti-TNF e anti-IFN- γ ”. Os resultados de IL-6, IL-12 e MCP-1 foram transformados em log₂ na análise estatística a fim de garantir a distribuição Gaussiana. Para a representação gráfica, foi utilizada a forma natural dos dados.

Nesta análise, foi encontrada diferença estatística significativa na presença de IL-6 ($t_{(18)} = 5,541$; $p < 0,0001$; **Figura 37A**), IL-12_{p70} ($t_{(17)} = 4,145$; $p = 0,0007$; **Figura 37C**), IFN- γ ($U = 7$; $p = 0,0005$; **Figura 37D**) e TNF ($t_{(18)} = 9,258$; $p < 0,0001$; **Figura 37F**) no FLBA, sendo que há forte redução em animais que receberam os anticorpos neutralizantes se comparado ao controle isotópico. O efeito terapêutico é comparável ao da combinação de dexametasona e baricitinibe, com a exceção de que não há efeito dos anticorpos anti-TNF e anti-IFN- γ sobre a liberação de MCP-1. Assim, como sugerido pelos outros parâmetros inflamatórios, hematológicos e fisiológicos avaliados, a combinação dos anticorpos neutralizantes de TNF e IFN- γ mostra-se eficaz na atenuação da hipercitocinemia associada à LPA induzida por LPS.

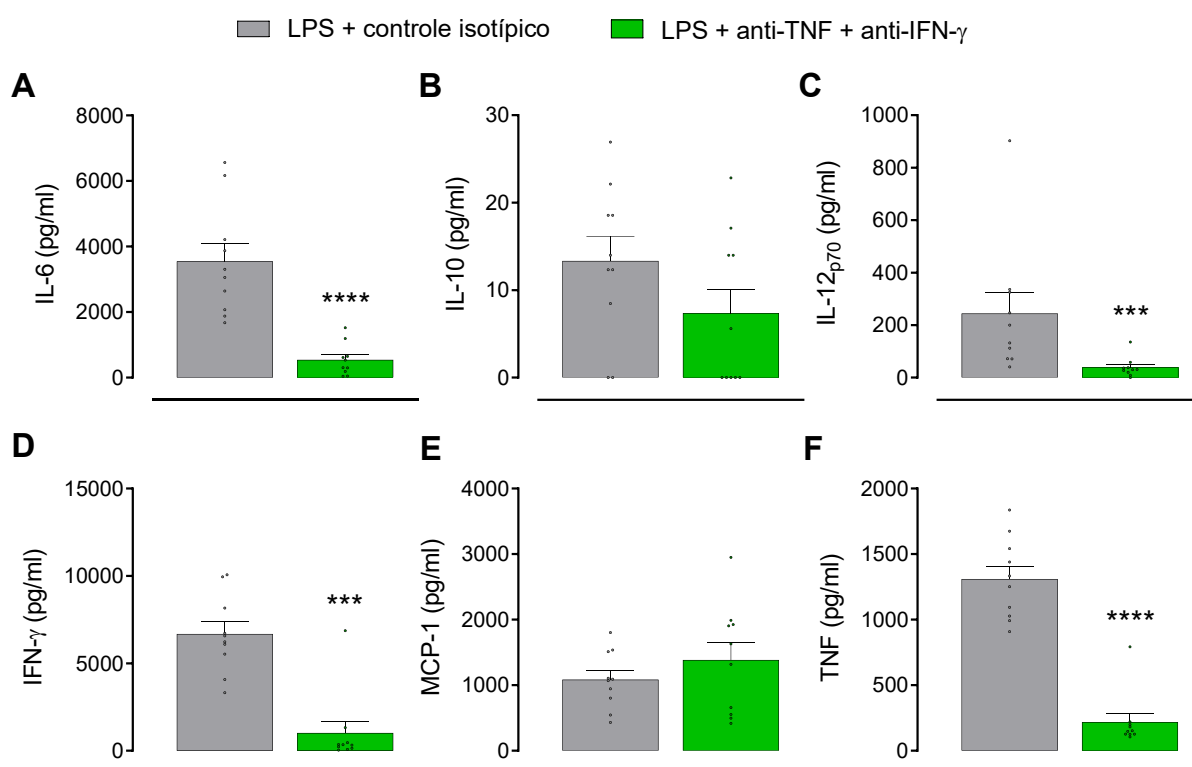


Figura 37. Efeitos do cotratamento com anticorpos monoclonais neutralizantes de TNF e IFN- γ sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar. Controle isotópico (500 μ g) ou anti-TNF (500 μ g) e anti-IFN- γ (500 μ g) foram administrados a camundongos CD-1 machos (injeção única, i.p.) uma hora antes da instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg). Quantificação de (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IL-12_{p70}, (D) IFN- γ , (E) MCP-1 e (F) TNF por CBA. Teste *t* não-pareado (A-C, E e F) ou teste de Mann-Whitney (D). Os dados de IL-6, IL-12 e MCP-1 foram transformados em log₂ para análise estatística. $n = 10$ /grupo, exceto na análise de IL-12 onde $n_{\text{anti-TNF+anti-IFN}\gamma} = 9$ após transformação em log₂. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle isotópico. Dados representados como média + E.P.M.

3.8. OITAVO BLOCO EXPERIMENTAL

No oitavo bloco de experimentos, camundongos machos da linhagem CD-1 foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou salina e depois tratados por três dias com soluções veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dinaciclibe (2,5 mg/kg, i.p.), MCC950 (10 mg/kg, v.o.), ou dinaciclibe e MCC950 simultaneamente (protocolos de tratamento idênticos à monoterapia). O tratamento com as drogas de interesse foi iniciado duas horas após a instilação de LPS, sendo que os animais receberam duas administrações de cada droga no primeiro dia e uma administração ao dia nos dois dias subsequentes. O peso corporal foi registrado diariamente durante o protocolo e, após o terceiro dia, foi avaliada a contagem total e diferencial de células no FLBA, a quantificação de proteína total e citocinas no FLBA, a porcentagem de linfócitos e neutrófilos no sangue, e a mecânica respiratória basal. Amostras para a

histopatologia pulmonar também foram coletadas, mas estão em processamento no momento da escrita deste trabalho. A **Figura 38** ilustra o delineamento experimental.

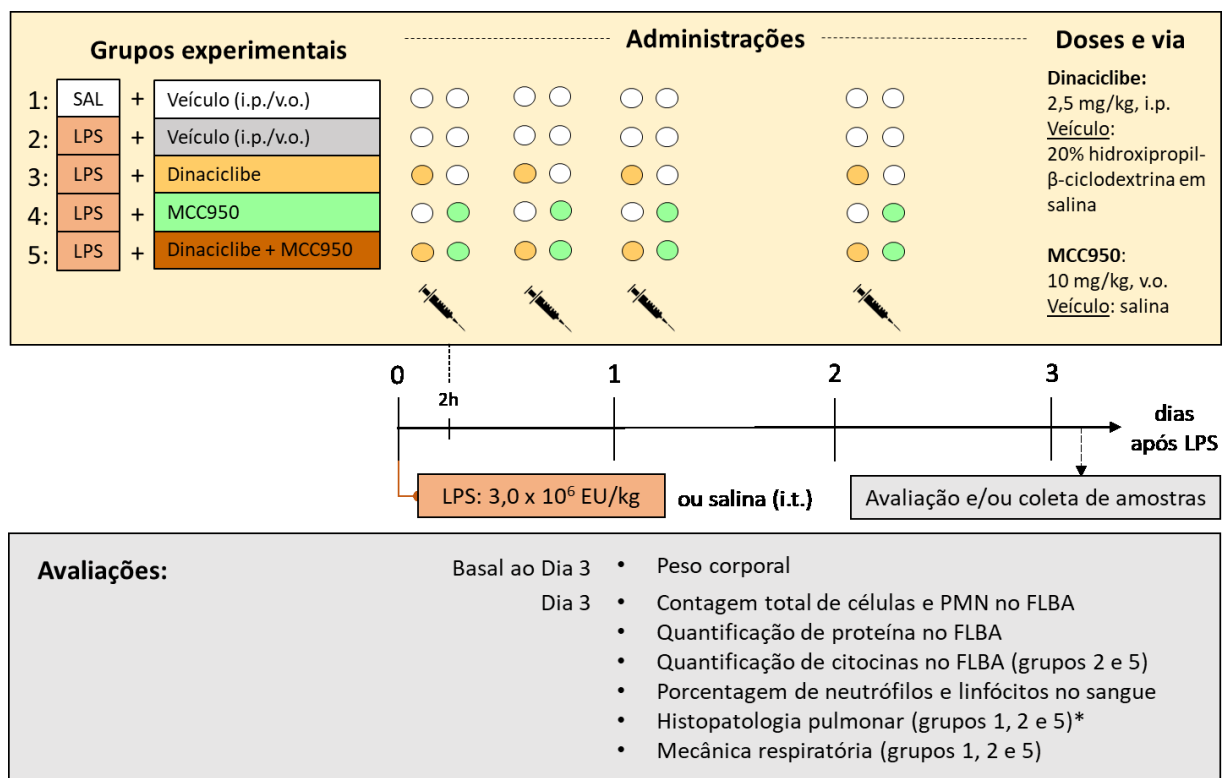


Figura 38. Delineamento do oitavo bloco experimental. Camundongos machos da linhagem CD-1 receberam instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina, seguido de tratamento por três dias com veículo (10 ml/kg, i.p./v.o.), dinaciclibe (2,5 mg/kg, i.p.), MCC950 (10 mg/kg, v.o.) ou cotratamento com dinaciclibe e MCC950. Os animais foram avaliados quanto ao peso corporal e indicadores de função, inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. * = refere-se à análise em andamento. FLBA = fluido de lavado broncoalveolar. PMN = células polimorfonucleares.

3.8.1. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica em camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de peso corporal foi realizada por meio de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse seguido de teste *post hoc* de Tukey, considerando-se as variáveis independentes “tempo” (dias 1, 2 e 3) e “tratamento” (sham, veículo, dinaciclibe, MCC950 ou dinaciclibe + MCC950). Todos os outros parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”.

Na análise de peso corporal, foi encontrado efeito significativo do fator tempo ($F_{(1,545, 69,53)} = 65,24$; $p < 0,0001$), tratamento ($F_{(4, 45)} = 23,40$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(8, 90)} = 8,201$; $p < 0,0001$). Análise subsequente da interação mostrou que, independente de tratamento, os grupos que receberam LPS tiveram redução de peso a partir do primeiro dia e assim mantiveram-se até o fim do protocolo ($p < 0,05$; **Figura 39A**). Divergências de efeito entre os tratamentos aparecem apenas no terceiro dia, onde aqueles que receberam apenas MCC950 ou o cotratamento com dinaciclibe e MCC950 apresentaram menor perda de peso em relação ao grupo “LPS + veículo” ($p = 0,0090$ e $p = 0,0015$, respectivamente). O tratamento com dinaciclibe parece também ter amenizado a perda de peso, mas o efeito é limitado e não alcançou significância estatística ($p = 0,1286$).

Em relação à contagem total de células no FLBA ($F_{(4,45)} = 66,48$; $p < 0,0001$), todos os grupos que receberam LPS apresentaram aumento da infiltração de células no espaço broncoalveolar ($p < 0,0001$; **Figura 39B**). Todavia, este aumento foi reduzido em aproximadamente 68,1%, 51,3% e 69,1% ante a administração de dinaciclibe, MCC950 ou ambos, respectivamente, quando comparado ao veículo ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os tratamentos de interesse. Resultados similares foram observados na porcentagem de PMN ($F_{(4,44)} = 392,0$; $p < 0,0001$; **Figura 39C**), onde as três intervenções utilizadas resultaram em redução semelhante em comparação ao veículo ($p = 0,0016$ para o dinaciclibe; $p < 0,0001$ para MCC950 ou combinação). Na quantificação de proteína ($F_{(4,45)} = 29,98$; $p < 0,0001$; **Figura 39D**), todos os grupos que receberam LPS apresentaram prejuízo em relação aos controles saudáveis ($p < 0,0001$). Contudo, em camundongos sob cotratamento com dinaciclibe e MCC950, houve uma redução estatisticamente significativa da presença de proteína no espaço broncoalveolar ($p = 0,0002$). Aqueles que receberam somente dinaciclibe ou MCC950 também tiveram uma redução notável, porém sem atingir significância estatística ($p = 0,1377$ e $p = 0,0624$, respectivamente).

Na análise hematológica (**Figura 39E**), a instilação intratraqueal de LPS foi associada a alterações opostas na porcentagem de neutrófilos ($F_{(4,45)} = 19,91$; $p < 0,0001$) e linfócitos ($F_{(4,45)} = 29,30$; $p < 0,0001$) em todos os grupos quando comparada ao grupo “sham”. Porém, novamente, ambas as alterações induzidas pelo LPS são amenizadas pelo tratamento combinado com dinaciclibe e MCC950 ($p = 0,0138$ e $p = 0,0009$, respectivamente). As monoterapias, por sua vez, tiveram um efeito

intermediário que se situa abaixo do limiar de significância estatística, assim como observado em outros parâmetros deste experimento e em parte dos experimentos com os outros fármacos investigados.

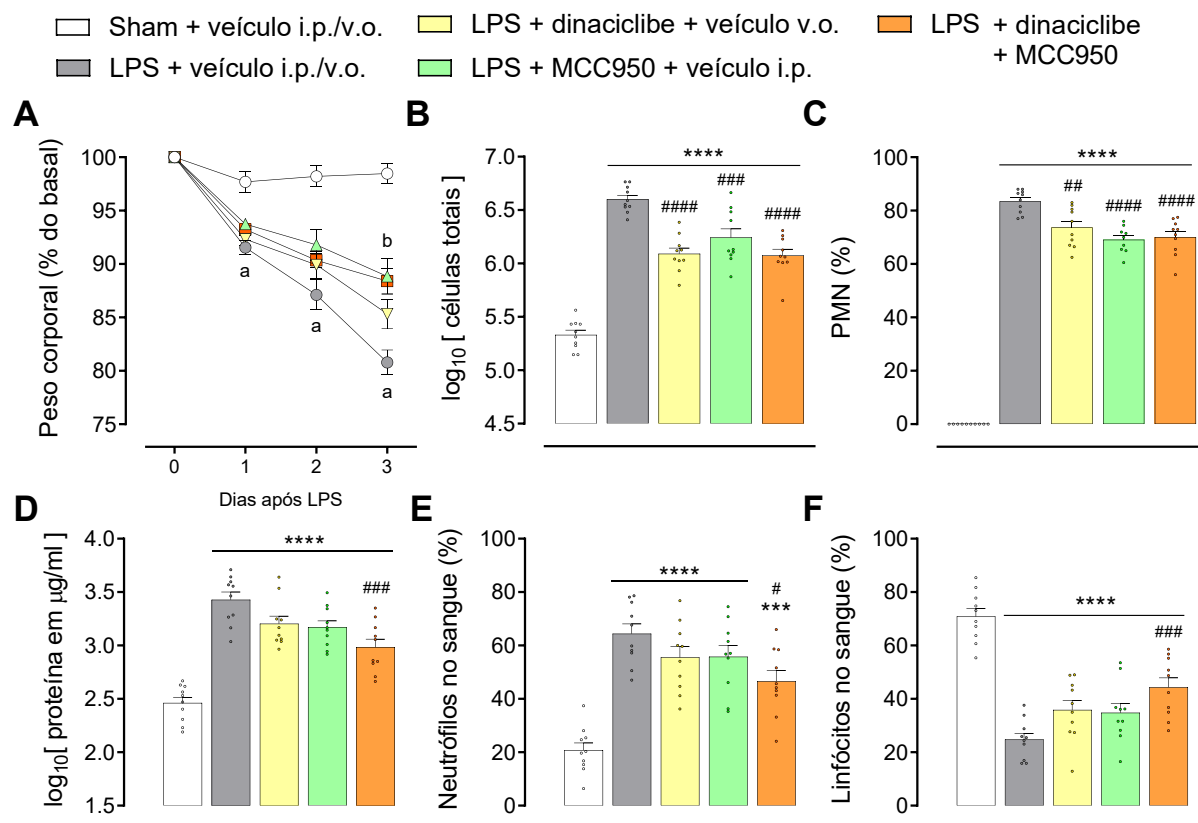


Figura 39. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre o peso corporal, indicadores de inflamação e lesão pulmonar, e alteração hematológica. Dinaciclibe (2,5 mg/kg, i.p.), MCC950 (10 mg/kg, v.o.) e/ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Peso corporal, onde $p < 0,05$ em ^a = todos vs. sham, ^b = MCC950 ou dinaciclibe + MCC950 vs. veículo. (B) Contagem total de células e (C) porcentagem de PMN no FLBA. (D) Quantificação de proteína no FLBA. (E) Porcentagem de neutrófilos e (F) linfócitos no sangue. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e correção de Geisser-Greenhouse (A) ou ANOVA de uma via (B-F) seguido de teste *post hoc* de Tukey. $n = 10/\text{grupo}$, exceto para a porcentagem de PMN (C) onde $n_{\text{MCC950}} = 9$. Dados representados como média + E.P.M.

3.8.2. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a mecânica respiratória de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de mecânica respiratória foi realizada de duas maneiras, considerando-se apenas a variável independente “tratamento”. Para dados paramétricos, foi realizada uma ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey quando aplicável. No caso de dados não-paramétricos, foi realizado o teste de

Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Nesta análises, foi encontrada diferença estatística entre pelo menos dois grupos em quase todos os parâmetros avaliados (**Figura 40**), incluindo-se resistência sistêmica ($F_{(4,45)} = 8,207$; $p < 0,0001$), elastância sistêmica ($H_{(4)} = 16,82$; $p = 0.0021$), amortecimento tecidual ($H_{(4)} = 20,18$; $p = 0.0005$), elastância tecidual ($H_{(4)} = 14,28$; $p = 0.0065$), capacidade inspiratória ($F_{(4,45)} = 3,668$; $p = 0,0114$), histerese ($F_{(4,45)} = 2,729$; $p = 0,0407$), parâmetro K ($F_{(4,45)} = 5,583$; $p = 0,0010$) e complacência quase-estática ($F_{(4,45)} = 5,621$; $p = 0,0009$). No único parâmetro restante, resistência Newtoniana ($F_{(4,45)} = 2,202$; $p = 0,0839$), não houve diferença estatisticamente significativa, embora haja tendência assim como em experimentos anteriores.

