UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Maíra Nilson Benatti

Lesão do glicocálix endotelial na Síndrome do Desconforto Respiratório
Agudo após síndrome gripal

Ribeirão Preto
2020

MAÍRA NILSON BENATTI

**Lesão do glicocálix endotelial na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo após
síndrome gripal**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda

Ribeirão Preto - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Benatti, Maíra Nilson

Lesão do glicocálix endotelial na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo após síndrome gripal / Maíra Nilson Benatti; Orientador: Carlos Henrique Miranda. Ribeirão Preto, 2020.

155 p.:il.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. Glicocálix endotelial; 2. Vírus influenza A(H1N1); 3. Infecção por vírus respiratório; 4. Gripe; 5. Síndrome do desconforto respiratório agudo; 6. Barreira alvéolo-capilar; 7. Hialurano

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maíra Nilson Benatti

Título: Lesão do glicocálix endotelial na síndrome do desconforto respiratório agudo após síndrome gripal

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda

Instituição: Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Rosa de Fátima Nilson Benatti, ao meu amado pai Jamir Benatti e à minha tão saudosa avó Teddy Nilson, *in memoriam*, pelo amor incondicional, pelo incentivo indelével e pelo exemplo notório do que é ser pessoa de bem. Vocês iluminam meu caminho, à cada passo!

Ao meu companheiro de vida, meu amigo, meu amor, Laerte Leão Emrich Filho, que me encoraja e me fortalece.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda, que com sua visão científica e dedicação ao cuidado com pacientes, é uma grande inspiração de médico pesquisador.

Aos pacientes, que me ensinam lições maiores que qualquer escola e são o motivo dos nossos estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu querido irmão, Danilo Nilson Benatti e minha querida cunhada Vanessa de Oliveira Benatti, que são exemplos de perseverança e sucesso.

À minha família de Londrina, especialmente à minha sogra Vera Lúcia Emrich, que me oferece amor como se eu fosse sua filha e me ensina sobre a diligência e o cultivo de laços familiares tão fundamentais.

À Unidade de Emergência, que foi uma segunda casa, onde aprendo muito mais que ensino e me deu oportunidades ímpares, em especial, de conhecer pessoas maravilhosas que marcaram minha vida.

AGRADECIMENTOS

“Quem quer dizer o que sente

Não sabe o que há de dizer.

Fala: parece que mente...

Cala: parece esquecer...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda, por me oferecer as oportunidades e o estímulo para que eu pudesse me dedicar ao estudo fascinante da microcirculação. Graças ao seu apoio, pude desfrutar de experiências decisivas que me impulsionaram muito no âmbito acadêmico, profissional e pessoal. Minha admiração e gratidão são imensas.

Ao Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges, pelo incentivo desde os tempos da Residência, por todos os desafios oferecidos, por abrir as portas do seu Laboratório e por poder contar com opiniões sempre muito interessantes.

Ao Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro, pelo apoio, pelo entusiasmo científico e pela disponibilidade em discutir casos, despertando ainda mais meu interesse em aprofundar nos estudos das patologias pulmonares.

Ao Prof. Dr. Benedito Fonseca e Prof. Dr. Marcelo Bezerra de Menezes pelas conversas sempre alegres, pelas críticas fundamentais e sugestões importantíssimas que me deram na fase de finalização desse trabalho.

Ao meu amor, Laerte Leão Emrich Filho, que me faz pensar nos pontos importantes de cada situação, que suaviza meus dias com sua alegria, que me apoia nos momentos difíceis e que me ensina as nuances do amar.

À Ana Paula de Carvalho, pela amizade, pelo convívio na bancada e por tudo o que me ensinou sobre o universo do Laboratório, pessoa que tive a sorte de esbarrar pelos corredores da vida e encontrar uma amiga tão especial.

Ao Carlos Eduardo Lopes Almado e Mateus de Campos Renno, amigos muito estimados, que com suas perspicácia e espirtuosidade raras, sempre me dão dicas fundamentais, de pratos de comida à execução de gráficos e tabelas.

Aos amigos que compartilharam comigo muito mais que plantões na Unidade de Emergência, por tudo o que me ensinaram e me apoiaram nessa jornada, Abel Araújo, Alexandre Figueiredo, Alisson Valadão, Aron Ferreira, Carlos Kameki, Caroline Sugahara, Daniel

Zoppi, Eurides Leite, Fernando Ribeiro, Gustavo Volpe, Leonardo Zancaner, Luis Galli, Nathalia Monteiro, Pablo Tarram, Patrícia Nunes, Pedro Leme, Tássia Janssen, Valéria Aquino e Viviane Ono, sinto-me imensamente honrada em ter feito parte desse grupo.

Aos funcionários da Unidade de Emergência, pela amizade, pela parceria, pela compreensão, por compartilhar tensões nos plantões e sempre poder contar com o carinho e os abraços, Adriana, Alessandra, Aline, Ana Paula, Cássia, Conceição, Dayana, Déo, Flábia, Gabi, Jôsi, Marcela, Paola, Tania e a tantos outros, à toda equipe da UE se abrange minha gratidão.

À equipe da UBD-Vila Virgínia, em especial Denise do Nascimento, Patrícia Amadio e Edileuza, cuja ajuda, receptividade e companhia foram essenciais para esse trabalho.

A todos os pacientes que participaram desse estudo e a todos que, por situações diversas, encontraram-se internados na UE e cruzaram suas vidas com a minha. Que a construção de evidências ajude na tomada das decisões mais acertadas e cheguem à beira do leito, de forma clara e compartilhada.

À Milena Canto Sae, minha grande amiga, pelo carinho, pelas tentativas de corridas e pelos sempre maravilhosos reencontros, que são, para mim, como um farol luminoso para o retorno às coisas essenciais.

Às amadas amigas Clarice Zórnio, Jessica Roberts e Juliana Spite, por me compreenderem e por me criticarem e mostrar o significado da palavra união.

Às queridas Andreia Nishiyama e Isabela Vitoriano, amigas muito estimadas, agradeço o incentivo, as conversas, a paciência e o estímulo em me animar quando mais precisava.