Na resistência sistêmica e no amortecimento tecidual, animais que receberam LPS e solução veículo ou dinaciclibe tiveram prejuízo significativo em relação aos controles saudáveis ($p < 0,05$). Em contrapartida, aqueles que receberam LPS e depois MCC950 parecem ter tido um benefício intermediário, pois tendem à redução dos valores e não há diferença estatística para qualquer um dos grupos. Já os animais tratados com a combinação de dinaciclibe e MCC950 apresentaram alteração significativamente menor nesses parâmetros do que animais tratados apenas com veículo, evidenciando um benefício do cotratamento (**Figura 40A e 40D**). A elastância sistêmica (**Figura 40B**) e tecidual (**Figura 40E**), em relativo acordo, mostram prejuízo significativo no grupo “LPS + veículo”, e uma tendência de redução no que recebeu o cotratamento ($p = 0,0663$ e $p = 0,0872$, respectivamente).

Apesar do efeito geral na ANOVA, a análise *post hoc* para a capacidade inspiratória mostra apenas efeitos marginais entre os grupos. Isso sugere que a alteração deste parâmetro foi menor para este experimento, embora as tendências usuais sejam observadas no sentido de menor capacidade inspiratória no grupo “LPS + veículo” e de mitigação do prejuízo sob o cotratamento (**Figura 40F**). No parâmetro K, uma variável independente de volume, foi observado um prejuízo significativo em animais que receberam veículo ou apenas MCC950 em relação aos controles saudáveis ($p = 0,0007$ e $p = 0,0255$, respectivamente). Em contraste, os tratados simultaneamente com dinaciclibe e MCC950 não se diferenciam do grupo “sham” e mostram menor alteração em relação ao veículo ($p = 0,0416$; **Figura 40G**). Dados para a histerese mostram uma redução apenas para os animais que receberam MCC950 ($p = 0,0293$), provavelmente em consequência da maior variabilidade e da

menor amplitude da diferença entre animais saudáveis e que receberam LPS (**Figura 40H**). Na complacência quase-estática, por fim, foi observada redução significativa em todos os grupos em relação ao controle ($p < 0,05$), exceto para o que recebeu o cotratamento. Ainda, uma diferença estatística direta entre o cotratamento e a administração de solução-veículo, dinaciclibe ou MCC950 sozinhos também foi observada ($p = 0,0174$, $p = 0,0290$ e $p = 0,0262$, respectivamente), evidenciando uma superioridade da terapia combinada (**Figura 40I**). Esta superioridade é replicada na curva pressão-volume, a qual mostra forte sobreposição das curvas referentes aos camundongos saudáveis e aos tratados com a combinação de fármacos. Em oposição, as curvas para as monoterapias ou veículo estão deslocadas para baixo, de maneira uniforme e em conformidade com o padrão restritivo do LPS observado nos outros experimentos (**Figura 40J**).

□ Sham + veículo i.p./v.o. □ LPS + dinaciclibe + veículo v.o. □ LPS + dinaciclibe + MCC950
 ■ LPS + veículo i.p./v.o. ■ LPS + MCC950 + veículo i.p.

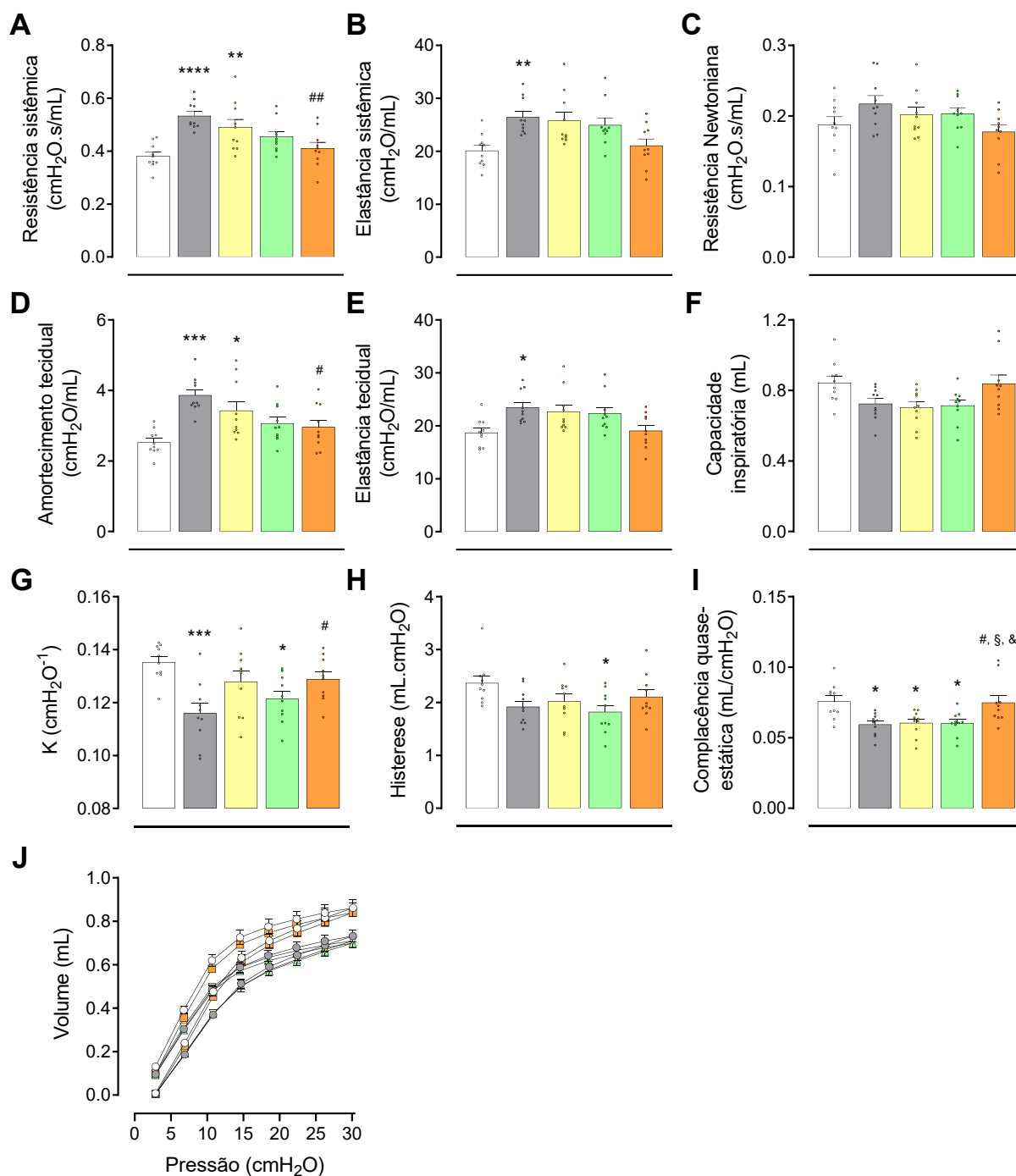


Figura 40. Efeitos da monoterapia e cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a mecânica respiratória. Dinaciclibe (2,5 mg/kg, i.p.), MCC950 (10 mg/kg, v.o.) e/ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) ou solução salina. (A) Resistência sistêmica, (B) elastância sistêmica, (C) resistência Newtoniana, (D) amortecimento tecidual, (E) elastância tecidual, (F) capacidade inspiratória, (G) parâmetro K, (H) histerese, (I) complacência quase-estática, (J) curva pressão-volume. ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (A, C e F-I) ou teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn (B, D e E). $n = 10$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo. § $p < 0,05$, comparado ao grupo dinaciclibe. & $p < 0,05$ comparado ao grupo MCC950. Dados representados como média + E.P.M.

3.8.3. Efeitos do cotratamento com dinaciclibe e MCC950 sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar de camundongos submetidos à instilação intratraqueal de LPS

A análise estatística dos dados de liberação de citocinas no espaço broncoalveolar foi realizada por meio de teste t não-pareado comparando-se os grupos “LPS + veículo” e “LPS + dinaciclibe e MCC950”. Dados de IL-6, IL-12_{p70} e IFN- γ foram transformados em log2 na análise estatística a fim de garantir a distribuição Gaussiana. Além disso, o método de Grubbs (alfa = 0,001) foi utilizado para remover um *outlier* do grupo “LPS + dinaciclibe e MCC950” nas quantificações de IL-6 e MCP-1. Os resultados foram expressos com e sem o *outlier*.

Nesta análise, foi encontrada diferença estatisticamente significativa na liberação de IL-6 com ($t_{(18)} = 2,448$; $p = 0,0248$; **Figura 41A** – painel esquerdo) e sem o *outlier* ($t_{(17)} = 3,465$; $p = 0,0030$; **Figura 41A** – painel direito), além de IFN- γ ($t_{(18)} = 4,052$; $p = 0,0007$; **Figura 41D**) e TNF ($t_{(18)} = 5,679$; $p < 0,0001$; **Figura 41F**). Os resultados também mostram uma tendência limítrofe de redução de IL-10 em animais que receberam a terapia combinada ($p = 0,06$; **Figura 41B**), e uma redução significativa de MCP-1 foi encontrada após remoção do *outlier* ($t_{(17)} = 4,929$; $p = 0,0001$; **Figura 41E**). No geral, os resultados deste experimento aproximam-se do observado anteriormente para as outras combinações de fármacos. Nesta ordem, a presença de IFN- γ , IL-6, TNF e MCP-1 continuou predominante no FLBA em resposta ao LPS, e foi fortemente suprimida pelo tratamento com dinaciclibe e MCC950.

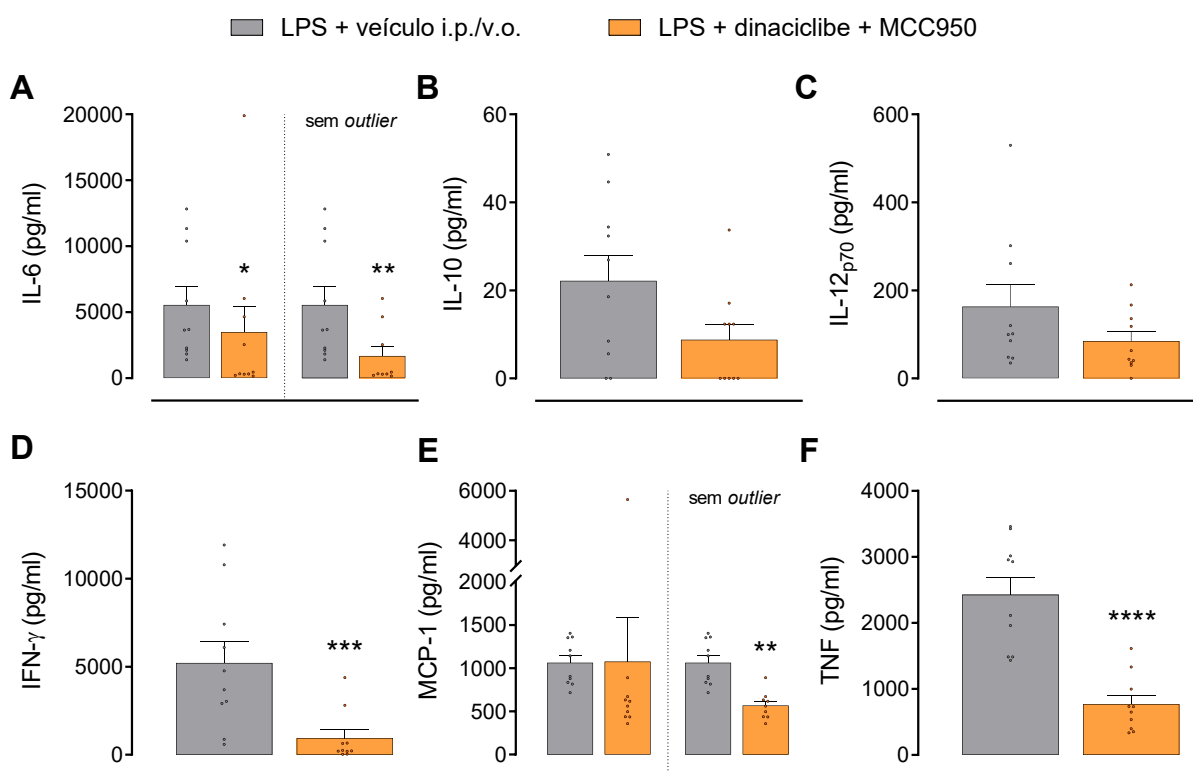


Figura 41. Efeitos do cotratamento com dinacilibe e MCC950 sobre a liberação de citocinas no espaço broncoalveolar. Dinacilibe (2,5 mg/kg, i.p.), MCC950 (10 mg/kg, v.o.) ou solução veículo (10 ml/kg i.p./v.o.) foram administrados a camundongos CD-1 machos por três dias a partir de duas horas após a instilação intratraqueal de LPS ($3,0 \times 10^6$ EU/kg). Quantificação de (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IL-12_{p70}, (D) IFN- γ , (E) MCP-1 e (F) TNF por CBA. Teste *t* não-pareado. Dados de IL-6, IL-12 e IFN- γ foram transformados em log2 para análise estatística. Os resultados de IL-6 e MCP-1 estão apresentados com e sem a remoção de um mesmo *outlier* (método de Grubbs). $n = 10$ /grupo, exceto na análise estatística de IL-12 onde $n_{din+mcc} = 9$ após transformação em log2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo veículo. Dados representados como média + E.P.M.

4. DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE LPA PARA O ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS ANTI-CITOCINA

Modelos experimentais de LPA constituem uma importante ferramenta para o estudo da SDRA e, ao longo dos anos, fundamentaram avanços críticos no manejo clínico de pacientes. Exemplos dessas contribuições incluem o advento das práticas de ventilação protetiva e a adoção da posição prona durante a ventilação mecânica (Kulkarni et al., 2022). Contudo, nenhum deles é capaz de representar toda a complexidade da síndrome, além do fato de que modelos diferentes ou variações em um mesmo modelo podem resultar em grande diversidade do que é uniformemente denominado “LPA” (Matute-Bello et al., 2008; 2011). Por isso, a LPA é hoje entendida como um *continuum* de alterações, e não uma definição categórica (Kulkarni et al., 2022). Assim, para a avaliação da eficácia terapêutica de fármacos, a ATS sugere que sejam demonstrados no mínimo os quatro domínios da LPA experimental: presença de resposta inflamatória, alteração da barreira alvéolo-capilar, evidência histológica de lesão pulmonar, e disfunção fisiológica. Além disso, a partir da análise de consenso entre especialistas, foram feitas recomendações sobre quais métodos ou indicadores são mais importantes na avaliação de cada um desses domínios (Kulkarni et al., 2022).

Com base nas recomendações da ATS, a primeira parte deste estudo teve como objetivo a caracterização e padronização *in loco* do modelo experimental de LPA induzido por instilação intratraqueal de LPS. Para isso, foram executadas avaliações tempo-resposta, dose-resposta e de dimorfismo sexual em camundongos da linhagem CD-1, considerando-se os parâmetros relevantes à modelagem experimental da LPA/SDRA (Matute-Bello et al., 2011; Kulkarni et al., 2022). Em conjunto, essas informações proveem a estrutura teórica e prática a partir da qual foram testados os fármacos na segunda parte deste estudo, e delimitam o escopo e a abrangência da interpretação dos resultados em uma perspectiva translacional.

Neste trabalho, efeitos em 6 horas após a instilação intratraqueal de LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) se caracterizam pelo aumento concomitante e acentuado de múltiplas

citocinas, além de um aumento modesto da concentração de proteína no FLBA. A histopatologia, um método menos sensível a essas alterações (Matute-Bello et al., 2011), não revelou comprometimento tecidual em 6 horas, reafirmando juntamente à contagem de células que perturbações da homeostase pulmonar neste momento estão ainda na fase mais inicial do *continuum* da LPA. Por outro lado, a presença elevada de IL-1 β , IL-6, IL-12, MCP-1 (CCL2) e TNF reflete um ambiente alveolar altamente pró-inflamatório e evidencia alguns dos principais marcadores de inflamação pulmonar, em concordância com trabalhos anteriores da LPA em camundongos e em pacientes com SDRA (Bauer et al., 2000; Goldman et al., 2014; Goodman et al., 1996; Grailer et al., 2014; Matute-Bello et al., 2000; Meduri et al., 1995a,b; Park et al., 2001; Sarma et al., 2023; Stapleton et al., 2019; Wang J et al., 2021). Desse modo, sugere-se que o tempo de 6 horas após o insulto com LPS se aproxima de um estado subclínico da LPA/SDRA, no qual há sinais leves de dano e alta competência inflamatória para desenvolver complicações, embora sem preencher ainda os critérios diagnósticos.

Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, por sua vez, observa-se um aumento progressivo e acentuado em todos os demais parâmetros. O efeito é particularmente notável ao fim do protocolo, em 72 horas, quando se observa grande acúmulo de células e de fluido rico em proteína nos alvéolos e um grave comprometimento do parênquima pulmonar, além de perda de peso média superior a 20%. A julgar pelos perfis das curva tempo-resposta nos diferentes parâmetros avaliados, não há sinais de recuperação no terceiro dia. A única exceção é a porcentagem de linfócitos circulantes, a qual tem em machos uma reversão parcial da redução em 72 horas, indicando uma compensação ou o início de um retorno à homeostase. Entretanto, o perfil de recuperação ou sobrevivência não foi investigado neste estudo. Para fins de referência, trabalhos com protocolos relativamente semelhantes em camundongos C57BL/6J (mais resistentes; Alm et al., 2010a; 2010b) mostraram perda de peso máxima entre o segundo e o quarto dia após o LPS, seguido de recuperação parcial até 7 ou 10 dias (Mock et al., 2020; Verjans et al., 2018). De todo modo, consideradas as observações em 72 horas, sugere-se que este tempo representa a fase mais tardia e grave da LPA, sendo alusivo à condição observada em pacientes com a SDRA estabelecida.

Se comparados os resultados de machos e fêmeas, a forma como a resposta ao LPS evoluiu ao longo do tempo foi bastante similar, mas há algumas particularidades. Mesmo que a comparação seja indireta e, portanto, inconclusiva, fêmeas apresentaram ausência de efeito tempo-resposta (24-72 horas) e menor magnitude de alteração do influxo de células e da porcentagem de linfócitos circulantes. Junto à tendência de maior presença de algumas citocinas no FLBA de machos (IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1), estes podem ser indicativos do dimorfismo sexual na resposta ao LPS já descrito na literatura (Card et al., 2006; Carey et al., 2007; Meneses et al., 2018). A confirmação das diferenças, todavia, requer mais experimentos, além da comparação direta em um número maior de parâmetros.

De maneira independente do sexo, a redução clara e sustentada da porcentagem de linfócitos circulantes em resposta ao LPS é um aspecto importante a ser considerado. Com essa alteração, evidencia-se que as consequências da lesão pulmonar não ficaram restritas ao sistema respiratório, o que é característico da SDRA em humanos (Ketcham et al., 2020) e só raramente demonstrado nos modelos experimentais. Por exemplo, redução no número/frequência de linfócitos circulantes foi observada em modelo de infecção por SARS-CoV-2 (Winkler et al., 2020) ou choque induzido por TNF e IFN- γ (Karki et al., 2021). Quanto à administração intratraqueal de LPS, especificamente, Gotts et al. (2017) descrevem tanto um efeito dose-resposta sobre o número de leucócitos no sangue quanto uma correlação inversa entre o número de leucócitos e o edema pulmonar. Na clínica, por sua vez, a linfopenia é um preditor de prognóstico na COVID-19 (Tan et al., 2020), e maior razão neutrófilo-linfócito foi associada com pior desfecho na COVID-19 (Liu et al., 2020) e na SDRA (Zhang et al., 2021). Quanto ao mecanismo, atribui-se a supressão de linfócitos à morte celular induzida por citocinas pró-inflamatórias, aos efeitos da inflamação sobre a hematopoiese, e à migração de células aos sítios de inflamação (Fagjenbaum & June, 2020; Karki & Kanneganti, 2021). Por essas razões, entende-se que a utilização deste parâmetro é uma importante adição ao protocolo da LPA experimental, servindo como um indicador celular de inflamação sistêmica que é também utilizado e validado na clínica.

Para além da inflamação e dano, a presença de disfunção respiratória – a característica mais importante na condição humana – é analisada com muito menos frequência em modelos animais. Isso acontece, provavelmente, em razão da falta de

acesso a equipamento especializado e da complexidade geral desse tipo de experimento (Ahookhosh et al., 2023; Bates, 2017; Biselli et al., 2019). Porém, ainda que a inflamação leve ao comprometimento do tecido pulmonar e, presumivelmente, da função dos pulmões, esta não é sempre uma relação direta (Anciães et al., 2011; Biselli et al., 2019) e, portanto, deve ser demonstrada. Atualmente, o “padrão-ouro” na avaliação da mecânica respiratória em roedores é a utilização da técnica de oscilação forçada e da medição da relação pressão-volume (Ahookhosh et al., 2023), métodos empregados neste trabalho através do dispositivo flexiVent®. Estudos prévios já avaliaram a função pulmonar basal no modelo de LPA induzida por LPS, mas diferem consideravelmente do presente trabalho em relação a dois ou mais fatores (Bittencourt-Menark et al., 2017; Devos et al., 2017, Kastis et al., 2013; Khadangi et al., 2021; Verjans et al., 2013; 2018). São exemplos a linhagem dos camundongos, a dose e a via de administração de LPS, o tempo da avaliação após o insulto, os parâmetros considerados, e o grau de lesão obtido. Além disso, não há nesses trabalhos a inclusão da comparação entre sexos ou uma avaliação dose-resposta detalhada

Aqui, a análise da mecânica respiratória em animais que receberam LPS revelou alterações em todos os parâmetros avaliados (nas doses de 7,5 e 1,5 x 10⁶ EU/kg), o que é indicativo de disfunção respiratória ampla e grave. De particular importância, o particionamento da análise em vias aéreas condutoras (traqueia, brônquios e bronquíolos) e em tecido pulmonar mostrou que os prejuízos induzidos pelo LPS não são distribuídos igualmente na mecânica respiratória. Na verdade, ainda que tenha sido observado aumento do amortecimento tecidual (um parâmetro ligado à resistência tecidual), da elastância tecidual (um índice de rigidez alveolar) e da resistência Newtoniana (a qual reflete especificamente a resistência das vias aéreas condutoras; Hartney & Robichaud, 2013), o efeito do LPS sobre a resistência Newtoniana é bem menos evidente. Dessa forma, um aumento neste parâmetro apareceu diversas vezes nos experimentos deste trabalho, mas nem sempre atingiu significância estatística. Por isso, entende-se que o prejuízo respiratório no modelo padronizado, tal como foi observado em modelos de fibrose induzida por bleomicina (Devos et al., 2017; Headley et al., 2018; Vanoirbeek et al., 2010) e de infecção por SARS-CoV-2 (Winkler et al., 2020), está primariamente associado à disfunção do parênquima pulmonar e somente em menor extensão às vias aéreas condutoras.

Entre os outros parâmetros analisados, a instilação de LPS também promoveu forte redução da complacência quase-estática (avaliada na ausência de fluxo de ar e, portanto, sem a contribuição das vias condutoras), redução da capacidade inspiratória, redução do parâmetro K e da histerese, e deslocamento para baixo da curva pressão-volume. Em conjunto, essas alterações apontam menor distensibilidade dos pulmões e estão em conformidade com a mecânica respiratória na SDRA, que se caracteriza por redução do volume pulmonar acessível, menor complacência pulmonar, deslocamento para baixo da curva pressão-volume e presença de heterogeneidade da ventilação (Harris, 2005; Henderson et al., 2017; Reddy et al., 2022; Russoto et al., 2018). É válido também destacar que os resultados aqui demonstrados sugerem uma disfunção pulmonar mais grave e mais abrangente do que a “média” da literatura para o modelo em questão (Bittencourt-Menark et al., 2017; Devos et al., 2017, Kastis et al., 2013; Khadangi et al., 2021; Verjans et al., 2013; 2018). Isso se deve, possivelmente, a uma combinação de fatores, incluindo-se o maior detalhamento da avaliação, as doses de LPS, uma maior latência para realização do ensaio (72 horas), o uso de animais SPF, e a maior susceptibilidade de camundongos CD-1 (Alm et al., 2010a; 2010b).

Notadamente, algumas das alterações de função pulmonar em resposta ao LPS ($7,5 \times 10^6$ EU/kg) foram mais proeminentes em fêmeas, de maneira inversa ao sugerido por alguns parâmetros de inflamação local e sistêmica neste trabalho ou na literatura (Card et al., 2006; Carey et al., 2007, Meneses et al., 2018). Não há, contudo, comparação prévia entre os sexos quanto à mecânica respiratória basal no modelo em questão. Para outros modelos experimentais, um maior prejuízo à função pulmonar em fêmeas foi demonstrado na infecção por IAV/H3N1 (Larcombe et al., 2011) e sob exposição crônica à fumaça (Tam et al., 2016). No mesmo sentido, estudos em humanos mostraram que mulheres têm maior chance de desenvolver SDRA após trauma (Heffernan et al., 2011), além de maior risco de mortalidade na SDRA grave (McNicholas et al., 2019). Logo, o maior prejuízo funcional em fêmeas observado aqui está em relativo acordo com a literatura, ainda que permaneça incerto o componente biológico subjacente. A esse respeito, são necessários mais estudos sobre o dimorfismo sexual na LPA. Para fins deste trabalho, e em vista das diferenças observadas, optou-se por utilizar um único sexo nos experimentos subsequentes. Em particular, machos foram escolhidos por ter sido demonstrado neste sexo maior

clareza de progressão contínua da lesão na avaliação tempo-resposta e maior grau de alteração em leucócitos circulantes.

Quando consideradas as diferentes doses de LPS em camundongos machos, a magnitude das alterações diminuiu à medida que a dose do LPS foi reduzida, evidenciando um efeito dose-resposta. Nesse contexto, as duas doses mais altas ($7,5$ e $1,5 \times 10^6$ EU/kg) testadas resultaram em alteração significativa em todos os 16 parâmetros avaliados, incluindo-se os indicadores locais de inflamação e lesão tecidual, a porcentagem de linfócitos circulantes, e todas as métricas de mecânica respiratória. Contudo, mesmo com a dose mais baixa de LPS, ainda houve alteração significativa na maioria dos parâmetros se comparado aos controles saudáveis. Assim, apesar da diferença de 25 vezes entre a dose mais baixa e a mais alta, os respectivos efeitos biológicos – embora diferentes – não refletiram tal amplitude. Portanto, os resultados sugerem que a relação dose-resposta na LPA induzida por LPS não é linear, e que mesmo doses baixas de LPS são suficientes para causar alterações pulmonares quantificáveis. Da mesma forma, as duas doses mais altas avaliadas não resultaram em diferenças expressivas entre si, e alguns parâmetros parecem atingir uma “saturação”, como por exemplo o influxo de células e a perda de peso corporal. Em parcial acordo, um estudo anterior mostrou que dobrar a dose do LPS (i.t.) de $50 \mu\text{g}$ para $100 \mu\text{g}$ por animal não causou maior aumento da permeabilidade pulmonar (Rittirsch et al., 2008).

Em paralelo, alterações extrapulmonares não foram detectadas após administração da dose mais baixa de LPS. Isto é evidenciado pela ausência de diferença em relação ao controle saudável na análise hematológica e apoiado pela forte recuperação de peso no terceiro dia de experimento. Por fim, observou-se que as duas doses mais baixas de LPS não foram suficientes para causar alteração mensurável na histopatologia, deixando inalterado um dos domínios da LPA recomendados para o teste da eficácia de fármacos (Kulkarni et al., 2022). Por conseguinte, com base no perfil dose-resposta em camundongos machos, concluiu-se que uma dose intermediária ($3,0 \times 10^6$ EU/kg) entre as duas mais altas avaliadas seria adequada à continuidade do trabalho.

Nesse contexto, posto que a hipótese do estudo gira em torno da combinação de drogas anti-citocina, deve-se também dar atenção para o perfil de citocinas encontrado no modelo. Como já apontado, a fase inicial da LPA (6 horas) foi marcada

por liberação local de múltiplas citocinas, incluindo-se IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1 (CCL2) e TNF. Em sua maioria, essas citocinas têm influência conhecida sobre a LPA e são consideradas potenciais alvos terapêuticos (Bhatia et al., 2018; Fadanni & Calixto, 2023; Zhu et al., 2022). Contudo, aquelas para as quais não foi detectado aumento na análise inicial não são, necessariamente, irrelevantes à lesão. Na verdade, IFN- γ e IL-17 por exemplo, são sabidamente importantes na LPA experimental e na SDRA (Fadanni & Calixto, 2023). Nesta condição, deve-se considerar que, inicialmente, apenas foi analisado um único tipo de amostra (FLBA) em um único tempo (6 horas), sendo que as citocinas costumam divergir em sua cinética temporal e em relação à distribuição tecidual.

A título de exemplo, a concentração de IFN- γ na SDRA é maior no plasma do que nos pulmões (Heijnen et al., 2021), e a presença no FLBA de camundongos só foi detectada mais tardiamente ao estímulo com LPS (Bricher Choque et al., 2021; Ingenito et al., 2001). Neste sentido, análises subsequentes neste trabalho mostraram aumento da expressão pulmonar de *ifng* em 24 horas, além de presença expressiva de IFN- γ no FLBA em 72 horas e efeitos benéficos (ainda que limitados) do anticorpo neutralizante. Assim, diferentemente de outras citocinas como IL-6, TNF e MCP-1, o IFN- γ tem presença crescente ao longo do tempo, sugerindo maior impacto na sustentação da LPA do que na sua iniciação (Mock et al. 2020). Ao mesmo tempo, a presença de IL-12 e altas concentrações de IL-6 e IFN- γ nos alvéolos evidenciam forte engajamento da via JAK-STAT, o que é condizente com a eficácia observada para o inibidor de JAKs 1 e 2 baricitinibe (discutido posteriormente).

Ainda quanto ao modelo, é digno de atenção que a média da expressão pulmonar relativa de todos os genes analisados está aumentada entre 4 e 64 vezes no grupo “LPS” (log2 entre 2 e 6), indicando um aumento intenso da atividade transcricional. No mais, além dos já mencionados IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10, outros elementos cuja expressão gênica foi induzida incluem a proteína NLRP3, a qual é o PRR central ao inflamassoma de mesmo nome, a molécula de adesão ICAM1, cuja expressão é essencial para a migração de neutrófilos às vias aéreas (Chong et al., 2019), e a enzima iNOS (gene *nos2*), que produz óxido nítrico (NO) e cuja superexpressão está associada ao agravamento da LPA (Golden et al., 2022; Gross et al., 2015; Peng et al., 2005; Wang et al., 2012). Conjuntamente à análise de citocinas, esses resultados reforçam a noção de um envolvimento intenso e amplo de

múltiplas vias de inflamação no modelo de LPA padronizado, de maneira compatível com o observado na clínica (Fadanni & Calixto, 2023; Sarma et al., 2023) e análises prévias em camundongos (Altemeier et al., 2005; Güngör et al., 2010; Jeyaseelan et al., 2004).

4.2. EFICÁCIA DAS COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS ANTI-CITOCINA NA LPA INDUZIDA POR LPS E A FARMACOLOGIA TRANSLACIONAL

A inflamação excessiva é uma das principais características da SDRA, fazendo com que diversas citocinas, receptores e demais proteínas das vias de sinalização se tornem potenciais alvos terapêuticos. Entretanto, ao decorrer de décadas de pesquisa, fármacos promissores acabaram se acumulando em uma longa lista de insucessos clínicos (Meyer et al., 2022). Isso contribuiu a um relativo esvaecimento dos estudos clínicos com anti-inflamatórios na SDRA, mas também motivou o refinamento das abordagens de pesquisa.

Um desses refinamentos é a subdivisão de pacientes com base em biomarcadores, o que resultou, por exemplo, no advento dos subfenótipos hipo e hiperinflamatório e em novas interpretações acerca de fármacos antes considerados ineficazes (Calfee et al., 2014; 2018). Com a pandemia de COVID-19, outro refinamento também ganhou notoriedade, este voltado à intervenção farmacológica em si e não ao paciente. Trata-se da intervenção anti-citocina multialvo, fundamentada no estudo de combinações de fármacos em busca de efeito aditivo ou sinérgico (Fadanni & Calixto, 2023). Conforme essa abordagem evolui, cresce também a perspectiva de que a terapia combinada seja acoplada ao primeiro refinamento, a prescrição baseada em biomarcadores. Assim, na prática, a depender do conjunto de biomarcadores alterados em um dado paciente, este poderia receber uma combinação de drogas que melhor se adequa ao quadro clínico específico. Essa co-evolução da terapia multialvo e da medicina personalizada representa, atualmente, o principal foco da farmacologia translacional na LPA/SDRA (Fadanni & Calixto, 2023).

O estado-da-arte desse conceito foi extensivamente descrito no início deste estudo durante a revisão de literatura e posteriormente publicado em periódico científico (Fadanni & Calixto, 2023). Em resumo, a aplicabilidade é promissora, mas ainda incerta ante um crivo mais rigoroso da medicina baseada em evidência. Isso

parece ser fortemente influenciado pelo caráter recente das investigações, o que levou ao foco em COVID-19 e a um conhecimento limitado de quais combinações de drogas ou de biomarcadores têm de fato utilidade terapêutica (Fadanni & Calixto, 2023). Contudo, especificamente para a COVID-19, diversas evidências de alta qualidade fundamentam o avanço nas investigações. Como já apontado, estudos do baricitinibe e do tocilizumabe mostraram redução na mortalidade quando há combinação com corticosteroides, mas ausência de efeito ou possivelmente um malefício quando usados isoladamente (RECOVERY Collaborative Group, 2021; 2022). Em paralelo, o uso de anakinra guiado por níveis plasmáticos de suPAR foi aprovado em caráter definitivo ou emergencial por agências regulatórias (EMA, 2021; FDA, 2022), e a alta prevalência de uso de corticosteroides tanto no grupo placebo quanto experimental (85,9%) sugerem um efeito aditivo na terapia combinada. Outra combinação bem-sucedida de drogas foi aprovada para a HLH, na qual o anticorpo neutralizante de IFN- γ emapalumabe é adicionado ao tratamento com dexametasona em pacientes com refratariedade, recorrência ou progressão da doença, ou intolerância ao tratamento convencional (Al-Salama, 2019). Por ora, as principais limitações do avanço residem na incerteza da generalização dos achados (para além da COVID-19) e na pouca evidência de quais combinações são mais promissoras, parte que é diretamente dependente de estudos não-clínicos (Fadanni & Calixto, 2023).

Neste contexto, e fundamentado na estratégia de triagem fenotípica *in vivo*, a segunda parte deste estudo utilizou-se do modelo murino de LPA induzido por LPS para investigar seis fármacos anti-citocina cujos alvos são relevantes à hiperinflamação e SDRA. Estas foram divididas em três combinações (duas a duas) com base em um racional teórico, e comparadas de maneira sistemática com as respectivas monoterapias quanto à eficácia terapêutica na LPA. De maneira geral, os resultados demonstraram que a terapia combinada é mais eficaz do que a monoterapia no controle da inflamação, da lesão e da disfunção pulmonar induzidas por LPS, o que corrobora a hipótese central do trabalho. No mais, os resultados demonstram a importância da continuidade das investigações clínicas e não-clínicas, além de sugerir alguns direcionamentos em relação aos alvos e fármacos específicos.