À Vanessa Fonseca, Camila Guimarães, Camila Sandy, Thamires Milani, por me ajudarem e torcerem por mim, a cada tentativa de experimento e publicação.

À Josiane Fernandes e Simone Potje, que tive a alegria de conhecer no Laboratório da Profa. Dra. Rita Tostes, exemplo de mulheres que fazem ciência e se tornaram uma inspiração, trazendo entusiasmo novo aos meus estudos.

À Ana Maria Emrich dos Santos, que chamo de Aninha, mas é um referencial enorme em tantas esferas, de médica amável, estudante incessante e companhia sempre agradável, que através dela, conheci Daniel José, Gabriel e Isadora, que hoje são tão especiais e amo tanto.

Aos amigos muito especiais de Londrina-PR, terra saudosa que me acolheu e se tornou meu lar por 8 anos, cidade em que concluí minha graduação e me apresentou pessoas incríveis, à quem meu carinho e admiração só crescem, Ricardo Furlan, Máyla Furlan e Liliam Liang.

Aos meus grandes e amados mestres, Prof. Dr. Carlos Muraro e Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia, *in memoriam*, que me ensinaram, com a força do exemplo esplendoroso, aspectos primordiais da arte da medicina.

À Moema, minha antiga professora de redação, e hoje, uma amiga tão especial, cuja fala sempre coerente me toca e impulsiona, desde sempre, quebrando fronteiras e ampliando horizontes.

Ao meu antigo e muito querido técnico de Saltos Ornamentais, Paladino (Edson Fernando Luz), que me ensinou sobre a importância da seriedade e do treinamento, e da necessidade de saltar, mesmo que não se sinta pronto.

Ao Belchior, meu cachorro (risos), que chegou a tempo de comemorar o 85º aniversário da minha amada avó e é, como ela me dizia, um anjinho peludo.

À Alexandra Elbakyan, fundadora do projeto sci-hub, que abriu as portas da ciência e permitiu que eu pudesse ler todos os artigos que precisava.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de maneira direta e indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Tuas forças naturais, as que estão dentro de ti, serão as que vão curar tuas doenças.”

Hipócrates

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. antes de Cristo

et. al. e outros

LISTA DE SÍMBOLOS

nm nanômetros

mmHg milímetros de mercúrio

cmH₂O centímetros de água

mm micrômetros

kDa quilodaltons

LISTA DE SIGLAS

rt-PCR Reação em cadeia de polimerase em tempo real

FDA Food and Drug Association

EUA Estados Unidos da América

PAC Pneumonia Adquirida na Comunidade

CTI Centro de Terapia Intensiva

SARS-CoV Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus

MERS-CoV Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus

SDRA Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

DAD Dano Alveolar Difuso

PEEP Positive End Respiratory Pressure

AECC American European Consensus Conference

ATS American Thorax Society

ESICM European Society of Intensive Care Medicine

PaO₂ pressão arterial de oxigênio

FiO₂ fração inspirada de oxigênio

JAMA Journal of the American Medical Association

LUNG SAFE Large observational study to Understand Global impact of Severe Acute respiratory Failure

TNF α fator de necrose tumoral alfa

IL 1 β interleucina 1 beta
IL-6 interleucina 6
IL-8 interleucina 8
CCL2 quimiocina 2
CCL7 quimiocina 7
NET neutrophil extracellular trap
MMP metaloproteinase
VE-caderina caderina vascular endotelial
ENaC canal de sódio epitelial
TRALI transfusion associated acute lung injury
SP-B proteína B do surfactante
SP-D proteína D do surfactante
CC-16 proteína 16 da célula de clara
KL-16 Krebs von den Lungen-16
RAGE receptor dos produtos finais da glicosilação avançada
ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1
GAGs glicosaminoglicanos
VCAM-1 molécula de adesão celular vascular-1
PECAM-1 molécula de adesão celular endotelial plaquetária
CD44 glicoproteína de superfície celular 44
NO óxido nítrico
LPS lipopolissacarídeo
RNA ácido ribonucleico

TABELAS

Tabela 1. Características demográficas dos três grupos estudados

Tabela 2. Comorbidades e fatores de risco para evolução grave nos pacientes com síndrome gripal divididos com e sem apresentação da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Tabela 3. Características clínicas, laboratoriais e relacionadas a internação hospitalar dos pacientes com síndrome gripal incluídos nesta investigação divididos com e sem síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

Tabela 4. Parâmetros clínicos, ventilatórios e prognósticos do grupo com SDRA

Tabela 5. Dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias nos três grupos investigados.

Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias entre os pacientes com rt-PCR positivo para Influenza A H1N1 pdm09

Tabela 7. Comparação dos níveis plasmáticos dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias entre sobreviventes e não sobreviventes do grupo síndrome gripal com SDRA

Tabela 8. Desempenho diagnóstico dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial para identificação dos pacientes que desenvolvem síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) após um episódio de síndrome gripal.

FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do glicocálix endotelial mostrado em perspectivas microscópica e molecular, fazendo a interface entre a parede vascular e o sangue circulante. Adaptado de referência 47 e 48.

Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica de capilar miocárdico de ratos, à direita com glicocálix endotelial íntegro, e à esquerda, após o tratamento com hialuronidase, com degradação da sua estrutura e edema pericapilar associado. Figura obtida de referência 57.

Figura 3. Estrutura do vírus Influenza A, formado por hemaglutinina (HÁ), neuraminidase (NA) e proteínas da matrix 1 (M1), que compõe a superfície viral, as proteínas da matrix 2 (M2), que são canais iônicos que reduzem o pH do endossomo da célula hospedeira e liberam o vírus para o citosol, além das nucleoproteína (NP), as proteínas não-estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2), envolvidas na evasão imune, e as polimerases ácida (PA), básica 1 (PB1) e básica 2 (PB2), que parecem induzir morte celular. Adaptado de referências 81 e 82.

Figura 4. Gráfico mostrando a distribuição da faixa etária dos casos fatais da pandemia de 1918, acometendo uma parcela desproporcionalmente grande de adultos entre 25 e 45 anos, quando comparada a influenza sazonal nos anos subsequentes. Adaptado

Figura 5. Fluxograma de inclusão dos pacientes e divisão dos mesmos nos grupos relacionados nesta investigação.