Inicialmente, em uma prova de conceito, buscou-se investigar a eficácia da combinação de dexametasona e baricitinibe, cujos efeitos envolvem a ampla supressão da resposta pró-inflamatória através da inibição do fator de transcrição NF-

κB e das tirosinas quinase JAK1 e JAK2, respectivamente. Como já citado, a dexametasona é um corticosteroide de interesse histórico na LPA/SDRA e considerado eficaz no tratamento da COVID-19 (Chang et al., 2022; Feng et al., 2022; Landolf et al., 2022), mas com efeitos controversos que levam continuamente à reavaliação (Landolf et al., 2022; Matthay & Wick, 2020). O baricitinibe, por sua vez, é um fármaco mais recente cuja eficácia foi demonstrada no tratamento da COVID-19 em combinação com o corticosteroide (RECOVERY Collaborative Group, 2022). Porém, não há estudo pré-clínico anterior que utilize ambas as drogas em modelos de LPA, hiperinflamação ou similares. Além disso, dados para o baricitinibe mesmo em monoterapia também não incluem modelos de LPA.

Diante da escassez de estudos prévios, o início dos testes foi precedido por um ensaio simplificado de farmacocinética. Neste ensaio, demonstrou-se que a coadministração única de dexametasona (10 mg/kg, i.p.) e baricitinibe (10 mg/kg, v.o.) resultou em presença relevante destes fármacos nos pulmões, de forma a confirmar a atuação sobre o tecido-alvo. Além disso, ficou demonstrado que a dexametasona atingiu concentração plasmática e pulmonar muito maior do que o baricitinibe, o que pode ser atribuído a diferenças na via de administração e nas propriedades físico-químicas das moléculas. De maneira interessante, sabe-se que a dexametasona é capaz de induzir de maneira dependente da dose a enzima CYP3A4 (Jacobs et al., 2022), a qual participa da biotransformação do baricitinibe (Jorgensen et al., 2020). Porém, somente uma pequena fração do baricitinibe é metabolizada (FDA, 2017), e o impacto clínico da dexametasona sobre substratos da CYP3A4 permanece incerto (Jacobs et al., 2022). Logo, ainda que não seja possível descartar uma interação farmacocinética, é provável que esta não ocorra de maneira relevante entre esses fármacos.

Na prova de conceito, tanto a combinação de dexametasona e baricitinibe quanto as respectivas monoterapias resultaram em algum nível de proteção ao longo dos diferentes parâmetros da LPA. De maneira importante, o baricitinibe foi superior à dexametasona, e demonstrou ter maior contribuição à eficácia da associação do que o corticosteroide (discutido posteriormente). Ainda assim, a terapia combinada mostrou maior magnitude de efeito em diversos parâmetros, com destaque a diferenças importantes para as monoterapias na menor congestão do tecido pulmonar (histopatologia) e na proteção contra alterações de mecânica respiratória. Nestes

casos, animais tratados com ambos os fármacos não se diferenciaram dos controles saudáveis, sugerindo que o cotratamento tem alta eficácia em suprimir consequências críticas da LPA como a disfunção respiratória. Portanto, assim como indicado por estudo clínico (RECOVERY Collaborative Group, 2022), os dados aqui obtidos mostram que a adição do inibidor de JAK baricitinibe ao tratamento da LPA com a dexametasona resulta em aumento considerável do benefício da intervenção.

Algumas particularidades, entretanto, enfatizam a complexidade da combinação de fármacos e principalmente do uso de corticosteroides na LPA. Por exemplo, em resposta ao LPS, a dexametasona foi associada a uma tendência de aumento na contagem total de células e da frequência de PMNs no espaço broncoalveolar, o que está na direção oposta à resolução do processo inflamatório. Ainda, este aumento contrapôs-se à redução significativa de PMNs observada na monoterapia com o baricitinibe, culminando em um antagonismo entre os fármacos e na ausência de benefício da terapia combinada para este parâmetro. Há também uma tendência consistente de ampliação do efeito do LPS pela dexametasona na expressão de *IL1b*, *Nlrp3*, *Tnf*, *Icam1* e *Il10* nos pulmões, ainda que não seja estatisticamente significativa. De particular interesse, a expressão de *Icam1*, cuja função está proximamente relacionada à migração de neutrófilos para as vias aéreas (Chong et al., 2021), tende à indução pela dexametasona mesmo quando combinada com o baricitinibe. Por conseguinte, é possível que maior expressão deste gene contribua ao antagonismo observado na presença de PMNs nos alvéolos.

Outra possível contribuição é um efeito inibitório da dexametasona sobre a remoção de PMNs infiltradas. Este é um processo essencial para o retorno à homeostase pulmonar que está prejudicado na SDRA (Grégoire et al., 2018). Neste sentido, trabalhos anteriores mostraram que corticosteroides de fato inibem a apoptose de neutrófilos (Cox, 1995; Liles et al., 1995; Meagher et al., 1996), e que isso ocorre possivelmente via liberação de G-CSF (Wakayama et al., 1996). Em acordo, um estudo com LPA induzida por LPS mostra que a administração de dexametasona resultou em aumento da neutrofilia pulmonar, efeito que foi atribuído à indução de G-CSF e revertido pelo cotratamento com anticorpo neutralizante da citocina (Banuelos et al., 2017). De maneira similar, em pacientes com SDRA, a presença de G-CSF foi também associada a maior sobrevivência de neutrófilos e maior gravidade da neutrofilia (Aggarwal et al., 2000; Matute-Bello et al., 1997).

Portanto, essas informações justificam pelo menos parcialmente o benefício limitado da dexametasona neste estudo, além de sugerir que a combinação com o baricitinibe poderia se beneficiar da inibição adicional de G-CSF.

Efeitos indesejados do corticosteroide também foram observados na análise hematológica, a qual evidenciou ampliação do desequilíbrio de neutrófilos e linfócitos para além da alteração induzida pelo LPS. Esta é uma resposta conhecida à dexametasona (Ohkaru et al., 2010; Peng et al., 1999), e é provável que esteja ligada às alterações descritas para o espaço broncoalveolar. Novamente, o efeito foi mantido na combinação com o baricitinibe, cuja capacidade de mitigar significativamente as alterações hematológicas foi silenciada. Logo, de maneira bastante similar à infiltração de PMNs nos alvéolos, a combinação dos fármacos foi inferior ao baricitinibe isolado no que diz respeito às alterações hematológicas. Porém, é importante destacar que os dois casos de antagonismo entre os fármacos não comprometeram a eficácia da combinação sobre os outros parâmetros. Isso pode sugerir que o antagonismo observado não é biologicamente relevante, ou que é compensado por outras interações funcionais, como o efeito aditivo entre os fármacos no controle da expressão pulmonar de *Ifn γ* . Neste caso, a expressão induzida pelo LPS foi parcialmente reduzida pelas monoterapias e totalmente suprimida (tão logo quanto em 24 horas e ao nível dos controles “sham”) sob o cotratamento. Portanto, este resultado é particularmente importante, visto que menor produção de IFN- γ (como confirmado no FLBA em 72 horas) poderia justificar a superioridade da terapia combinada.

A esse respeito, discute-se duas possibilidades. Primeiro, menor presença de IFN- γ resulta na ativação reduzida da via JAK-STAT e de ISGs (Ivashkiv, 2018), o que por si só contribuiria à atenuação do estímulo pró-inflamatório e, presumivelmente, da LPA. Em segundo lugar, há evidências na literatura de que a presença elevada de IFN- γ na inflamação pulmonar está associada à resistência a corticosteroides (Ivashkiv, 2018; Li et al., 2010; Southworth et al., 2012), especialmente na presença concomitante de TNF (Britt et al., 2019; Jackson et al., 2022). Logo, aqui, onde há forte expressão de IFN- γ e TNF nos alvéolos, uma eventual resistência à dexametasona poderia ser diretamente combatida pela inibição da via JAK-STAT com o baricitinibe. Inclusive, o fato de que uma alta concentração pulmonar de dexametasona foi incapaz de alterar a expressão gênica de *I11b*, *Nlrp3*, *I16*, *Tnf* e *Nos2*

(genes modulados pelo NF- κ B) é mais um indicativo desta resistência. Desse modo, a eficácia da coadministração dos fármacos pode resultar não somente da soma dos efeitos individuais, mas também da capacidade do baricitinibe em sensibilizar a resposta inflamatória ao mecanismo da dexametasona. Embora apoiado pela literatura e pelos dados, mais estudos são necessários para confirmar este efeito sinérgico em potencial.

Em paralelo, foi também identificado um efeito farmacológico sobre o gene *Nos2*, cuja expressão pulmonar foi reduzida pelo baricitinibe ou pela combinação, mas não pela dexametasona isoladamente. Considerado o papel importante da iNOS e do NO na hipercitocinemia (Karki et al., 2021; 2022) e na LPA (Golden et al., 2022; Gross et al., 2015; Peng et al., 2005; Wang et al., 2012), é razoável considerar que este efeito também tem participação nos benefícios observados. Porém, o baricitinibe reduziu a expressão de *Nos2* a nível nominalmente menor do que a terapia combinada, o que sugere ser um efeito específico do inibidor de JAKs. Como sugerido por análise *in vitro*, a dexametasona também pode inibir a expressão de *Nos2*/iNOS após estímulo por LPS, mas esse efeito é perdido ante coestimulação com IFN- γ (Korhonen et al., 2002). Por conseguinte, seria importante quantificar diretamente os níveis de iNOS e NO em um estudo futuro, a fim de entender melhor como cada fármaco e a combinação deles impactam nesses parâmetros.

Independente do mecanismo, deve ser notado que a monoterapia com dexametasona foi capaz de melhorar parcialmente aspectos importantes da mecânica respiratória. Isso aconteceu mesmo com tendências de acentuação da inflamação local e com aumento da alteração hematológica, além de não ter sido encontrado efeito do fármaco sobre a consolidação pulmonar. Assim, como já mencionado, nem sempre há uma relação direta entre alterações teciduais e prejuízo respiratório (Anciães et al., 2011; Biselli et al., 2019). Ademais, a coexistência de efeitos negativos e positivos dos corticosteroides é um fenômeno recorrente na LPA. Por exemplo, pacientes com SDRA que receberam metilprednisolona apresentaram maior mortalidade em 60 e 180 dias mesmo com melhora na fisiologia cardiopulmonar aos 28 dias (The NHLBI ARDS Network, 2006). Outro estudo mostra resultados semelhantes para a SDRA derivada da COVID-19, na qual maior sobrevivência de curto prazo associada aos corticosteroides foi substituída por aumento da mortalidade ao longo da hospitalização (Moreno et al., 2021). Da perspectiva experimental, a

inconsistência observada neste estudo quanto à dexametasona é uma característica positiva do modelo utilizado, e favorece a validade preditiva dos resultados por reproduzir a ambiguidade presente na clínica. Entretanto, também indica que seria importante uma avaliação mais longa do que a utilizada aqui, posta a possibilidade de que impactos negativos da terapia combinada apareçam durante a fase pós-aguda da LPA.

Considerando que tanto o baricitinibe quanto a dexametasona mostraram algum nível de eficácia sozinhos, é possível inferir que ambos os efeitos individuais (além de um potencial sinergismo, como já mencionado) contribuem para a eficácia da combinação. Contudo, essa adição de efeitos é evidentemente desigual, dado que os efeitos do baricitinibe são relativamente próximos (em alguns casos equivalentes ou superiores) aos da combinação das drogas e tendem a ser maiores do que os da dexametasona. Portanto, para este tipo de efeito aditivo, cunha-se aqui o termo “aditivo assimétrico”. Deste conceito deriva-se a hipótese de que, em iterações futuras da terapia combinada, seria possível substituir a dexametasona por outras drogas anti-citocina, a fim de se obter efeito aditivo simétrico — ou quase-simétrico — e com melhor relação risco-benefício. Todavia, apesar da controvérsia ao redor da droga, as evidências clínicas apontam a dexametasona como a principal candidata a terapias combinadas na LPA/SDRA (Fadanni & Calixto, 2023), o que reforça a importância de estudos com fármacos alternativos.

Assim, a partir da prova de conceito, duas combinações foram selecionadas. A primeira envolve a neutralização direcionada e simultânea de TNF e IFN- γ , para as quais há um número crescente de evidências de sinergismo em contextos inflamatórios, incluindo-se a LPA e a hipercitocinemia (Bastarache et al., 2011; Karki et al., 2021; Verma et al., 2021; 2022; Qiao et al., 2013; Zhang et al., 2021). De particular importância, um trabalho recente demonstrou que TNF e IFN- γ atuam de forma sinérgica na indução de morte celular inflamatória por meio da ativação do eixo JAK/STAT1/IRF1 e produção de NO (Karki et al., 2021). Este achado é concordante com os resultados da prova de conceito aqui reportada, dado que: a) a inibição da via JAK-STAT é o principal mecanismo de ação do baricitinibe e, por consequência, da combinação; e b) a terapia combinada resultou em forte redução dos níveis de TNF e IFN- γ assim como da expressão do gene *Nos2*, o que sugere menor liberação de NO. Isto posto, Karki et al. (2021) também demonstraram que a neutralização simultânea

dessas citocinas reduz significativamente a mortalidade em modelos associados a hipercitocinemia, como o choque por citocinas induzido por TNF e IFN- γ , sepse induzida por LPS, HLH induzida por Poly I:C e LPS, e infecção por SARS-CoV-2 (Karki et al., 2021). Desse modo, somadas as evidências, hipotetizou-se que a eficácia da combinação de dexametasona e baricitinibe sobre a LPA poderia ser reproduzida pela neutralização concomitante de TNF e IFN- γ .

Neste estudo, camundongos tratados preventivamente com anticorpos anti-TNF e anti-IFN- γ manifestaram alterações locais, sistêmicas e de função pulmonar muito menos intensas quando submetidos à LPA induzida por LPS. De maneira geral, os resultados obtidos seguem o mesmo padrão observado na prova de conceito anterior, onde há efeito positivo em quase todos os parâmetros avaliados, com poucas exceções. Contudo, no caso dos anticorpos neutralizantes, as monoterapias tiveram um impacto muito menos expressivo se comparadas à dexametasona ou ao baricitinibe, limitando-se quase na totalidade dos casos a efeitos menores e não-significativos. Em uma análise mais detalhada, percebe-se que há tendência de melhor desfecho sob a neutralização de IFN- γ , porém só a presença de PMNs foi significativamente afetada. De maneira similar, a neutralização do TNF só mitigou o dano à barreira alvéolo-capilar, o que é indicado pela menor presença de proteína no FLBA. A partir desse perfil, conclui-se que a eficácia da combinação anti-TNF e anti-IFN- γ surge de um sinergismo entre os fármacos, sendo necessária a coadministração para que se obtenha eficácia terapêutica na LPA. Em conformidade, Karki et al. (2021) observaram que a neutralização isolada de TNF ou IFN- γ foi significativamente menos eficaz do que a neutralização conjunta em modelos de HLH e “sepse”.

Simultaneamente, fica também demonstrado que a coinibição de TNF e IFN- γ resulta em efeitos bastante similares à combinação de dexametasona e baricitinibe. Uma das diferenças refere-se à ausência de efeito sobre a quimiocina CCL2/MCP-1, a qual detém efeitos pleiotrópicos na resposta imune (Gschwandtner et al., 2019) e cuja ausência de inibição não parece ter impactado os resultados. Outro contraste envolve a ausência de impacto negativo sobre linfócitos circulantes ou a infiltração de PMNs, efeitos previamente descritos para a dexametasona. Comparado aos mecanismos de inibição ampla da primeira combinação, sugere-se que a neutralização simultânea de TNF e IFN- γ pode ser uma alternativa direta e mais seletiva para o tratamento da hiperinflamação na LPA, oferecendo menor risco de

imunossupressão excessiva e de efeitos adversos sem comprometer a eficácia. Todavia, aspectos importantes surgem desta comparação, conforme discutido a seguir.

Primeiramente, é importante salientar que o protocolo de neutralização empregado neste estudo envolve um tratamento preventivo, o qual não pode ser diretamente extrapolado para a situação clínica. Portanto, ainda que a liberação dos alvos TNF e IFN- γ só ocorra após o LPS, o benefício do tratamento *a posteriore* não foi aqui investigado. Em segundo lugar, destaca-se que os mAbs testados são específicos para camundongos, ao contrário da primeira combinação que inclui medicamentos já aprovados para uso clínico. Neste contexto, não há, até o momento, provas de eficácia da combinação de anticorpos equivalentes na LPA humana, como o adalimumabe/infliximabe (anti-TNF) e o emapalumabe (anti-IFN- γ). No entanto, os resultados deste estudo oferecem forte apoio à pesquisa nessa direção. Em terceiro lugar, é importante mencionar que o elevado custo dos mAbs implica em limitações significativas em seu uso, o que comumente os torna uma escolha impraticável em diversos contextos clínicos (Morin et al., 2023). Por esse motivo, alternativas para tratamento da LPA/SDRA entre os fármacos sintéticos continuam a ser uma necessidade. Por último, é razoável considerar que a inibição seletiva de TNF e IFN- γ pode não ser a estratégia mais adequada para populações altamente heterogêneas, onde uma abordagem mais abrangente com dexametasona e baricitinibe ainda pode ser preferível.

Neste contexto, a fim de se expandir a investigação, uma segunda combinação alternativa de fármacos foi avaliada. Esta envolveu o dinaciclibe, um inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDK1, CDK2, CDK5 e CDK9; Parry et al., 2010), e o MCC950, um potente inibidor do inflamassoma NLRP3 (Coll et al., 2015). Em um estudo recente de grande impacto, publicou-se que o tratamento com dinaciclibe foi capaz de reduzir a hipercitocinemia e a mortalidade em modelos de sepse em camundongos (Wu et al., 2022). O mecanismo proposto foi a inibição do eixo CDK2-JUN-ACOD1 e consequente infrarregulação da via de sinalização do TNF (Wu et al., 2022), sendo JUN uma subunidade do fator de transcrição AP-1, e ACOD1 (aconitato descarboxilase 1) uma enzima altamente expressa em macrófagos ativados e responsável pela produção de itaconato (Michelucci et al., 2013). Além disso, em outro estudo, a administração do inibidor multi-CDK AT7519 foi associada à diminuição da

inflamação e da lesão tecidual na LPA induzida por LPS (Song et al., 2022). Diante desses achados, optou-se por explorar o dinaciclibe como um potencial candidato para a terapia combinada anti-citocina na LPA.