Figura 6. Presença de fator de risco no grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e síndrome gripal sem SDRA.

Figura 7. Linha do tempo mostrando a evolução desde o início dos sintomas gripais dos pacientes com teste laboratorial positivo para Influenza A

Figura 8. Gráfico do tipo box-plot mostrando os níveis plasmáticos do hialurano (ng/ml) nos três grupos de estudo: síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome gripal sem SDRA e controle.

Figura 9. Gráfico de barras mostrando os níveis plasmáticos de hialurano (ng/ml) de acordo com a duração em dias do sintoma de dispneia no momento da admissão hospitalar, em sobreviventes e não-

sobreviventes do grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo. As dosagens foram realizadas na admissão e relacionadas ao tempo em dias da queixa de dispneia.

Figura 10. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) comparando a acurácia diagnóstica dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial (hialurano, sindecano-1 e trombomodulina) na identificação dos pacientes que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) entre aqueles com síndrome gripal.

Figura 11. Gráfico do tipo box-plot mostrando os níveis plasmáticos da trombomodulina (pg/ml) nos três níveis de gravidade no grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo: leve, moderado e grave, de acordo com a definição de Berlim.

Figura 12. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os níveis plasmáticos de sindecano-1 (log10 ng/ml) e da citocina inflamatória fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α , log10 pg/ml).

Figura 13. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os níveis plasmáticos de sindecano-1 (log10 ng/ml) e da citocina inflamatória interleucina-seis (IL-6, log10 pg/ml).

Figura 14. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os níveis plasmáticos de hialurano (log10 ng/ml) e imunoglobulina G (IgG- log10 UI/ml) anti-influenza A

Figura 15. Mulher, 34 anos, sobrepeso (IMC: 29 Kg/m²). História de febre, mialgia, artralgia e odinofagia. No quarto dia evoluiu com dispneia com piora progressiva com necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica, relação PO₂/FIO₂: 65. Evolui com hipoxemia refratária e óbito após um dia de admissão hospitalar (5 dias de sintomas). Foi confirmado H1N1 pdm09 na imunohistoquímica do tecido pulmonar. As dosagens dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial na admissão foram: sindecano-1 de 39 ng/ml, trombomodulina de 894 pg/ml e hialurano de 90 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateral (painel A). A histopatologia mostra pneumonite aguda com edema intersticial com exsudato neutrofílico (painel B) e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 16. Homem, 53 anos, com antecedente de etilismo e tabagismo. História de febre, mialgia, tosse e rinorréia. No sexto dia de evolução, evoluiu com dispneia, insuficiência respiratória com necessidade de intubação e ventilação mecânica, com relação PO₂/FIO₂ de 85. Evolui com hipoxemia refratária e choque circulatório e óbito após dois dias de hospitalização (8 dias de sintomas). Foi confirmado o H1N1 pdm09 na RT-PCR das secreções respiratórias. A dosagem dos marcadores de

lesão do glicocálix mostrou: sindecano-1 de 18 ng/ml, trombomodulina de 1016 pg/ml e hialurano de 20 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateral (painel A). A histopatologia mostra pneumonite aguda com edema intersticial e exsudato neutrofilico (painel B) e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 17. Mulher, 37 anos, obesa (IMC: 31Kg/m²), sem outras comorbidades. História de febre, mialgia, cefaleia há 4 dias da admissão evoluiu com síndrome do desconforto respiratório agudo (relação PO₂/FIO₂: 57). Foi confirmado H1N1 pdm09 através de RT-PCR de swab da secreção de vias aéreas. Evoluiu com hipoxemia refratária mesmo com FIO₂ de 100% e PEEP elevada: 18 cmH₂O. Foi a óbito após 5 dias da admissão (nove dias do início) dos sintomas. A dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix na admissão foram: sindecano-1: 24 ng/ml; trombomodulina 1262 pg/ml e hialurano: 32 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostrada infiltrado pulmonar difuso bilateralmente (painel A). Na histopatologia foi observada pneumonite aguda com edema intersticial (painel B), hemorragia alveolar e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 18. Mulher, 55 anos, obesa (IMC: 35Kg/m²), hipertensa e diabética. História de febre, tosse, prostração, mialgia e odionofagia. Foi admitida com 6 dias de evolução em insuficiência respiratória com necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica com relação PO₂/FIO₂ de 110). Foi confirmado H1N1 pdm09 através do RT-PCR das secreções da vias aéreas. Evoluiu com hipoxemia refratária e choque circulatório com óbito após nove dias da admissão (15 dias de sintomas). Dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial com sindecano-1 de 256 ng/ml, trombomodulina de 2674 pg/ml e hialurano de 27 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateralmente (painel A). Na histopatologia foi observado quadro de pneumonite aguda com intenso edema e hemorragia alveolar (painel B) com formação de membrana hialina e pneumonia organizante fibrinóide (painel C).

Figura 19. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre o perímetro da membrana hialina dividida pelo perímetro determinado pelos septos alveolares com os níveis plasmáticos de trombomodulina (pg/ml) nos quatro pacientes com síndrome gripal e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) que evoluíram a óbito e foram submetidos a necropsia. O painel A (hematoxilina-eosina) mostra uma membrana hialina preenchendo todo o espaço alveolar (400x) e o painel B (hematoxilina-eosina) mostra uma membrana hialina com menor dimensão em relação ao espaço alveolar (400x).

Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre o número de neutrófilos no septo alveolar definido pelo número de neutrófilos dividido pelo perímetro do septo alveolar com os níveis plasmáticos de hialurano (log 10 ng/ml) nos quatro pacientes com síndrome gripal e síndrome do

desconforto respiratório agudo (SDRA) que evoluíram a óbito e foram submetidos a necropsia. O painel A mostra um septo alveolar (400x) com um número elevado de neutrófilos no seu interior e o painel B mostra um septo alveolar (400x) com número reduzido destas células.

Figura 21. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) comparando a acurácia prognóstica dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial (hialurano, sindecano-1 e trombomodulina) na determinação da mortalidade em 28 dias em pacientes com síndrome

Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida em 28 dias em todos os pacientes com síndrome gripal (n=66 pacientes). A dosagem de hialurano > 19 ng/ml foi associada a um aumento significativo da mortalidade: risco relativo (RR): 6,95, intervalo de confiança de 95% (IC95%): 1,88-25,67, p=0,0017.

Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida em 28 dias no grupo de pacientes com síndrome gripal que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (n=30 pacientes). A dosagem de hialurano > 70 ng/ml foi associada há um aumento significativo da mortalidade: risco relativo (RR): 7,0, intervalo de confiança de 95% (IC95%): 2-23, p=0,0023.

RESUMO

BENATTI, M.N. **Lesão do glicocálix endotelial na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo após síndrome gripal.** 2020. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Introdução: Os vírus respiratórios são endêmicos no mundo e, geralmente, causam doença benigna e autolimitada. Ocasionalmente, eles podem atingir a via aérea inferior, principalmente o vírus influenza, e desencadear um quadro grave de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) que apresenta alta mortalidade. O glicocálix endotelial é uma camada gelatinosa rica em carboidratos que reveste os vasos internamente. A lesão desta estrutura está associada a um aumento da permeabilidade vascular, aumento da adesão e migração de neutrófilos para fora do vaso, adesão e agregação plaquetária, etc. Estes processos fisiopatológicos são fundamentais na instalação da SDRA. Alguns estudos mostram a lesão do glicocálix endotelial na fase inicial da SDRA após sepse bacteriana, contudo nenhuma investigação avaliou a participação desta estrutura na SDRA desencadada após infecções virais. O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de lesão do glicocálix endotelial nos pacientes que desenvolvem SDRA após uma síndrome gripal.

Métodos: Pacientes com diagnóstico de síndrome gripal durante um surto epidêmico de influenza A H1N1pdm09 foram divididos em dois grupos: pacientes com e sem SDRA. Um grupo de indivíduos saudáveis foi incluído para comparação no grupo controle. Durante a primeira avaliação médica, os níveis de hialurânio, trombomodulina, síndecano-1, TNF- α , IL-6, IL-1 β foram dosados. Nos pacientes que evoluíram a óbito e foram submetidos a necropsia foi realizada a avaliação histométrica do perímetro da membrana hialina e do número de neutrófilos infiltrados no septo alveolar.

Resultados: Dos 101 indivíduos, o grupo com SDRA contou com 30 pacientes (44 ± 16 anos, 57% homens), o grupo sem SDRA com 36 pacientes (39 ± 17 anos, 42% homens) e o grupo controle foi composto por 35 indivíduos (44 ± 9 anos, 51% homens). Os níveis de hialurânio foram significativamente maiores no primeiro grupo [31ng / ml (12-56)] que nos outros dois grupos [5ng / ml (3-10)] e [5ng / ml (2-8)]; $p < 0,0001$. Os níveis de trombomodulina foram mais elevados no grupo com síndrome gripal, com SDRA [1411pg/ml (878-2237)] e sem SDRA [1390pg/ml (21-1746)], em comparação com o controle [219 pg/ml (21-601)], $p < 0,0001$. Os níveis de síndecano-1 foram mais elevados no grupo com SDRA [28ng/ml (24-57)] em comparação ao grupo sem SDRA [24 ng/ml (24-25)], $p = 0,009$. Não foram

observadas diferenças entre os níveis de citocinas entre os grupos ($p>0,05$). A dosagem de hialurano >19 ng/ml foi associada a um aumento significativo da mortalidade em 28 dias: risco relativo (RR): 6,95, intervalo de confiança de 95% (IC95%): 1,88-25,67, $p=0,0017$ nos pacientes com síndrome gripal. Observou-se uma correlação positiva entre o perímetro da membrana hialina e o níveis plasmáticos de trombomodulina ($\rho=0,89$; $p=0,05$) e entre o número de neutrófilos no septo alveolar e os níveis plasmáticos de hialurano ($\rho=0,89$; $p=0,05$).

Conclusão: Mostramos evidências da participação da lesão do glicocálix endotelial no processo de instalação da SDRA após síndrome gripal.

Palavras-chave: glicocálix endotelial; vírus influenza A(H1N1); infecção por vírus respiratório; gripe; síndrome do desconforto respiratório agudo, barreira alvéolo-capilar; hialurano

ABSTRACT

BENATTI, M.N. **Endothelial glycocalyx injury in acute respiratory distress syndrome after flu-like syndrome.** 2020. 97f. Doctoral Thesis - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Introduction: Respiratory viruses are endemic worldwide and usually cause benign and self-limiting disease. Occasionally, they can reach the lower airway, especially the influenza virus, and trigger a severe case of acute respiratory distress syndrome (ARDS) with high mortality. Endothelial glycocalyx is a carbohydrate-rich gelatinous layer that lines the vessels internally. Injury to this structure is associated with increased vascular permeability, increased adhesion and neutrophil migration out of the vessel, adhesion and platelet aggregation, etc. These pathophysiological processes are fundamental in the installation of ARDS. Some studies show endothelial glycocalyx injury in the early phase of ARDS following bacterial sepsis, but no investigation has evaluated the involvement of this structure in ARDS triggered after viral infections. The aim of this study was to investigate the occurrence of endothelial glycocalyx injury in patients who develop ARDS following a flu syndrome.

Methods: Patients diagnosed with flu syndrome during an outbreak of influenza A H1N1pdm09 were divided into two groups: patients with and without ARDS. A group of healthy subjects was included for comparison in the control group. During the first medical evaluation, the levels of hyaluronan, thrombomodulin, syndecan-1, TNF- α , IL-6, IL-1 β were measured. In patients who died and underwent necropsy, histometric evaluation of the perimeter of the hyaline membrane and the number of neutrophils infiltrated in the alveolar septum was performed.

Results: Of the 101 subjects, the ARDS group had 30 patients (44 ± 16 years, 57% men), the non-ARDS group with 36 patients (39 ± 17 years, 42% men) and the control group consisted of 35 patients. individuals (44 ± 9 years, 51% men). Hyaluronan levels were significantly higher in the first group [31ng / ml (12-56)] than in the other two groups [5ng / ml (3-10)] and [5ng / ml (2-8)]; $p < 0.0001$. Thrombomodulin levels were higher in the flu syndrome group, with ARDS [1411pg / ml (878-2237)] and without ARDS [1390pg / ml (21-1746)] compared to the control [219 pg / ml (21 -601)], $p < 0.0001$ Syndecan-1 levels were higher in the ARDS group [28ng / ml (24-57)] compared to the non-ARDS group [24 ng / ml (24-25)], $p = 0.009$ No differences were observed between cytokine levels between groups ($p > 0.05$) Hyaluronan dosage > 19 ng / ml was associated with a significant increase in 28-day mortality: relative risk (RR): 6.95, 95% confidence interval (95% CI): 1.88-25.67, $p = 0.0017$ in patients with

flu-syndrome. A positive correlation between hyaline membrane perimeter and o thrombomodulin plasma levels ($\rho = 0.89$; $p = 0.05$) and between the number of neutrophils in the alveolar septum and hyalurane plasma levels ($\rho = 0.89$; $p = 0.05$) were observed.

Conclusion: We show evidence of the involvement of endothelial glycocalyx injury in the ARDS installation process after flu syndrome.

Keywords: endothelial glycocalyx; influenza A(H1N1) virus; respiratory virus infection, flu, acute respiratory distress syndrome, alveolar-capillary barrier, hyaluronan

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	25
1.1. A gripe e as infecções por vírus respiratórios: um breve histórico.....	26
1.2. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).....	28
1.3. A barreira alvéolo-capilar.....	34
1.4. O glicocálix endotelial pulmonar como chave na barreira alvéolo-capilar.....	36
1.5. O vírus Influenza.....	41
2. Objetivos.....	46
3. Métodos.....	48
4. Resultados.....	57
5. Discussão.....	100
6. Conclusão.....	121
7. Referências Bibliográficas.....	124
8. Anexos.....	146
A- Aprovação Comitê de Ética do HC-FMRP-USP.....	147
B - Ficha Síndrome Gripal com SDRA.....	148
C - Ficha Síndrome Gripal sem SDRA.....	149
D - Ficha Indivíduos saudáveis Controles.....	150
Apresentação em congresso.....	151
Prêmio de melhor trabalho oral de 3 Congresso Clínica Médica.....	152
9. Apêndices.....	151
A – TCLE para Avaliação da Lesão do Glicocálix Endotelial na SDRA.....	152
B – TCLE para Biorrepositório.....	154

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A gripe e as infecções por vírus respiratórios: um breve histórico

A gripe e as infecções por vírus respiratórios são velhas conhecidas do homem e circulam há milênios de maneira endêmica em todo o mundo. (1) Ocasionalmente, causam surtos epidêmicos, de periodicidade e gravidade imprevisíveis. Hipócrates de Cós (460-370 a.C.), médico grego que marcou a história da Medicina pelo seu método investigativo, em 412 a.C., descreveu um surto de “infecção catarral” em soldados no norte da Grécia. Há relatos de que, na América, os astecas também passaram por uma epidemia, por volta de 1450, de “catarro pestilencial”, com grande número de vítimas. (2,3)

O termo “gripe” tem origem francesa e significa “desafeição passageira” (4), revelando a forma clássica da doença, caracterizada por sintomas de caráter agudo e autolimitado, de febre, associada à tosse, rinorréia, mal-estar, cefaléia e mialgia, entre outros sintomas sistêmicos, como perda de apetite. A identificação do causador da gripe, o vírus influenza, só foi possível após o desenvolvimento da microscopia eletrônica, capaz de identificar as partículas virais de 100 nm, por estudos de 1933 de Wilson Smith, Christopher Andrews e Patrick Laidlaw. (5)

O material genético simples e a alta capacidade de mutação destes vírus, associada à circulação em diversas espécies, principalmente, em aves e mamíferos, contribuem para o risco potencial de mutação altamente virulenta para a espécie humana. Atualmente, mais de 20 subtipos de vírus já foram descritos como agentes causadores de infecção respiratória aguda, com potencial de evolução para quadros pulmonares graves (6), sendo o vírus influenza o mais relevante e principal causador de falência respiratória em pacientes com infecções virais. (1,7)

Desde a aprovação do uso de testes moleculares para detecção simultânea de vários vírus, a Reação em Cadeia de Polimerase por transcrição reversa em tempo real (rt-PCR)

multiplex, pelo FDA (Food and Drug Administration, do inglês Administração de Alimentos e Medicamentos) nos Estados Unidos da América (EUA), em 2008, foram crescentes tanto a disponibilidade do teste, quanto o reconhecimento da participação dos vírus respiratórios em quadros de pneumonia, redimensionando o impacto das infecções virais, especialmente, no paciente crítico. (6) Em pacientes com pneumonia adquirida na comunidade (PAC) grave, com necessidade de internação em Centro de Terapia Intensiva (CTI), os vírus respiratórios estão presentes em cerca de 1/3 dos casos. (8) Evidências recentes apontam ainda que a mortalidade em co-infecções virais-bacterianas é cerca de 10% maior que em infecções bacterianas isoladas em pacientes internados em CTI por PAC. (9)

Assim, tem sido grande o interesse pelas infecções virais, especialmente, após a emergência de cepas virais altamente patogênicas nas duas últimas décadas, que despertaram ainda mais a atenção mundial para o problema de saúde pública que representam. (10) Em 2003, uma nova cepa de coronavírus foi identificada no sudeste asiático, causador de um quadro gripal, em que muitos dos infectados evoluíram rapidamente com complicações pulmonares, ficando conhecida pela sigla SARS-CoV, do inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus, Síndrome Respiratória Aguda Grave, e, em poucos meses, atingiu 37 países e parou de circular desde 2004. (11). Nesse mesmo ano, um surto de influenza A(H5N1), ocorreu na Ásia Central, levando 483 dos 903 infectados a óbito por insuficiência respiratória. (12,13)

Em abril de 2009, foi identificada a circulação de uma nova cepa viral, o influenza A(H1N1), em uma criança mexicana, que surgiu, provavelmente, de mutações adquiridas da circulação viral em porcos e aves. Em junho de 2009, o vírus já tinha atingido mais de 214 países, inaugurando a primeira pandemia do século XXI, conhecida como gripe suína. (14) Em 2012, o Oriente Médio passou por uma epidemia de outro coronavírus, chamado MERS-CoV, do inglês, Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus, Síndrome Respiratória do