Não obstante, por suprimir a presença da ACOD1, a inibição de CDK2 também reduz a disponibilidade de itaconato (Wu et al., 2022), o qual possui efeitos anti-inflamatórios (Mills et al., 2018), aumenta em resposta ao LPS e na sepse (Mills et al., 2018; Wu et al., 2022), e é capaz de limitar a ativação do inflamassoma NLRP3 (Olona et al., 2022). Em relativo acordo, a ausência de itaconato por nocaute genético de *Acod1* (também conhecido por *Irg1*) causou agravamento da LPA induzida por injeção intraperitoneal de LPS (Qiu et al., 2023). Assim, especulou-se que a adição de um inibidor do inflamassoma NLRP3 ao dinaciclibe poderia compensar parcialmente a ausência de itaconato e a consequente menor supressão do inflamassoma. Ainda, somado a isso estão as evidências de que há a participação direta do inflamassoma NLRP3 na LPA/SDRA (Potere et al., 2022; Sefik et al., 2022) e na resposta ao LPS (Grailer et al., 2014), e que o inibidor MCC950 foi eficaz em estudos prévios com modelos de LPA (Corcoran et al., 2021; Zeng et al., 2022). Por fim, foi demonstrado neste estudo que a resposta ao LPS incluiu aumento da expressão pulmonar de *Il1b* e *Nlrp3* e liberação de IL-1 β nos alvéolos, corroborando a participação do inflamassoma. Sobre este racional teórico, postulou-se a hipótese de que o cotratamento com dinaciclibe e MCC950 seria superior às respectivas monoterapias no modelo de LPA induzido por LPS.

De maneira similar aos outros experimentos, tanto as monoterapias quanto a combinação do dinaciclibe e MCC950 mostraram algum nível de benefício. Porém, novamente, o efeito individual das duas drogas foi no geral intermediário em relação ao veículo e a combinação, e não atingem diferença estatística para quaisquer um dos extremos na maioria dos casos. Uma exceção inclui o peso corporal, onde o tanto o MCC950 quanto a combinação de fármacos limitam significativamente a perda de peso, mas sem promover uma recuperação. Outra exceção diz respeito ao influxo de células no espaço broncoalveolar e frequência de PMNs, onde os três tratamentos foram igualmente capazes de mitigar a resposta. Em evidente contraste, o cotratamento com dinaciclibe e MCC950 está associado a melhor desfecho em todos os parâmetros avaliados quando comparado ao veículo, com exceção de IL-10 e IL-12 no FLBA e poucas métricas da mecânica respiratória onde há efeito sugestivo.

Além disso, nenhum parâmetro da função pulmonar mostrou diferença entre os animais saudáveis e os que receberam o cotratamento, em oposição às duas monoterapias. Portanto, entende-se que os resultados corroboram a hipótese de superioridade da combinação.

De maneira importante, ainda que predominantemente não-significativos na análise estatística, os efeitos biológicos “intermediários” do dinaciclibe e do MCC950 tendem sistematicamente a uma equivalência entre si. Isso contrasta com a combinação de dexametasona e baricitinibe, onde há um efeito aditivo assimétrico e liderado pelo inibidor de JAKs. Contudo, também difere do sinergismo entre anti-TNF e anti-IFN- γ , posto que há mais parâmetros para os quais as monoterapias com dinaciclibe ou MCC950 têm impacto sobre o desfecho. Em concordância, uma análise secundária individual das monoterapias (**Anexo A**) mostra efeito significativo ou limítrofe em todos os parâmetros de inflamação local e sistêmica no tratamento com dinaciclibe ou MCC950, mas somente em alguns com o anti-TNF ou anti-IFN- γ . Assim, pode ser inferido que essa combinação tem efeito do tipo aditivo e quase-simétrico, ainda que haja eventuais pontos de sinergismo (e.g. na complacência quase-estática e curva pressão-volume) ou efeito assimétrico (e.g. no peso corporal). No mais, seria interessante investigar no futuro se a compensação parcial da ausência de itaconato pelo inibidor do inflamassoma NLPR3 tem de fato papel relevante na eficácia da combinação.

Se comparada à dexametasona e baricitinibe ou aos anticorpos neutralizantes, a combinação de dinaciclibe e MCC950 exibiu um conjunto de efeitos ligeiramente distinto, provavelmente devido à implicação de outros mecanismos de ação. Um contraste notável foi a incapacidade do cotratamento em questão de promover recuperação de peso, ainda que tenha sido observada atenuação da perda. Além disso, foi constatada uma forte redução do influxo alveolar de células em resposta ao tratamento, efeito benéfico que não havia sido encontrado nos experimentos anteriores. Isso demonstra que há múltiplos caminhos para a eficácia terapêutica na LPA, e que combinações anti-citocina com alvos moleculares distintos podem convergir em efeitos relativamente semelhantes.

A esse respeito, é importante ressaltar que uma eficácia “equivalente” no modelo de LPA em camundongos não implica necessariamente em uma proposta de intercambialidade entre as estratégias na clínica. Neste caso, há o desafio da

heterogeneidade dos pacientes. Por isso, através da prescrição orientada por biomarcadores, diferenças nos mecanismos de ação podem justificar a utilização das diferentes combinações em subgrupos específicos de pacientes (Fadanni & Calixto, 2023). Por exemplo, a neutralização simultânea de TNF e IFN- γ pode ser mais indicada àqueles com níveis mais elevados dessas citocinas (e.g. subfenótipo hiperinflamatório), ou ante evidência de ativação excessiva da via JAK-STAT ou marcador associado. Por outro lado, a combinação de MCC950 e dinaciclibe poderia se beneficiar da prescrição guiada por suPAR, como o anakinra (Kyriazopoulou et al., 2021b), ou sob evidência de inflamação excessiva associada a IL-1, IL-1Ra (Meyer et al., 2018) ou o inflamassoma NLRP3. Já a combinação de dexametasona e baricitinibe, por possuir um mecanismo não-seletivo, poderia ser preferencialmente utilizada em casos onde não há dados laboratoriais ou evidência suficiente para justificar outra combinação específica.

5. CONCLUSÕES

A partir de extensa caracterização, este estudo demonstrou que o modelo experimental padronizado induz alterações robustas nos quatro domínios da LPA, satisfazendo assim as recomendações da ATS para a triagem pré-clínica de fármacos. Além disso, foi identificado um perfil transcriptômico e de liberação de citocinas compatível com um estado de hiperinflamação pulmonar, de forma a permitir a investigação apropriada da combinação de fármacos anti-citocina.

Em seguida, em uma prova de conceito, foi revelado que a adição do baricitinibe ao tratamento com dexametasona aumentou consideravelmente a eficácia da intervenção. Os resultados aqui obtidos são consoantes a estudos clínicos anteriores, e apontam para o potencial imediato de se investigar a combinação de corticosteroides e inibidores de JAK em outras formas da LPA/SDRA. Porém, foi identificado que a eficácia da combinação parece resultar de uma adição assimétrica de efeitos, e que a monoterapia com dexametasona está também associada a efeitos indesejados. Assim, este estudo aponta para a importância de se investigar combinações alternativas.

Nesse sentido, este trabalho também demonstrou que a neutralização simultânea de TNF e IFN- γ na LPA induzida por LPS foi igualmente eficaz à primeira combinação, mas potencialmente mais segura. Dessa forma, os resultados aqui obtidos somam-se aos de Karki et al. (2021), e sugerem que a combinação de anticorpos anti-TNF e anti-IFN- γ pode ser uma alternativa promissora aos imunossupressores não-seletivos no tratamento da SDRA. Em paralelo, ao demonstrar que a combinação de dinaciclibe e MCC950 é mais eficaz do que as respectivas monoterapias, este estudo também indica que há múltiplos alvos terapêuticos pelos quais combinações de fármacos podem resultar em melhor desfecho na LPA.

Em conclusão, as combinações de fármacos anti-citocina reduzem a inflamação e as alterações hematológicas, fisiológicas e funcionais, de maneira superior às monoterapias na LPA induzida por LPS em camundongos. Este achado confirma a hipótese central do estudo, e apoia de maneira enfática a continuidade das investigações da terapia combinada anti-citocina em cenários de hiperinflamação e LPA.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões deste trabalho devem ser consideradas sob ciência de suas particularidades e das limitações de seus métodos. Entre elas, incluem-se os tempos de intervenção farmacológica, que são representativos do tratamento preventivo (anticorpos neutralizantes) ou terapêutico precoce (outros) e podem diferir do tratamento tardio, quando há dano estabelecido. Outra questão relevante a ser considerada é a ausência de fêmeas nos testes de eficácia terapêutica, o que faz com que as interpretações subsequentes não se apliquem, necessariamente, a ambos os sexos. Além disso, a eficácia da combinação de fármacos anti-citocina foi demonstrada na LPA de origem local e estéril, sendo desconhecidos os efeitos na LPA de origem extrapulmonar e/ou na presença de agentes infecciosos.

Em contrapartida, há também aspectos que impactam positivamente no estudo. Um deles é a ampla caracterização do modelo experimental, a qual abrange respostas tempo-, dose- e sexo-dependentes, e assegura conformidade com as recomendações da ATS para a triagem de fármacos na LPA. Além disso, este trabalho utilizou múltiplos parâmetros celulares, moleculares e fisiológicos para o teste da hipótese, o que aumenta a confiabilidade dos resultados. Além disso, optou-se por utilizar desfechos clinicamente relevantes e métodos de quantificação análogos ou homólogos à clínica, o que também contribui para a validade translacional. No mais, duas das três combinações de fármacos utilizadas são inéditas na pesquisa pré-clínica da LPA/SDRA, e todas elas (incluindo-se duas das seis monoterapias) são inéditas no modelo de LPA induzido por LPS. Por essas razões, este é um trabalho pioneiro em seu campo. Por fim, além do uso de animais com elevado padrão sanitário (SPF), este estudo foi realizado em ambiente condicionado ao sistema de Boas Práticas de Laboratório. Dessa forma, para todos os experimentos, há dados rastreáveis e auditáveis acerca dos controles de qualidade e registros operacionais que envolvem os animais de experimentação, as análises, os reagentes, os equipamentos, e a estrutura física da instituição.

7. DO PROGRAMA DE DOUTORADO ACADÊMICO PARA INOVAÇÃO

Como parte do Programa de Doutorado Acadêmico para Inovação (chamada pública nº 23/2018), este trabalho advém de iniciativa do CNPq voltada a fortalecer a pesquisa, o empreendedorismo e a inovação nas instituições científicas, tecnológicas e de inovação (ICTs) brasileiras. Neste contexto, firmou-se a parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP), a qual possibilitou o desenvolvimento deste projeto. Assim, para além da produção científica referente à esta tese e já descrita nos resultados, destaca-se a formação de capital humano nas áreas de Farmacologia e de Inovação, fundamentada por:

- Treinamento em boas práticas científicas (e.g. planejamento experimental e planos de estudo, cegamento, randomização, análise e interpretação dos dados);
- Treinamento em aspectos regulatórios para desenvolvimento e registro de medicamentos, e treinamento formal em Boas Práticas de Laboratório (BPL);
- Oportunidade de participar de preparo e depósito de patentes;
- Oportunidade de realizar cursos e treinamentos de interesse profissional promovidos pela instituição ou parceiros;
- Oportunidade de discutir e praticar a ciência translacional;
- Vivência em ambiente empresarial e de relação estreita com indústrias farmacêuticas e startups;
- Vivência em prestações de serviços e contato com clientes;
- Vivência em projetos de inovação multidisciplinares e com grandes equipes;
- Vivência em infraestrutura de excelência para a pesquisa, com laboratórios bem equipados e apoio de pesquisadores, bolsistas de pós-doutorado e técnicos, além de animais de elevado padrão sanitário, controle de qualidade dos processos internos e disponibilidade de recursos para aquisição de reagentes e equipamentos.

No âmbito do exposto acima, conclui-se que foram bem-sucedidos os objetivos da parceria UFSC-CIEnP no que se refere ao Doutorado Acadêmico em Inovação em Farmacologia deste autor.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. **JAMA**, 273(12), 934–941. 1995
- ABRAHAM, E. et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. **Lancet (London, England)**, 351(9107), 929–933. 1998
- ABRAHAM, E. et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. **Critical Care Medicine**, 29(3), 503–510. 2001. <https://doi.org/10.1097/00003246-200103000-00006>
- ARDS NETWORK. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The **New England Journal of Medicine**, 342(18), 1301–1308. 2000. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421801>
- AEFFNER, F.; BOLON, B.; DAVIS, I. C. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements. **Toxicologic Pathology**, 43(8), 1074–1092. 2015. <https://doi.org/10.1177/0192623315598399>
- AGGARWAL, A.; BAKER, C. S.; EVANS, T. W.; HASLAM, P. L. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. **European Respiratory Journal**, 15(5), 895–901. 2000. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15e14.x>
- AHMED, C. M. I.; LARKIN, J.; JOHNSON, H. M. SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. **Frontiers in Immunology**, 6, 183. 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00183>
- AHOOKHOSH, K.; VANOIRBEEK, J.; VANDE VELDE, G. Lung function measurements in preclinical research: What has been done and where is it headed? **Frontiers in Physiology**, 14. 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1130096>
- AKINOSOGLOU et al. Efficacy and safety of early soluble urokinase plasminogen receptor plasma-guided anakinra treatment of COVID-19 pneumonia: A subgroup analysis of the SAVE-MORE randomised trial. **EClinicalMedicine**, 56, 101785. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101785>
- AL KHARUSI et al. A Prospective Cohort Study of COVID-19: Evaluation of the Early Role of IL-1 and IL-6 Antagonists in Improving the Outcome of the Illness and Reduction in the Risk of Death. **Healthcare (Basel, Switzerland)**, 11(7). 2023. <https://doi.org/10.3390/healthcare11071025>

AL-SALAMA, Z. T. Emapalumab: First Global Approval. **Drugs**, 79(1), 99–103. 2019. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1046-8>

ALBEITUNI, S. et al. Mechanisms of action of ruxolitinib in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Blood**, 134(2), 147–159. 2019. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000761>

ALM, A.-S.; LI, K.; CHEN, H.; WANG, D.; ANDERSSON, R.; WANG, X. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 171(2), 157–164. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.02.009>

ALM, A.-S.; LI, K.; YANG, D.; ANDERSSON, R.; LU, Y.; WANG, X. Varying susceptibility of pulmonary cytokine production to lipopolysaccharide in mice. **Cytokine**, 49(3), 256–263. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.007>

ALTEMEIER, W. A.; MATUTE-BELLO, G.; GHARIB, S. A.; GLENNY, R. W.; MARTIN, T. R.; LILES, W. C. Modulation of Lipopolysaccharide-Induced Gene Transcription and Promotion of Lung Injury by Mechanical Ventilation. **The Journal of Immunology**, 175(5), 3369–3376. 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3369>

ANCIÃES, A. M. et al. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, 66(10), 1797–1803. 2011. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001000020>

AO, G.; WANG, Y.; LI, A.; TRAN, C.; YANG, Q. The effect of canakinumab on clinical outcomes in patients with COVID-19: A meta-analysis. **The Journal of Infection**, 84(6), 834–872. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.03.011>

AOYAGI, T.; SATO, Y.; TOYAMA, M.; OSHIMA, K.; KAWAKAMI, K.; KAKU, M. Etoposide and Corticosteroid Combination Therapy Improves Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **Shock (Augusta, Ga.)**, 52(1), 83–91. 2019. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001231>

ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome. **JAMA**, 307(23). 2012. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>

ASHBAUGH, DAVID G.; BOYD BIGELOW, D.; PETTY, THOMAS L.; LEVINE, BERNARD E. Acute respiratory distress in adults. **The Lancet**, 290(7511), 319–323. 1967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)90168-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)90168-7)

BALLINGER, M. N. et al. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 34(6), 766–774. 2006. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0246OC>

BANUELOS, J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor blockade enables dexamethasone to inhibit lipopolysaccharide-induced murine lung neutrophils. **PloS One**, 12(5), e0177884. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177884>

- BARKHAUSEN, T. et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. **Critical Care Medicine**, 39(6), 1407–1413. 2011. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318211ff56>
- BASTARACHE, J. A.; SEBAG, S. C.; GROVE, B. S.; WARE, L. B.. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α act synergistically to up-regulate tissue factor in alveolar epithelial cells. **Experimental Lung Research**, 37(8), 509–517. 2011. <https://doi.org/10.3109/01902148.2011.605512>
- BATES, J. H. T. CORP: Measurement of lung function in small animals. **Journal of Applied Physiology**, 123(5), 1039–1046. 2017. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00243.2017>
- BAUER, T. T. et al. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. **Thorax**, 55(1), 46–52. 2000. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.1.46>
- BEITLER, J. R., MALHOTRA, A., THOMPSON, B. T. Ventilator-induced Lung Injury. **Clinics in Chest Medicine**, 37(4), 633–646. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.07.004>
- BELLANI, G. et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. **JAMA**, 315(8), 788–800. 2016. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>
- BERMUDEZ, T. et al. eNAMPT neutralization reduces preclinical ARDS severity via rectified NF κ B and Akt/mTORC2 signaling. **Scientific Reports**, 12(1), 696. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04444-9>
- BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 149(3), 818–824. 1994. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>
- BERTOK, S.; WILSON, M. R.; MORLEY, P. J.; DE WILDT, R.; BAYLIFFE, A.; TAKATA, M. Selective inhibition of intra-alveolar p55 TNF receptor attenuates ventilator-induced lung injury. **Thorax**, 67(3), 244–251. 2012. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200590>
- BHATIA, M., ZEMANS, R. L., & JEYASEELAN, S. Role of Chemokines in the Pathogenesis of Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 46(5), 566–572. 2012. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0392TR>
- BISELLI, P. J. C.; BENINI KOHLER, J.; RIGHETTI, R.; DE FÁTIMA LOPES CALVO TIBÉRIO, I.; DE ARRUDA MARTINS, M.; DEGOBBI TENORIO QUIRINO DOS SANTOS LOPES, F. Analysis of respiratory mechanics in animal models: Its use in understanding lung behavior in emphysema and asthma. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 29–30, 11–17. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.10.001>