Oriente Médio, que, provavelmente, saltou a barreira interespécies vindo de camelos. A Arábia Saudita teve 833 casos confirmados, com uma mortalidade de 43% dos infectados. (15) O vírus influenza A(H7N9), cepa aviária identificada em 2013 em humanos, causou uma epidemia, cuja mortalidade foi de quase 40%. Em 2017, causou nova epidemia na Ásia, passando a ser considerado o vírus influenza com maior potencial pandêmico atual. (16) Após as diversas experiências com epidemias passadas, estamos preparados para um novo vírus respiratório, de elevadas taxas de transmissão e gravidade? A identificação de um novo coronavírus em circulação em humanos, em dezembro de 2019, na China, veio por em teste não apenas a capacidade de resposta, mas também a solidariedade política e científica global, para combater um inimigo que não respeita fronteiras. (17)

Todos esses episódios compartilham de uma característica marcante em comum: a evolução dramática de uma síndrome gripal para um quadro grave de lesão pulmonar aguda, chamada de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).

1.2. A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma lesão pulmonar grave, caracterizada por dano inflamatório agudo e difuso, que compromete as trocas gasosas e a mecânica pulmonar, levando à hipoxemia, à redução da complacência e da dimensão do tecido pulmonar aerado. (18)

Uma miríade de insultos pode desencadear esse quadro, caracterizado pelo aumento expressivo da permeabilidade vascular. (19) O edema pulmonar subsequente, com extravasamento de líquido para o espaço intersticial e intra-alveolar, é tão significativo, que já foi chamado de “anasarca dos pulmões”, pelo médico francês René Laennec, em 1821, quando a descreveu como uma doença rara e frequentemente fatal, em que o edema pulmonar não parecia ser secundário à falência cardíaca. (20)

“O edema dos pulmões, (...) acontece, mais comumente, como um término fatal de febres prolongadas ou outras afecções orgânicas, (...) e, muitas vezes, ocorre poucas horas antes da morte. Quadros pneumônicos parecem deixar uma grande predisposição para isso; os casos mais extensos e graves que eu encontrei, ocorreram durante uma convalescença temporária desta doença. A ortopnéia sufocante, que, às vezes, acomete crianças após episódios de sarampo é, provavelmente, anasarca idiopática dos pulmões.”

Traduzido de (21)

O estudo pioneiro de Ashbaugh *et al.* (22), publicado na Lancet em 1967, definiu as bases para o estudo da SDRA. Ele descreveu uma série de 12 casos de pacientes que evoluíram com início agudo de taquipnéia e hipoxemia após diferentes insultos, como trauma, pancreatite e infecção, e apresentavam infiltrado bilateral à radiografia de tórax. Deste grupo, sete pacientes foram a óbito, cujos pulmões à autópsia apresentavam congestão capilar, atelectasias e hemorragias alveolares, além de formação de membrana hialina, presente em seis casos. (23,24) Na década seguinte, Katzentsein *et al.* (25), associou esse quadro aos achados histológicos que descreveu como Dano Alveolar Difuso (DAD), caracterizado por dano endotelial e alveolar, com exsudato de fluido e células inflamatórias acarretando grande prejuízo às trocas gasosas. O preenchimento de alvéolos com fluido rico em proteínas compromete a estabilização do surfactante e propicia ao colapso alveolar (20) e à formação de membrana hialina, um material amorfo composto por debris celulares e componentes proteicos do plasma e do surfactante alveolar, agravando ainda mais a oxigenação. (24) Desde então, o achado de DAD é considerado a marca histopatológica da SDRA.

Apesar dos avanços na compreensão da fisiologia pulmonar e dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar aguda, na prática clínica, a abordagem da SDRA continua um desafio. Não existe um teste diagnóstico padrão-ouro e, assim, a definição e os critérios diagnósticos de SDRA vêm passando por discussões e evolução de conceitos.

Até 1990, a falta de padronização de definição e nomenclatura mantinha as investigações difíceis de serem comparadas. Em 1988, Murray *et al.* (26) propôs o esquema de pontuação de lesão pulmonar, contribuindo para estratificação em níveis de gravidade do quadro, baseados na alteração radiológica, na hipoxemia, no nível de pressão expiratória final positiva (PEEP) e no valor da complacência estática. No entanto, o baixo valor preditivo prognóstico e a fraca distinção entre quadros de sobrecarga hídrica e edema pulmonar cardiogênico fizeram com que esse escore fosse deixado de ser usado na prática clínica. (27) Em 1994, a Conferência do Consenso Americano Europeu (AECC) estabeleceu critérios diagnósticos de SDRA, ainda assim, de difícil utilização à beira-do-leito, pois exigia a exclusão de causa cardíaca de forma invasiva. Em 2012, em Berlim, uma iniciativa da Sociedade Americana de Tórax (ATS) e da Sociedade Européia de Cuidados Intensivos (ESICM) discutiu critérios diagnósticos entre especialistas de todo mundo, a partir de dados de 4.188 pacientes diagnosticados com SDRA pela definição da AECC, com o objetivo de melhorar a acurácia diagnóstica e a predição de mortalidade da SDRA. Desde então, os estudos clínicos utilizam esses critérios para investigações sobre SDRA, que estabeleceu inclusive classificação de gravidade de acordo com o grau de comprometimento da troca gasosa.

Desse modo, a definição de Berlim (28) estabeleceu três critérios: 1) início agudo do quadro respiratório, dentro de sete dias de um insulto conhecido, 2) presença de infiltrado bilateral ao exame de imagem do tórax, em que o edema pulmonar não pode ser totalmente explicado por cardiopatia ou sobrecarga hídrica, e 3) hipoxemia, classificada em três categorias de gravidade, de acordo com a relação da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) / fração inspirada de oxigênio (FiO_2), em uso de uma PEEP de pelo menos 5 cmH_2O ; sendo grave uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$, moderada uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 100-200 e leve uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ entre 200-300.

Apesar dos avanços trazidos pela definição de Berlim com a padronização de conceitos para comparação entre estudos clínicos, as críticas são crescentes. Estudos de autópsia revelam que apenas 1/3 dos pacientes diagnosticados clinicamente com SDRA pelas definições de Berlim apresentam DAD à histopatologia. (24) Além disso, essa definição não contempla os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar. (29) Assim, pacientes com ampla heterogeneidade de insulto e de perfil biológico são incluídos nos mesmos grupos, que podem apresentar uma variabilidade às intervenções terapêuticas muito grande. (30) Isso pode explicar o fracasso das intervenções farmacológicas de estudos de fase 2 e 3 para SDRA.

Até hoje, não há uma terapia específica, e as recomendações são, fundamentalmente, medidas de suporte, como estratégias de ventilação protetora e restrição à sobrecarga hídrica. (30) As taxas de mortalidade mantêm-se elevadas há décadas, com lenta redução ao longo dos anos. O estudo multicêntrico mais recente, realizado em mais de 50 países, publicado em 2016 no JAMA, o LUNG SAFE (19), com 3.022 pacientes com SDRA, encontrou uma mortalidade de 40,3% e 46,1% para SDRA moderada e grave, respectivamente. A estimativa é de que, no mundo, um a cada três pacientes com SDRA não sobreviva em 60 dias. (30) No Brasil, a mortalidade parece ser ainda maior, estimada em 52% por Azevedo *et al.* (31) em uma coorte multicêntrica prospectiva, que incluiu 242 pacientes com SDRA, podendo chegar a 60% em SDRA moderada e grave.

Assim, uma nova abordagem para SDRA foi sugerida por Calfee *et al.* em 2014, (32) atribuindo menor ênfase na relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e definindo subfénótipos na SDRA que se relacionam com o perfil do paciente, de acordo com suas características imunobiológicas, com a mecânica ventilatória e o insulto sofrido, além da expressão de padrões moleculares de biomarcadores distintos. Foi realizada uma análise associada de dados clínicos e laboratoriais, baseada em dois ensaios clínicos randomizados, o ARMA e o ALVEOLI, totalizando 1.022

pacientes com SDRA, pela definição de Berlim. Assim, utilizando seis biomarcadores plasmáticos e três características clínicas, foi possível estabelecer dois fenótipos distintos. Um terço dos pacientes fazia parte do subfenótipo chamado hiper-inflamatório, que foi caracterizado por níveis plasmáticos mais altos de biomarcadores inflamatórios e maior incidência de choque circulatório e acidose metabólica, os outros 2/3 dos pacientes fazia parte do chamado subfenótipo hipo-inflamatório, com mortalidade menor e mais dias livres de ventilação mecânica. Surpreendentemente, a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, o nível de leucocitose e a presença de lesão renal e hepática não diferiram entre os grupos. Além disso, houve distinção entre os pacientes que se beneficiavam de PEEP mais alta, mostrando que a identificação de certas características pode ser útil para selecionar pacientes com maior chance de responder a determinadas estratégias terapêuticas. (33) Esse trabalho propiciou a revisão de dados já publicados, sob a luz desse conceito de subfenótipos. Até mesmo outras intervenções que não mostraram benefícios no grupo geral de SDRA, como uso de estatina (34), quando analisado retrospectivamente, um subgrupo de pacientes com perfil mais inflamatório mostraram uma melhora na sobrevida em comparação com placebo. (35)

A fisiopatologia da SDRA evolui em três fases sequenciais classicamente descritas, que se sobrepõe. (36) Após o insulto inicial, acontece a fase exsudativa, em que a resposta imune inata é desencadeada, com ativação de macrófagos intraalveolares, que vão liberar diversos mediadores e ativar uma cascata de vias pró-inflamatórias. Esta fase está associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleucina 1-beta ($\text{IL-1}\beta$), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), quimiocinas (como a CCL2 , CCL7), que recrutam neutrófilos. Neutrófilos ativados vão liberar diversos mediadores tóxicos, como NET (do inglês, neutrophils extracellular traps, armadilha extracelular de neutrófilos), histonas, proteases, metaloproteinases (MMPs), além da geração de espécies reativas de oxigênio. Uma série de respostas disfuncionais, como desregulação do tônus

vascular e ativação da coagulação e agregação de plaquetas, também podem ser desencadeadas. O exsudato inflamatório interage com o surfactante, desestabilizando moléculas de adesão, como as VE-caderinas, e interferindo no funcionamento dos canais iônicos epiteliais de sódio, os ENaC, agravando o edema alveolar e intersticial, com prejuízo às trocas gasosas. (37)

Um delicado equilíbrio entre ativação imune efetiva e inflamação exacerbada vão determinar a progressão para a segunda fase, proliferativa, de reparo e resolução do processo, ou o desencadeamento de respostas desreguladas que vão levar a propagação do insulto e amplificação do dano tecidual. A terceira fase da SDRA, fibrótica, não acontece em todos os pacientes e tem sido associada a ventilação mecânica prolongada e aumento da mortalidade. (38)

As diferenças entre SDRA induzida por lesão direta, com dano epitelial alveolar, como pneumonia, aspiração, lesão por inalação e contusão pulmonar, e SDRA induzida por lesão indireta, com dano endotelial capilar, como pancreatite, queimadura, lesão pulmonar aguda associada a transfusão (TRALI), vão além das características clínicas e parecem se estender para padrões moleculares distintos. Assim, os estudos de biomarcadores na SDRA, tanto clínicos quanto experimentais, já identificaram mais de 45 potenciais biomarcadores. (39) Níveis de proteínas B e D do surfactante (SP-B e SP-D), proteína 16 da célula clara (CC-16), Krebs von den Lungen-16 (KL-16) e os produtos finais da glicosilação avançada (RAGE), estão associados a dano alveolar e correlacionam-se com piores desfechos. Os biomarcadores mais estudados relacionados a SDRA indireta são angiopoietina-2, fator de von Willebrand e a molécula de adesão celular ICAM-1, e também são preditores de mortalidade.

No entanto, a disfunção microvascular pulmonar ainda permanece pouco compreendida. Recentemente, houve um crescente interesse em se aprofundar as

investigações em relação ao endotélio pulmonar, que parece ser o grande orquestrador na resposta inflamatória aguda e centralmente envolvido nos processos que levam à quebra da integridade da barreira alvéolo-capilar e SDRA. (40)

1.3. A barreira alvéolo-capilar

A complexa arquitetura pulmonar foi evolutivamente desenvolvida a fim de otimizar sua função primordial de realizar as trocas gasosas; de tal forma, que sua capacidade funcional está intimamente relacionada à ultraestrutura de onde essa troca acontece: na barreira alvéolo-capilar, em que oxigênio e gás carbônico difundem-se passivamente através da interface ar-sangue. A descoberta da estrutura dos capilares pulmonares foi assim descrita por Marcello Malpighi, médico e biólogo italiano, em 1661:

Tão grande é a ramificação desses vasos, depois de estenderem-se de um lado para outro da veia e da artéria, que nenhum sistema maior de vasos será servido, mas surge como uma rede (...). Essa rede não apenas ocupa todo o chão [do alvéolo], mas se estende até as paredes e adere ao vaso de saída. Quando o sangue passa através desses vasos divididos e torcidos, ele não é derramado em espaços, mas é sempre passado através de túbulos e é distribuído pelos muitos enrolamentos dos vasos.” Traduzido de (41)

Passados mais de três séculos, ainda hoje o aperfeiçoado nível de integração funcional da microestrutura pulmonar impressiona. A barreira alvéolo-capilar tem uma espessura extremamente fina, de cerca de $2,0\ \mu\text{m}$, e uma área de superfície de troca enorme, de cerca de $130\text{-}140\ \text{m}^2$, (42) de modo a estabelecer trocas altamente eficientes. Assim, ao final de uma inspiração profunda, 80% do volume pulmonar é ar, 10% é sangue e 10% é tecido, constituído por células e tecido conjuntivo. Além disso, por apresentar tão vasta área de superfície, interage intimamente com mediadores do sangue circulante, podendo exercer efeitos locais e

sistêmicos. Para que uma área de superfície dessa dimensão, próxima de uma quadra de tênis, possa ser contida na caixa torácica, ramificações sequenciais e geométricas da via aérea de condução subdividem-se, como uma árvore, em 23 gerações, em que as últimas oito gerações são vias de condução combinadas com ductos alveolares formando as unidades ventilatórias da troca gasosa, chamadas de ácinos.

As ramificações da árvore brônquica são intimamente seguidas pelas ramificações da artéria pulmonar, convergindo o fluxo de ar e sangue até a unidade alvéolo-capilar, formando uma densa rede capilar, de maneira que a área irrigada e a área ventilada são coincidentes, garantindo uma relação ventilação-perfusão adequada, próxima de 0,8 – 1,0. Há cerca de 10 mil unidades alvéolo-capilares em cada um dos 30 mil ácinos que constituem o pulmão. (43)

Estudos de microscopia eletrônica permitiram a visualização de um epitélio alveolar, formado por um mosaico de finas expansões citoplasmáticas de células chamadas pneumócitos tipo I, que recobrem 95% da superfície alveolar, espaçadas por células cubóides, chamadas de pneumócitos tipo II, cuja principal característica é de secretar surfactante. O surfactante forma um filme na superfície dos alvéolos, e é constituído, principalmente, por fosfolípidios e proteínas (SP-A, B, C e D), estabilizando a tensão superficial dos alvéolos. O interstício existente entre a lâmina basal do epitélio alveolar e a lâmina basal do endotélio contém uma rede de fibras, cujo principal componente é o colágeno tipo IV; além de fibroblastos, responsáveis pela produção e manutenção da rede de tecido conectivo. Há uma certa polaridade na barreira alvéolo-capilar, em que núcleos celulares e rede de fibras são concentradas em uma região, promovendo estabilidade mecânica, e regiões em que alvéolo e endotélio compartilham uma mesma lâmina basal, minimizando a espessura da barreira a fim de otimizar as trocas ar-sangue. (42)

O pulmão é o órgão com maior número de células endoteliais por população celular total e seu endotélio é distinto de outros leitos vasculares, especialmente, por ser exposto às

mais altas tensões de oxigênio, associados a pressões mais baixas. Seu fluxo sanguíneo também é muito particular, com sua circulação dupla, recebe uma pequena parcela de sangue arterial sistêmico vindo da circulação brônquica e, em grande parte, sangue venoso vindo da circulação pulmonar, drenado de todos os tecidos, totalizando um fluxo de cerca de 3,5 L/min/m², referente ao débito cardíaco do ventrículo direito, e é o que participa das trocas gasosas. Em repouso, num dado momento, apenas cerca de 70 ml/m² de sangue está localizado nos capilares pulmonares. Assim, em cerca de 5 segundos, uma hemácia, que tem diâmetro de cerca de 8 µm, passa pelos capilares pulmonares, cujo diâmetro médio é de 6 µm, devendo sofrer ligeira deformação (44), tornando íntimo o contato do sangue com a camada superficial endotelial.

1.4. O papel do glicocálix endotelial pulmonar como chave da barreira alvéolo-capilar

O endotélio pulmonar, antes visto como estrutura inerte, tem sido crescentemente reconhecido como estrutura dinâmica e metabolicamente ativa. (40) Mais recentemente, tem sido dada maior atenção à uma camada gelatinosa, negativamente carregada (45), de material proteináceo altamente hidratado, que reveste internamente toda a superfície endotelial dos vasos sanguíneos, o glicocálix endotelial, que estabelece constante intercomunicação entre os componentes do sangue circulante e do endotélio subjacente (46), ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema ilustrativo do glicocálix endotelial mostrado em perspectivas microscópica e molecular, fazendo a interface entre a parede vascular e o sangue circulante. Adaptado de (47,48)

Proposto por Danielli em 1940 (49) e visualizado por microscopia eletrônica pela primeira vez por Luft em 1966 (50), o glicocálix endotelial, por muitos anos, teve sua importância subestimada. Técnicas habituais de coloração e fixação de tecido degradavam sua delicada estrutura, que não parecia ser maior que 20 nm. (51) Trabalhos com técnicas de coloração com rutênio e, mais recentemente