BITTENCOURT-MERNAK, M. I. et al. Prophylactic and therapeutic treatment with the flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 312(2), L217–L230. 2017. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00444.2015>

BOS, L. D. J., WARE, L. B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. **Lancet (London, England)**, 400(10358), 1145–1156. 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01485-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01485-4)

BOS, L. D. et al. Identification and validation of distinct biological phenotypes in patients with acute respiratory distress syndrome by cluster analysis. **Thorax**, 72(10), 876–883. 2017. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209719>

BOUCHER, P. E., TAPLIN, J., CLEMENT, F. The Cost of ARDS: A systematic review. **Chest**, 161(3), 684–696. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.08.057>

BOZZI, G. et al. Anakinra combined with methylprednisolone in patients with severe COVID-19 pneumonia and hyperinflammation: An observational cohort study. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 147(2), 561-566.e4. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.006>

BRICHER CHOQUE, P. N. et al. The Cholinergic Drug Pyridostigmine Alleviates Inflammation During LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, 12. 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.624895>

BRITT, R. D.; THOMPSON, M. A.; SASSE, S.; PABELICK, C. M.; GERBER, A. N.; PRAKASH, Y. S. Th1 cytokines TNF- α and IFN- γ promote corticosteroid resistance in developing human airway smooth muscle. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 316(1), L71–L81. 2019. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00547.2017>

BRYUSHKOVA, E. A. et al. Tocilizumab, netakimab, and baricitinib in patients with mild-to-moderate COVID-19: An observational study. **PLoS One**, 17(8), e0273340. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273340>

BURNHAM, E. L.; JANSSEN, W. J.; RICHES, D. W. H.; MOSS, M.; DOWNEY, G. P. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. **European Respiratory Journal**, 43(1), 276–285. 2014. <https://doi.org/10.1183/09031936.00196412>

CALAMA, E. et al. Tofacitinib ameliorates inflammation in a rat model of airway neutrophilia induced by inhaled LPS. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 43, 60–67. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2017.01.002>

CALFEE, C. S. et al. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2(8), 611–620. 2014. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70097-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70097-9)

CALFEE, C. S. et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes and differential response to simvastatin: secondary analysis of a randomised controlled trial. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 6(9), 691–698. 2018. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30177-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30177-2)

CALKINS, C. M. et al. Toll-like Receptor-4 Signaling Mediates Pulmonary Neutrophil Sequestration in Response to Gram-Positive Bacterial Enterotoxin. **Journal of Surgical Research**, 104(2), 124–130. 2002. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6422>

CARD, J. W. et al. Gender Differences in Murine Airway Responsiveness and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **The Journal of Immunology**, 177(1), 621–630. 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.621>

CAREY, M. A. et al. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 18(8), 308–313. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.08.003>

CARLA, A. et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes and therapy responsive traits among preclinical models: protocol for a systematic review and meta-analysis. **Respiratory Research**, 21(1), 81. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01337-9>

CAVALLI, G.; DAGNA, L. The right place for IL-1 inhibition in COVID-19. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 9(3), 223–224. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00035-7)

CESTA, M. C. et al. The Role of Interleukin-8 in Lung Inflammation and Injury: Implications for the Management of COVID-19 and Hyperinflammatory Acute Respiratory Distress Syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, n, 12, 808797. 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.808797>

CHANG, X.; Li, S.; Fu, Y.; Dang, H.; Liu, C. Safety and efficacy of corticosteroids in ARDS patients: a systematic review and meta-analysis of RCT data. **Respiratory Research**, 23(1), 301. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02186-4>

CHAPMAN, R. W et al. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 322(2), 486–493. 2007. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.119040>

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, 4(4), 303–306. 2013. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 4(6), 773–783. 2010. <https://doi.org/10.1586/ers.10.71>

- CHIMENTI, L. et al. Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury. **Intensive Care Medicine Experimental**, 8(S1), 62. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00350-y>
- CHONG, D. L. W. et al. ICAM-1 and ICAM-2 Are Differentially Expressed and Up-Regulated on Inflamed Pulmonary Epithelium, but Neither ICAM-2 nor LFA-1: ICAM-1 Are Required for Neutrophil Migration Into the Airways In Vivo. **Frontiers in Immunology**, 12. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691957>
- COCHI, S. E.; KEMPKER, J. A.; ANNANGI, S.; KRAMER, M. R.; MARTIN, G. S. Mortality Trends of Acute Respiratory Distress Syndrome in the United States from 1999-2013. **Annals of the American Thoracic Society**, AnnalsATS.201512-841OC. 2016. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201512-841OC>
- COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nature Medicine**, 21(3), 248–255. 2015. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- COHEN, M. S.; WOHL, D. A.; FISCHER, W. A.; SMITH, D. M.; ERON, J. J. Outpatient Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection to Prevent Coronavirus Disease 2019 Progression. **Clinical Infectious Diseases**, 73(9), 1717–1721. 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab494>
- CORCORAN, S. E.; HALAI, R.; COOPER, M. A. Pharmacological Inhibition of the Nod-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome with MCC950. **Pharmacological Reviews**, 73(3), 968–1000. 2021. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000171>
- COX, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 154(9), 4719–4725. 1995.
- CREMER, P. C. et al. Mavrilimumab in patients with severe COVID-19 pneumonia and systemic hyperinflammation (MASH-COVID): an investigator initiated, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Rheumatology**, 3(6), e410–e418. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00070-9)
- CRINER, G. J. et al. Anti-Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Monoclonal Antibody Gimsilumab for COVID-19 Pneumonia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 205(11), 1290–1299. 2022. <https://doi.org/10.1164/rccm.202108-1859OC>
- CROWE, C. R. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 183(8), 5301–5310. 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900995>
- DAHMS, K.; MIKOLAJEWSKA, A.; ANSEMS, K.; METZENDORF, M.-I.; BENSTOEM, C.; STEGEMANN, M. Anakinra for the treatment of COVID-19 patients:

a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Medical Research**, 28(1), 100. 2023. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01072-z>

DE ALESSANDRIS, S. et al. Neutrophil GM-CSF receptor dynamics in acute lung injury. **Journal of Leukocyte Biology**, 105(6), 1183–1194. 2019. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0918-347R>

DECLERCQ, J. et al. Effect of anti-interleukin drugs in patients with COVID-19 and signs of cytokine release syndrome (COV-AID): a factorial, randomised, controlled trial. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 9(12), 1427–1438. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00377-5)

DEVOS, F. C. et al. Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. **Respiratory Research**, 18(1), 123. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0610-1>

DOMSCHEIT, H.; HEGEMAN, M. A.; CARVALHO, N.; SPIETH, P. M. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. **Frontiers in Physiology**, 11. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00036>

DU, H.-L.; ZHAI, A.-D.; YU, H. Synergistic effect of halofuginone and dexamethasone on LPS-induced acute lung injury in type II alveolar epithelial cells and a rat model. **Molecular Medicine Reports**, 21(2), 927–935. 2020. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10865>

DURST, M. S.; ARRAS, M.; PALME, R.; TALBOT, S. R.; JIRKOF, P. Lidocaine and bupivacaine as part of multimodal pain management in a C57BL/6J laparotomy mouse model. **Scientific Reports**, 11(1), 10918. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90331-2>

EHRENTRAUT, H.; WEISHEIT, C. K.; FREDE, S.; HILBERT, T. Inducing Acute Lung Injury in Mice by Direct Intratracheal Lipopolysaccharide Instillation. **Journal of Visualized Experiments**, 149. 2019. <https://doi.org/10.3791/59999>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Assessment Report Kineret**. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/kineret-h-c-000363-ii-0086-epar-assessment-report-variation_en.pdfhttps://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/kineret-h-c-000363-ii-0086-%20epar-assessment-report-variation_en.pdf. Acesso em: 24/04/2023.

ESCOTER-TORRES, L.; CARATTI, G.; MECHTIDOU, A.; TUCKERMANN, J.; UHLENHAUT, N. H.; VETTORAZZI, S. Fighting the Fire: Mechanisms of Inflammatory Gene Regulation by the Glucocorticoid Receptor. **Frontiers in Immunology**, 10, 1859. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01859>

FADANNI, G. P.; CALIXTO, J. B. Recent progress and prospects for anti-cytokine therapy in preclinical and clinical acute lung injury. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 71–72, 13–25. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.07.002>

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, 383(23), 2255–2273. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>

FAKHARIAN, A., et al. Evaluation of adalimumab effects in managing severe cases of COVID-19: A randomized controlled trial. **International Immunopharmacology**, 99, 107961. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107961>

FAMOUS, K. R., et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 195(3), 331–338. 2017. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0645OC>

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**, 319(7), 698. 2018. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.21907>

FAN, E. et al. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 195(9), 1253–1263. 2017. <https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0548ST>

FENG, L.-H.; LI, X.-D.; ZHANG, X.-Y.; CHENG, P.-J.; FENG, Z.-Y. Dexamethasone for the treatment of acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**, 101(39), e30195. 2022. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000030195>

FISHER, B. A. et al. Namilumab or infliximab compared with standard of care in hospitalised patients with COVID-19 (CATALYST): a randomised, multicentre, multi-arm, multistage, open-label, adaptive, phase 2, proof-of-concept trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, 10(3), 255–266. 2022. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00460-4)

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Application number: 207924Orig1s000**. Center for Drug Evaluation and Research. Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s). 2017. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/207924Orig1s000ClinPharmR.pdf. Acesso em: 04/09/2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Kineret Letter of Authorization**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/163081/download>. Acesso em: 24/04/2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA News Release**. FDA Roundup: December 23, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/pressannouncements/fda-roundup-december-23-2022>. Acesso em: 24/04/2023.

FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES (FIRS). **The Global Impact of Respiratory Disease**. Third Edition. Disponível em:

https://www.firsnet.org/images/publications/FIRS_Master_09202021.pdf. Acesso em: 12/12/2022.

FRANK, J. A.; PITTET, J.-F.; WRAY, C.; MATTHAY, M. A. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. **Thorax**, 63(2), 147–153. 2008. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.079608>

FRIDMAN, J. S. et al. Selective Inhibition of JAK1 and JAK2 Is Efficacious in Rodent Models of Arthritis: Preclinical Characterization of INCB028050. **The Journal of Immunology**, 184(9), 5298–5307. 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902819>

FUNG, N. H. et al. Targeting the human β c receptor inhibits inflammatory myeloid cells and lung injury caused by acute cigarette smoke exposure. **Respirology (Carlton, Vic.)**, 27(8), 617–629. 2022. <https://doi.org/10.1111/resp.14297>

GAITÁN-DUARTE, H. G. et al. Effectiveness of rosuvastatin plus colchicine, emtricitabine/tenofovir and combinations thereof in hospitalized patients with COVID-19: a pragmatic, open-label randomized trial. **EClinicalMedicine**, 43, 101242. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101242>

GARCIA-DONAS, J. et al. Randomized phase II clinical trial of ruxolitinib plus simvastatin in COVID19 clinical outcome and cytokine evolution. **Frontiers in Immunology**, 14, 1156603. 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1156603>

GIUDICE, V. et al. Combination of Ruxolitinib and Eculizumab for Treatment of Severe SARS-CoV-2-Related Acute Respiratory Distress Syndrome: A Controlled Study. **Frontiers in Pharmacology**, 11, 857. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00857>

GOLDEN, T. N.; VENOSA, A.; GOW, A. J. Cell Origin and iNOS Function Are Critical to Macrophage Activation Following Acute Lung Injury. **Frontiers in Pharmacology**, 12. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.761496>

GOLDMAN, J. L. et al. Pleiotropic effects of interleukin-6 in a “two-hit” murine model of acute respiratory distress syndrome. **Pulmonary Circulation**, 4(2), 280–288. 2014. <https://doi.org/10.1086/675991>

GOTTS, J. E. et al. Cigarette Smoke Exposure Worsens Endotoxin-Induced Lung Injury and Pulmonary Edema in Mice. **Nicotine & Tobacco Research**, 19(9), 1033–1039. 2017. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntx062>

GOU, X. et al. IL-6 During Influenza-Streptococcus pneumoniae Co-Infected Pneumonia-A Protector. **Frontiers in Immunology**, 10, 3102. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03102>

GRAILER, J. J. et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 192(12), 5974–5983. 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400368>

- GRÉGOIRE, M., et al. Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular trap clearance by macrophages in ARDS. **European Respiratory Journal**, 52(2), 1702590. 2018. <https://doi.org/10.1183/13993003.02590-2017>
- GROSS, C. M. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Deficient Mice Are Protected from Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury. **PLOS ONE**, 10(3), e0119918. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119918>
- GU, S. et al. Baricitinib Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Inhibiting TGF- β 1 Signaling Pathway. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 28(5). 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28052195>
- GUIMARÃES, P. O. et al. Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, 385(5), 406–415. 2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101643>
- GÜNGÖR, N. et al. Transcriptional profiling of the acute pulmonary inflammatory response induced by LPS: role of neutrophils. **Respiratory Research**, 11(1), 24. 2010. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-24>
- GSCHWANDTNER, M.; DERLER, R.; MIDWOOD, K. S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. **Frontiers in Immunology**, 10. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02759>
- HALSTEAD, E. S. et al. GM-CSF overexpression after influenza a virus infection prevents mortality and moderates M1-like airway monocyte/macrophage polarization. **Respiratory Research**, 19(1), 3. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0708-5>
- HARRINGTON, W. N.; KACKOS, C. M.; WEBBY, R. J. The evolution and future of influenza pandemic preparedness. **Experimental & Molecular Medicine**, 53(5), 737–749. 2021. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00603-0>
- HARRIS, R. S. Pressure-volume curves of the respiratory system. **Respiratory Care**, 50(1), 78–98; discussion 98-9. 2005.
- HARTNEY, J. M.; ROBICHAUD, A. Assessment of Airway Hyperresponsiveness in Mouse Models of Allergic Lung Disease Using Detailed Measurements of Respiratory Mechanics. **Methods in Molecular Biology**, pp. 205–217. 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-496-8_16
- HASAN, M. J.; RABBANI, R.; ANAM, A. M.; HUQ, S. M. R. Therapeutic safety and efficacy of triple-immunosuppressants versus dual-immunosuppressants in severe-to-critical COVID-19: a prospective cohort study in Bangladesh. **Annals of Medicine**, 54(1), 723–732. 2022. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2039958>
- HEADLEY, L. et al. Low-dose administration of bleomycin leads to early alterations in lung mechanics. **Experimental Physiology**, 103(12), 1692–1703. 2018. <https://doi.org/10.1113/EP087322>

HEFFERNAN, D. S. et al. Gender and Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Injured Adults: A Prospective Study. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, 71(4), 878–885. 2011.

<https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31822c0d31>

HEIJNEN, N. F. L. et al. Biological subphenotypes of acute respiratory distress syndrome may not reflect differences in alveolar inflammation. **Physiological Reports**, 9(3), e14693. 2021. <https://doi.org/10.14814/phy2.14693>

HELMS, M. N.; TORRES-GONZALEZ, E.; GOODSON, P.; ROJAS, M. Direct Tracheal Instillation of Solutes into Mouse Lung. **Journal of Visualized Experiments**, 42. 2010. <https://doi.org/10.3791/1941>

HENDERSON, W. R.; CHEN, L.; AMATO, M. B. P.; BROCHARD, L. J. Fifty Years of Research in ARDS. Respiratory Mechanics in Acute Respiratory Distress Syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 196(7), 822–833. 2017. <https://doi.org/10.1164/rccm.201612-2495CI>

HERBOLD, W. et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. **Infection and Immunity**, 78(6), 2620–2630. 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-09>

HERMINE, O. et al. Tocilizumab plus dexamethasone versus dexamethasone in patients with moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: A randomised clinical trial from the CORIMUNO-19 study group. **EClinicalMedicine**, 46, 101362. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101362>

HOANG, T. N. et al. Baricitinib treatment resolves lower-airway macrophage inflammation and neutrophil recruitment in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. **Cell**, 184(2), 460-475.e21. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.007>

HONG, W. et al. A mouse model for SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 6(1), 1. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00451-w>

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, 19(3), 141–154. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

HUARTE, E. et al. Ruxolitinib, a JAK1/2 Inhibitor, Ameliorates Cytokine Storm in Experimental Models of Hyperinflammation Syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, 12, 650295. 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.650295>

HUPPERT, L.; MATTHAY, M.; WARE, L. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 40(01), 031–039. 2019. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683996>

IBRAHIM, Y. F.; MOUSSA, R. A.; BAYOUMI, A. M. A.; AHMED, A.-S. F. Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of

sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK: a possible role of P-glycoprotein.

Inflammopharmacology, 28(1), 215–230. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00628-y>

INGENITO, E. P.; MORA, R.; CULLIVAN, M.; MARZAN, Y.; HALEY, K.; MARK, L.; SONNA, L. A. Decreased Surfactant Protein-B Expression and Surfactant Dysfunction in a Murine Model of Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 25(1), 35–44. 2001.

<https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.1.4021>

IULIANO, A. D. et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. **The Lancet**, 391(10127), 1285–1300. 2018.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)

IVASHKIV, L. B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, 18(9), 545–558. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>

JACKSON, D.; WALUM, J.; BANERJEE, P.; LEWIS, B. W.; PRAKASH, Y. S.; SATHISH, V.; XU, Z.; BRITT, R. D. Th1 cytokines synergize to change gene expression and promote corticosteroid insensitivity in pediatric airway smooth muscle. **Respiratory Research**, 23(1), 126. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02046-1>

JACOBS, T. G.; MARZOLINI, C.; BACK, D. J.; BURGER, D. M. Dexamethasone is a dose-dependent perpetrator of drug–drug interactions: implications for use in people living with HIV. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 77(3), 568–573. 2022.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkab412>

JANSSEN, O. et al. Low-dose endotoxin inhalation in healthy volunteers - a challenge model for early clinical drug development. **BMC Pulmonary Medicine**, 13(1), 19. 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-19>

JEYASEELAN, S.; CHU, H. W.; YOUNG, S. K.; WORTHEN, G. S. Transcriptional Profiling of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **Infection and Immunity**, 72(12), 7247–7256. 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7247-7256.2004>

JOLY, J.-A. et al. Combined IFN- γ and JAK inhibition to treat hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 151(1), 247-259.e7. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.07.026>

JORGENSEN, S. C. J.; TSE, C. L. Y.; BURRY, L.; DRESSER, L. D. Baricitinib: A Review of Pharmacology, Safety, and Emerging Clinical Experience in COVID-19. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, 40(8), 843–856. 2020. <https://doi.org/10.1002/phar.2438>

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews. Rheumatology**, 12(1), 49–62. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>

KAO, K.-C. et al. Coinfection and Mortality in Pneumonia-Related Acute Respiratory Distress Syndrome Patients with Bronchoalveolar Lavage. **Shock**, 47(5), 615–620. 2017. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000802>

KAPLANSKI, G. et al. Combined Anakinra and Ruxolitinib treatment to rescue extremely ill COVID-19 patients: A pilot study. **Autoimmunity Reviews**, 20(2), 102726. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102726>

KARKI, P. et al. Microtubule-dependent mechanism of anti-inflammatory effect of SOCS1 in endothelial dysfunction and lung injury. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 35(4), e21388. 2021. <https://doi.org/10.1096/fj.202001477RR>

KARKI, R. et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, 184(1), 149-168.e17. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>

KARKI, R.; KANNEGANTI, T.-D. The “cytokine storm”: molecular mechanisms and therapeutic prospects. **Trends in Immunology**, 42(8), 681–705. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.06.001>

KARKI, R.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19. **Journal of Translational Medicine**, 20(1), 542. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03767-z>

KASTIS, G. A. et al. Dose- and time-dependent effects of lipopolysaccharide on technetium-99-m-labeled diethylene-triamine pentaacetic acid clearance, respiratory system mechanics and pulmonary inflammation. **Experimental Biology and Medicine**, 238(2), 209–222. 2013. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012313>

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, 479(7371), 117–121. 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10558>

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, 526(7575), 666–671. 2015. <https://doi.org/10.1038/nature15541>

KETCHAM, S. W. et al. Causes and characteristics of death in patients with acute hypoxemic respiratory failure and acute respiratory distress syndrome: a retrospective cohort study. **Critical Care**, 24(1), 391. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03108-w>

KHADANGI, F. et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. **Scientific Reports**, 11(1), 7777. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87462-x>

KIESER, K. J.; KAGAN, J. C. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, 17(6), 376–390. 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.25>

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D. G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biology**, 8(6), e1000412. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

KOBAYASHI, T. et al. Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis. **Respiratory Research**, 16(1), 99. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0261-z>

KOHLER, K.; CONWAY MORRIS, A. GM-CSF targeting in COVID-19: an approach based on fragile foundations. **The European Respiratory Journal**, 61(2). 2023. <https://doi.org/10.1183/13993003.02091-2022>

KOKKOTIS, G. et al. Systematic review with meta-analysis: COVID-19 outcomes in patients receiving anti-TNF treatments. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 55(2), 154–167. 2022. <https://doi.org/10.1111/apt.16717>

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; HÄMÄLÄINEN, M.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Dexamethasone Inhibits Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production by Destabilizing mRNA in Lipopolysaccharide-Treated Macrophages. **Molecular Pharmacology**, 62(3), 698–704. 2002. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.698>

KULKARNI, H. S. et al. Update on the Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals: An Official American Thoracic Society Workshop Report. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 66(2), e1–e14. 2022. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0531ST>

KYRIAZOPOULOU, E. et al. Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis. **The Lancet. Rheumatology**, 3(10), e690–e697. 2021a. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00216-2](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00216-2)

KYRIAZOPOULOU, E. et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. **Nature Medicine**, 27(10), 1752–1760. 2021b. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01499-z>

LAFHEY, J. G. et al. Geo-economic variations in epidemiology, patterns of care, and outcomes in patients with acute respiratory distress syndrome: insights from the LUNG SAFE prospective cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, 5(8), 627–638. 2017. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30213-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30213-8)

LANDOLF, K. M. et al. Corticosteroid use in ARDS and its application to evolving therapeutics for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review. **Pharmacotherapy**, 42(1), 71–90. 2022. <https://doi.org/10.1002/phar.2637>

LANDONI, G. et al. A Multicenter Phase 2 Randomized Controlled Study on the Efficacy and Safety of Reparixin in the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19 Pneumonia. **Infectious Diseases and Therapy**, 11(4), 1559–1574. 2022a. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00644-6>

LANDONI, G. et al. A phase 3 study to evaluate the efficacy and safety of reparixin in severe COVID-19 pneumonia. **European Respiratory Journal**, 60(suppl 66), 2135. 2022b. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2022.2135>

LANDONI, G.; ZANGRILLO, A.; PIERSANTI, G.; SCQUIZZATO, T.; PIEMONTI, L. The effect of reparixin on survival in patients at high risk for in-hospital mortality: a meta-analysis of randomized trials. **Frontiers in Immunology**, 13, 932251. 2022c. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932251>

LANG, F. M.; LEE, K. M.-C.; TEIJARO, J. R.; BECHER, B.; HAMILTON, J. A. GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. **Nature Reviews. Immunology**, 20(8), 507–514. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0357-7>

LARCOMBE, A. N. et al. Sexual dimorphism in lung function responses to acute influenza A infection. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, 5(5), 334–342. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00236.x>

LAUDER, S. N. et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. **European Journal of Immunology**, 43(10), 2613–2625. 2013. <https://doi.org/10.1002/eji.201243018>

LAZAAR, A. L.; SWEENEY, L. E.; MACDONALD, A. J.; ALEXIS, N. E.; CHEN, C.; TAL-SINGER, R. SB-656933, a novel CXCR2 selective antagonist, inhibits ex vivo neutrophil activation and ozone-induced airway inflammation in humans. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 72(2), 282–293. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03968.x>

LE, T.-T. T. et al. Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 193(7), 3755–3768. 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302470>

LEISMAN, D. E. et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 8(12), 1233–1244. 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30404-5)

LEWIS, S. R.; PRITCHARD, M. W.; THOMAS, C. M.; SMITH, A. F. Pharmacological agents for adults with acute respiratory distress syndrome. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, 7(7), CD004477. 2019. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004477.pub3>

LI, C. et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. **Cell Research**, 22(3), 528–538. 2012. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.165>

LI, Q.; GU, Y.; TU, Q.; WANG, K.; GU, X.; REN, T. (2016). Blockade of Interleukin-17 Restrains the Development of Acute Lung Injury. **Scandinavian Journal of Immunology**, 83(3), 203–211. <https://doi.org/10.1111/sji.12408>

LI, J. J. et al. IL-27/IFN- γ Induce MyD88-Dependent Steroid-Resistant Airway Hyperresponsiveness by Inhibiting Glucocorticoid Signaling in Macrophages. **The Journal of Immunology**, 185(7), 4401–4409. 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001039>

LI, J. et al. Cytokine/Chemokine Expression Is Closely Associated Disease Severity of Human Adenovirus Infections in Immunocompetent Adults and Predicts Disease Progression. **Frontiers in Immunology**, 12, 691879. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691879>

LI, Y.; YU, H.; LV, M.; LI, Q.; ZOU, K.; LV, S. Combination therapy with budesonide and N-acetylcysteine ameliorates LPS-induced ALI by attenuating neutrophil recruitment through the miR-196b-5p/Socs3 molecular axis. **BMC Pulmonary Medicine**, 22(1), 388. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12890-022-02185-7>

LIAU, N. P. D. et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. **Nature Communications**, 9(1), 1558. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04013-1>

LILES, W. C.; DALE, D. C.; KLEBANOFF, S. J. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood**, 86(8), 3181–3188. 1995.

LILLEY, E. et al. ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. **British Journal of Pharmacology**, 177(16), 3611–3616. 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.15178>

LIU, B et al. Anti-IFN- γ therapy alleviates acute lung injury induced by severe influenza A (H1N1) pdm09 infection in mice. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi**, 54(3), 396–403. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.07.009>

LIU, J. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. **Journal of Translational Medicine**, 18(1), 206. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02374-0>

LOKAU, J et al. Tocilizumab does not block interleukin-6 (IL-6) signaling in murine cells. **PloS One**, 15(5), e0232612. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232612>

LUO, W.; LI, Y.-X.; JIANG, L.-J.; CHEN, Q.; WANG, T.; YE, D.-W. Targeting JAK-STAT Signaling to Control Cytokine Release Syndrome in COVID-19. **Trends in Pharmacological Sciences**, 41(8), 531–543. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.007>

MADAN, A. et al. Efficacy and Safety of Danirixin (GSK1325756) Co-administered With Standard-of-Care Antiviral (Oseltamivir): A Phase 2b, Global, Randomized Study of Adults Hospitalized With Influenza. **Open Forum Infectious Diseases**, 6(4), ofz163. 2019. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz163>

MADURKA, I. et al. DFV890: a new oral NLRP3 inhibitor-tested in an early phase 2a randomised clinical trial in patients with COVID-19 pneumonia and impaired

respiratory function. **Infection**, 1–14. 2022. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01904-w>

MAES, M. et al. In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: a nomothetic network approach. **Molecular Psychiatry**, 27(4), 1945–1955. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01431-4>

MARCONI, V. C. et al. Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 9(12), 1407–1418. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00331-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00331-3)

MART, M. F.; WARE, L. B. The long-lasting effects of the acute respiratory distress syndrome. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 14(6), 577–586. 2020. <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1743182>

MASLENNIKOV, R. et al. Interleukin 17 antagonist netakimab is effective and safe in the new coronavirus infection (COVID-19). **European Cytokine Network**, 32(1), 8–14. 2021. <https://doi.org/10.1684/ecn.2021.0463>

MATTHAY, M. A. et al. Phenotypes and personalized medicine in the acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Medicine**, 46(12), 2136–2152. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06296-9>

MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews. Disease Primers**, 5(1), 18. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>

MATTHAY, M. A.; MCAULEY, D. F.; WARE, L. B. Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 5(6), 524–534. 2017. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30188-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30188-1)

MATTHAY, M. A.; & WICK, K. D. Corticosteroids, COVID-19 pneumonia, and acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, 130(12), 6218–6221. 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI143331>

MATTOS, M. S. et al. CXCR1 and CXCR2 Inhibition by Ladarixin Improves Neutrophil-Dependent Airway Inflammation in Mice. **Frontiers in Immunology**, 11, 566953. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566953>

MATUTE-BELLO, G. et al. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. **Critical Care Medicine**, 28(1), 1–7. 2000. <https://doi.org/10.1097/00003246-200001000-00001>

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 295(3), L379–L399. 2008. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008>

MATUTE-BELLO, G. et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 44(5), 725–738. 2011. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0210ST>

MCAULEY, D. F. et al. Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, 371(18), 1695–1703. 2014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403285>

MCELVANEY, O. J.; CURLEY, G. F.; ROSE-JOHN, S.; MCELVANEY, N. G. Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. **The Lancet. Respiratory Medicine**, 9(6), 643–654. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00103-X)

MCKEE, C. M.; COLL, R. C. NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. **Journal of Leukocyte Biology**, 108(3), 937–952. 2020. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0720-513R>

MCNICHOLAS, B. A. et al. Demographics, management and outcome of females and males with acute respiratory distress syndrome in the LUNG SAFE prospective cohort study. **European Respiratory Journal**, 54(4), 1900609. 2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.00609-2019>

MEAGHER, L. C.; COUSIN, J. M.; SECKL, J. R.; HASLETT, C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 156(11), 4422–4428. 1996.

MEDURI, G. U. et al. Pharmacological principles guiding prolonged glucocorticoid treatment in ARDS. **Intensive Care Medicine**, 46(12), 2284–2296. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06289-8>

MEDURI, G. U.; KOHLER, G.; HEADLEY, S.; TOLLEY, E.; STENTZ, F.; POSTLETHWAITE, A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. **Chest**, 108(5), 1303–1314. 1995a. <https://doi.org/10.1378/chest.108.5.1303>

MEDURI, G. U. et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. **Chest**, 107(4), 1062–1073. 1995b. <https://doi.org/10.1378/chest.107.4.1062>

MENESES, G. et al. Recovery from an acute systemic and central LPS-inflammation challenge is affected by mouse sex and genetic background. **PLOS ONE**, 13(8), e0201375. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201375>

MENEZES, S. L. S. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **Journal of Applied Physiology**, 98(5), 1777–1783. 2005. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01182.2004>

MEYER, N. J.; GATTINONI, L.; CALFEE, C. S. Acute respiratory distress syndrome. **The Lancet**, 398(10300), 622–637. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00439-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00439-6)

MEYER, N. J. et al. Mortality Benefit of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist for Sepsis Varies by Initial Interleukin-1 Receptor Antagonist Plasma Concentration. **Critical Care Medicine**, 46(1), 21–28. 2018. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002749>

MEYER, L. K. et al. JAK/STAT pathway inhibition sensitizes CD8 T cells to dexamethasone-induced apoptosis in hyperinflammation. **Blood**, 136(6), 657–668. 2020. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006075>

MICHELUCCI, A. et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(19), 7820–7825. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218599110>

MILLS, E. L. et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. **Nature**, 556(7699), 113–117. 2018. <https://doi.org/10.1038/nature25986>

MIKACENIC, C.; HANSEN, E. E.; RADELLA, F.; GHARIB, S. A.; STAPLETON, R. D.; WURFEL, M. M. (2016). Interleukin-17A Is Associated With Alveolar Inflammation and Poor Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Critical Care Medicine**, 44(3), 496–502. 2016. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001409>

MOCK, J. R.; TUNE, M. K.; DIAL, C. F.; TORRES-CASTILLO, J.; HAGAN, R. S.; DOERSCHUK, C. M. Effects of IFN- γ on immune cell kinetics during the resolution of acute lung injury. **Physiological Reports**, 8(3), e14368. 2020. <https://doi.org/10.14814/phy2.14368>

MOOSAZADEH, M.; MOUSAVI, T. Combination therapy of tocilizumab and steroid for COVID-19 patients: A meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, 94(4), 1350–1356. 2022. <https://doi.org/10.1002/jmv.27489>

MORENO, G. et al. Corticosteroid treatment and mortality in mechanically ventilated COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients: a multicentre cohort study. **Annals of Intensive Care**, 11(1), 159. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00951-0>

MORIN, S. et al. Expanding access to biotherapeutics in low-income and middle-income countries through public health non-exclusive voluntary intellectual property licensing: considerations, requirements, and opportunities. **The Lancet Global Health**, 11(1), e145–e154. 2023. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00460-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00460-0)

MORRIS, D. R.; ANSAR, M.; IVANCIUC, T.; QU, Y.; CASOLA, A.; GAROFALO, R. P. Selective Blockade of TNFR1 Improves Clinical Disease and Bronchoconstriction in Experimental RSV Infection. **Viruses**, 12(10). 2020. <https://doi.org/10.3390/v12101176>

NAPIER, B. A. et al. Complement pathway amplifies caspase-11–dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. **Journal of Experimental Medicine**, 213(11), 2365–2382. 2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20160027>

NOVA, Z.; SKOVIEROVA, H.; CALKOVSKA, A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(4), 831. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20040831>

O'HALLORAN, J. et al. Infliximab for Treatment of Adults Hospitalized with Moderate or Severe Covid-19. **MedRxiv : The Preprint Server for Health Sciences**. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.09.22.22280245>

OHKARU, Y. et al. Acute and Subacute Effects of Dexamethasone on the Number of White Blood Cells in Rats. **Journal of Health Science**, 56(2), 215–220. 2010. <https://doi.org/10.1248/jhs.56.215>

OLIVAS-MARTÍNEZ, A. et al. In-hospital mortality from severe COVID-19 in a tertiary care center in Mexico City; causes of death, risk factors and the impact of hospital saturation. **PLOS ONE**, 16(2), e0245772. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245772>

OLONA, A.; LEISHMAN, S.; ANAND, P. K. The NLRP3 inflammasome: regulation by metabolic signals. **Trends in Immunology**, 43(12), 978–989. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.10.003>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **COVID-19 Strategic Preparedness and Response Plan**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WHE-2021.02>. Acesso em: 20/10/2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 13/09/2023.

OZAKI, K.; LEONARD, W. J. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(33), 29355–29358. 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200003200>

PANDEY, P. et al. Therapeutic Targeting of Inflammation and Virus Simultaneously Ameliorates Influenza Pneumonia and Protects from Morbidity and Mortality. **Viruses**, 15(2). 2023. <https://doi.org/10.3390/v15020318>

PAPAZIAN, L.; KLOMPAS, M.; LUYT, C.-E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. **Intensive Care Medicine**, 46(5), 888–906. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>

PARK, W. Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 164(10 Pt 1), 1896–1903. 2001. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104013>

PARRY, D. et al. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. **Molecular Cancer Therapeutics**, 9(8), 2344–2353. 2010. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0324>

PATEL, J. et al. A randomised trial of anti-GM-CSF otilimab in severe COVID-19 pneumonia (OSCAR). **The European Respiratory Journal**, 61(2). 2023. <https://doi.org/10.1183/13993003.01870-2021>

PENG, C. T.; LIN, H. C.; LIN, Y. J.; TSAI, C. H.; YEH, T. F. Early Dexamethasone Therapy and Blood Cell Count in Preterm Infants. **Pediatrics**, 104(3), 476–481. 1999. <https://doi.org/10.1542/peds.104.3.476>

PENG, X. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Contributes to Ventilator-induced Lung Injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 172(4), 470–479. 2005. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1547OC>

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, 18(7), e3000410. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

PHAM, T.; RUBENFELD, G. D. Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 195(7), 860–870. 2017. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1773CP>

PHILIPS, R. L. et al. The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do. **Cell**, 185(21), 3857–3876. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.023>

PIENKOS, S. M. et al. Effect of total cholesterol and statin therapy on mortality in ARDS patients: a secondary analysis of the SAILS and HARP-2 trials. **Critical Care (London, England)**, 27(1), 126. 2023. <https://doi.org/10.1186/s13054-023-04387-9>

POTERE, N. et al. Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: Pathogenetic and therapeutic implications. **EBioMedicine**, 85, 104299. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104299>

PROUDFOOT, A. et al. Novel anti-tumour necrosis factor receptor-1 (TNFR1) domain antibody prevents pulmonary inflammation in experimental acute lung injury. **Thorax**, 73(8), 723–730. 2018. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210305>

PULJIC, R. et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. **European Journal of Pharmacology**, 557(2–3), 230–235. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.023>

QIAO, Y. et al. Synergistic Activation of Inflammatory Cytokine Genes by Interferon- γ -Induced Chromatin Remodeling and Toll-like Receptor Signaling. **Immunity**, 39(3), 454–469. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.009>

QIU, J.-H. et al. Deficiency of IRG1/ itaconate aggravates endotoxemia-induced acute lung injury by inhibiting autophagy in mice. **Experimental Animals**, 72(2), 22–0104. 2023. <https://doi.org/10.1538/expanim.22-0104>

QIU, P.; CUI, X.; SUN, J.; WELSH, J.; NATANSON, C.; EICHACKER, P. Q. Antitumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials: a meta-analysis. **Critical Care Medicine**, 41(10), 2419–2429. 2013. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182982add>

RAGHAVENDRAN, K.; PRYHUBER, G. S.; CHESS, P. R.; DAVIDSON, B. A.; KNIGHT, P. R.; NOTTER, R. H. Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Current Medicinal Chemistry**, 15(19), 1911–1924. 2008. <https://doi.org/10.2174/092986708785132942>

RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. **Lancet (London, England)**, 400(10349), 359–368. 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01109-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01109-6)

RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. **Lancet (London, England)**, 397(10285), 1637–1645. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00676-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00676-0)

REDDY, M. P. et al. Respiratory system mechanics, gas exchange, and outcomes in mechanically ventilated patients with COVID-19-related acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Respiratory Medicine**, 10(12), 1178–1188. 2022. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00393-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00393-9)

RESENDE, G. G. et al. Blockade of interleukin seventeen (IL-17A) with secukinumab in hospitalized COVID-19 patients - the BISHOP study. **Infectious Diseases (London, England)**, 54(8), 591–599. 2022. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2066171>

REUTERSHAN, J. et al. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. **The Journal of Clinical Investigation**, 116(3), 695–702. 2006. <https://doi.org/10.1172/JCI27009>

REYNOLDS, C. J. et al. Lung Defense through IL-8 Carries a Cost of Chronic Lung Remodeling and Impaired Function. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 59(5), 557–571. 2018. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0007OC>

REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. (2017). Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Annals of Translational Medicine**, 5(14), 282–282. 2017. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.62>

RICHES, D. W. H.; MARTIN, T. R. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. **Methods in Molecular Biology**, pp. 17–30. 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8570-8_2

RITCHIE, N. D.; RITCHIE, R.; BAYES, H. K.; MITCHELL, T. J.; EVANS, T. J. IL-17 can be protective or deleterious in murine pneumococcal pneumonia. **PLoS Pathogens**, 14(5), e1007099. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007099>

RITTIRSCH, D. et al. Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide Is Independent of Complement Activation. **The Journal of Immunology**, 180(11), 7664–7672. 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7664>

RIVERS-AUTY, J.; BROUGH, D. Potassium efflux fires the canon: Potassium efflux as a common trigger for canonical and noncanonical NLRP3 pathways. **European Journal of Immunology**, 45(10), 2758–2761. 2015. <https://doi.org/10.1002/eji.201545958>

ROSE-JOHN, S.; WINTHROP, K.; CALABRESE, L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews. Rheumatology**, 13(7), 399–409. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.83>

RUBIN, R. Baricitinib Is First Approved COVID-19 Immunomodulatory Treatment. **JAMA**, 327(23), 2281. 2022. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.9846>

RUSSOTTO, V.; BELLANI, G.; FOTI, G. Respiratory mechanics in patients with acute respiratory distress syndrome. **Annals of Translational Medicine**, 6(19), 382–382. 2018. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.08.32>

SARMA, A. et al. Distinct respiratory tract biological pathways characterizing ARDS molecular phenotypes. **MedRxiv**, 2022.03.31.22272425. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.03.31.22272425>

SCHMIT, T. et al. Interferon- γ promotes monocyte-mediated lung injury during influenza infection. **Cell Reports**, 38(9), 110456. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110456>

SEFIK, E. et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. **Nature**, 606(7914), 585–593. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>

SELVARAJ, V. et al. (2022). Baricitinib in hospitalised patients with COVID-19: A meta-analysis of randomised controlled trials. **EClinicalMedicine**, 49, 101489. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101489>

SHAH, T. et al. Colchicine and high-intensity rosuvastatin in the treatment of non-critically ill patients hospitalised with COVID-19: a randomised clinical trial. **BMJ Open**, 13(2), e067910. 2023. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-067910>

SHAVER, C. M.; BASTARACHE, J. A. Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. **Clinics in Chest Medicine**, 35(4), 639–653. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.08.004>

SHI, J. et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, 514(7521), 187–192. 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13683>

- SHORT, K. R.; KROEZE, E. J. B. V.; FOUCHIER, R. A. M.; KUIKEN, T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Infectious Diseases**, 14(1), 57–69. 2014. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70286-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X)
- SILVA, L. A.; DE ANDRADE, J. B.; LOPES, W. A.; CARVALHO, L. S.; PEREIRA, P. A. P. (2017). Solubilidade e reatividade de gases. **Química Nova**. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170034>
- SILVERSIDES, J. A. et al. Conservative fluid management or deresuscitation for patients with sepsis or acute respiratory distress syndrome following the resuscitation phase of critical illness: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, 43(2), 155–170. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4573-3>
- SINGH, D. et al. A phase 2 multiple ascending dose study of the inhaled pan-JAK inhibitor nezulcitinib (TD-0903) in severe COVID-19. **The European Respiratory Journal**, 58(4). 2021. <https://doi.org/10.1183/13993003.00673-2021>
- SINHA, P. et al. Latent class analysis-derived subphenotypes are generalisable to observational cohorts of acute respiratory distress syndrome: a prospective study. **Thorax**, 77(1), 13–21. 2022. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217158>
- SINHA, P.; WARE, L. B. Selective tumour necrosis factor receptor-1 inhibition in acute lung injury: a new hope or a false dawn? **Thorax**, 73(8), 699–701. 2018. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211443>
- SINHA, P. et al. Latent Class Analysis Reveals COVID-19-related Acute Respiratory Distress Syndrome Subgroups with Differential Responses to Corticosteroids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 204(11), 1274–1285. 2021. <https://doi.org/10.1164/rccm.202105-1302OC>
- SONG, C. et al. Delayed neutrophil apoptosis may enhance NET formation in ARDS. **Respiratory Research**, 23(1), 155. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02065-y>
- SOUTHWORTH, T.; METRYKA, A.; LEA, S.; FARROW, S.; PLUMB, J.; SINGH, D. IFN- γ synergistically enhances LPS signalling in alveolar macrophages from COPD patients and controls by corticosteroid-resistant STAT1 activation. **British Journal of Pharmacology**, 166(7), 2070–2083. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01907.x>
- STAPLETON, R. D. et al. Bronchoalveolar fluid and plasma inflammatory biomarkers in contemporary ARDS patients. **Biomarkers**, 24(4), 352–359. 2019. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1581840>
- STEINBERG, K. P. et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, 354(16), 1671–1684. 2006. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051693>

SUBRAMANIAM, R. et al. Delivery of GM-CSF to Protect against Influenza Pneumonia. **PLoS One**, 10(4), e0124593. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124593>

SUBRAMANIAN, H.; HASHEM, T.; BAHAL, D.; KAMMALA, A. K.; THAXTON, K.; DAS, R. Ruxolitinib Ameliorates Airway Hyperresponsiveness and Lung Inflammation in a Corticosteroid-Resistant Murine Model of Severe Asthma. **Frontiers in Immunology**, 12, 786238. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.786238>

SUN, K.; SALMON, S.; YAJJALA, V. K.; BAUER, C.; METZGER, D. W. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) impairs viral clearance and exacerbates lung injury during influenza infection. **PLoS Pathogens**, 10(12), e1004560. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004560>

SUN, W.; SANDERSON, P. E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, 21(7), 1189–1195. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.015>

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, 18(3), 318–327. 2018. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

TAM, A.; BATES, J. H. T.; CHURG, A.; WRIGHT, J. L.; MAN, S. F. P.; SIN, D. D. Sex-Related Differences in Pulmonary Function following 6 Months of Cigarette Exposure: Implications for Sexual Dimorphism in Mild COPD. **PLOS ONE**, 11(10), e0164835. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164835>

TAN, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 5(1), 33. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>

TAVARES, L. P. et al. CXCR1/2 Antagonism Is Protective during Influenza and Post-Influenza Pneumococcal Infection. **Frontiers in Immunology**, 8, 1799. 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01799>

TEMESGEN, Z. et al. Lenzilumab in hospitalised patients with COVID-19 pneumonia (LIVE-AIR): a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, 10(3), 237–246. 2022a. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00494-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00494-X)

TEMESGEN, Z. et al. C reactive protein utilisation, a biomarker for early COVID-19 treatment, improves lenzilumab efficacy: results from the randomised phase 3 “LIVE-AIR” trial. **Thorax**, 78(6), 606-616. 2022b. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2022-218744>

TERZI, F.; DEMIRCI, B.; ÇINAR, İ.; ALHILAL, M.; EROL, H. S. Effects of tocilizumab and dexamethasone on the downregulation of proinflammatory cytokines and upregulation of antioxidants in the lungs in oleic acid-induced ARDS. **Respiratory Research**, 23(1), 249. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02172-w>

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, 377(6), 562–572. 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1608077>

TORBIC, H.; KRISHNAN, S.; HARNEGIE, M. P.; DUGGAL, A. Neuromuscular Blocking Agents for ARDS: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Respiratory Care**, 66(1), 120–128. 2021. <https://doi.org/10.4187/respcare.07849>

TZOTZOS, S. J.; FISCHER, B.; FISCHER, H.; ZEITLINGER, M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. **Critical Care**, 24(1), 516. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03240-7>

UEDA, O. et al. Novel genetically-humanized mouse model established to evaluate efficacy of therapeutic agents to human interleukin-6 receptor. **Scientific Reports**, 3, 1196. 2013. <https://doi.org/10.1038/srep01196>

VAN HOECKE, L.; JOB, E. R.; SAELENS, X.; ROOSE, K. Bronchoalveolar Lavage of Murine Lungs to Analyze Inflammatory Cell Infiltration. **Journal of Visualized Experiments**, 123. 2017. <https://doi.org/10.3791/55398>

VANOIRBEEK, J. A. J. et al. Noninvasive and Invasive Pulmonary Function in Mouse Models of Obstructive and Restrictive Respiratory Diseases. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 42(1), 96–104. 2010. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0487OC>

VERJANS, E. et al. Initiation of LPS-induced pulmonary dysfunction and its recovery occur independent of T cells. **BMC Pulmonary Medicine**, 18(1), 174. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0741-2>

VERJANS, E. et al. Overexpression of CREM α in T Cells Aggravates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, 191(3), 1316–1323. 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203147>

VERMA, A. K.; BAUER, C.; PALANI, S.; METZGER, D. W.; SUN, K. IFN- γ Drives TNF- α Hyperproduction and Lethal Lung Inflammation during Antibiotic Treatment of Postinfluenza Staphylococcus aureus Pneumonia. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 207(5), 1371–1376. 2021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100328>

VERMA, A. K. et al. IFN- γ transforms the transcriptomic landscape and triggers myeloid cell hyperresponsiveness to cause lethal lung injury. **Frontiers in Immunology**, 13, 1011132. 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011132>

VIGNON, P. et al. Fluid administration and monitoring in ARDS: which management? **Intensive Care Medicine**, 46(12), 2252–2264. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06310-0>

VOIRIOT, G. et al. Interleukin-6 displays lung anti-inflammatory properties and exerts protective hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. **Respiratory Research**, 18(1), 64. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0553-6>

WAKAYAMA, T.; SOHMIYA, M.; FURUYA, H.; MURAKAMI, Y.; KATO, Y. Increased Serum Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Levels Following Intravenous Infusion of High-Dose Methylprednisolone. **Endocrine Journal**, 43(1), 67–72. 1996. <https://doi.org/10.1507/endocrj.43.67>

WANG, J.; YANG, X.; LI, Y.; HUANG, J.-A.; JIANG, J.; SU, N. Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. **Virology Journal**, 18(1), 117. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01588-y>

WANG, L.; TANEJA, R.; RAZAVI, H. M.; LAW, C.; GILLIS, C.; MEHTA, S. Specific Role of Neutrophil Inducible Nitric Oxide Synthase in Murine Sepsis-Induced Lung Injury In Vivo. **Shock**, 37(5), 539–547. 2012. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824dcb5a>

WANG, X.; CHEN, S.; ZHAO, L.; SHI, X. Protective effect of combination of anakinra and MCC950 against acute lung injury is achieved through suppression of the NF- κ B-mediated-MAPK and NLRP3-caspase pathways. **International Immunopharmacology**, 97, 107506. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107506>

WANG, H. et al. Blocking the human common beta subunit of the GM-CSF, IL-5 and IL-3 receptors markedly reduces hyperinflammation in ARDS models. **Cell Death & Disease**, 13(2), 137. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04589-z>

WICK, K. D. et al. Promises and challenges of personalized medicine to guide ARDS therapy. **Critical Care (London, England)**, 25(1), 404. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03822-z>

WINKLER, E. S. et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. **Nature Immunology**, 21(11), 1327–1335. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>

WU, R. et al. Aconitate decarboxylase 1 is a mediator of polymicrobial sepsis. **Science Translational Medicine**, 14(659). 2022. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo2028>

XI, A.-R.; LUO, Y.-J.; GUAN, J.-T.; WANG, W.-J.; XU, Z.-H. Efficacy and safety of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) antibodies in COVID-19 patients: a meta-analysis. **Inflammopharmacology**, 31(1), 275–285. 2023. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01105-9>

XU, W. et al. Nogo-B protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Scientific Reports**, 5(1), 12061. 2015. <https://doi.org/10.1038/srep12061>

YANG, Y. et al. The pharmacological efficacy of the anti-IL17 scFv and sTNFR1 bispecific fusion protein in inflammation mouse stimulated by LPS. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, 92, 905–912. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.147>

YE, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **The Journal of Experimental Medicine**, 194(4), 519–527. 2001. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.519>

YU, S.-Y. et al. Clinical efficacy and safety of interleukin-6 receptor antagonists (tocilizumab and sarilumab) in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Emerging Microbes & Infections**, 11(1), 1154–1165. 2022. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2059405>

ZAMYATINA, A.; HEINE, H. Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways. **Frontiers in Immunology**, 11. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585146>

ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. **British Journal of Pharmacology**, 155(3), 357–364. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.270>

ZENG, J. et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. **EBioMedicine**, 75, 103803. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103803>

ZHANG, W.; WANG, Y.; LI, W.; WANG, G. The Association Between the Baseline and the Change in Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Short-Term Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. **Frontiers in Medicine**, 8. 2021a. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.636869>

ZHANG, F. et al. IFN- γ and TNF- α drive a CXCL10⁺ CCL2⁺ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation. **Genome Medicine**, 13(1), 64. 2021b. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00881-3>

ZHU, W.; ZHANG, Y.; WANG, Y. Immunotherapy strategies and prospects for acute lung injury: Focus on immune cells and cytokines. **Frontiers in Pharmacology**, 13. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1103309>

ANEXO A – Análise secundária e individual das monoterapias com anti-TNF, anti-IFN- γ , dinaciclib e MCC950 em parâmetros da LPA induzida por LPS

	LPS + anti-TNF				
	Peso corporal (dia 3)	log10 [células totais]	PMN (%)	log10 [proteína em $\mu\text{g/ml}$]	Linfócitos no sangue (%)
"Sham" vs. "LPS + anti-TNF"	p = 0,0003 ***	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p = 0,003 **
"LPS + controle isotópico" vs. "LPS + anti-TNF"	p = 0,1105	p = 0,3727	p = 0,0164 *	p = 0,0014 **	p = 0,3061
	LPS + anti-IFN- γ				
	Peso corporal (dia 3)	log10 [células totais]	PMN (%)	log10 [proteína em $\mu\text{g/ml}$]	Linfócitos no sangue (%)
"Sham" vs. "LPS + anti-IFN- γ "	p = 0,0081 **	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p = 0,0318 *
"LPS + controle isotópico" vs. "LPS + anti-IFN- γ "	p = 0,0415 *	p = 0,9996	p = 0,0139 *	p = 0,3752	p = 0,1289
	LPS + dinaciclib				
	Peso corporal (dia 3)	log10 [células totais]	PMN (%)	log10 [proteína em $\mu\text{g/ml}$]	Linfócitos no sangue (%)
"Sham" vs. "LPS + dinaciclib"	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p = 0,0073 **	p < 0,0001 ****
"LPS + veículo" vs. "LPS + dinaciclib"	p = 0,0528	p < 0,0001 ****	p = 0,0004 ***	p = 0,0573	p = 0,0390 *
	LPS + MCC950				
	Peso corporal (dia 3)	log10 [células totais]	PMN (%)	log10 [proteína em $\mu\text{g/ml}$]	Linfócitos no sangue (%)
"Sham" vs. "LPS + MCC950"	p = 0,0005 ***	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p = 0,0082 **	p < 0,0001 ****
"LPS + veículo" vs. "LPS + MCC950"	p = 0,0032 **	p < 0,0001 ****	p < 0,0001 ****	p = 0,0179 *	p = 0,0624
Negrito: efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$)					
Negrito e vermelho: efeito estatisticamente significativo que é observado na análise secundária e individual da monoterapia, mas não quando todos os grupos são considerados (análise primária)					
ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey					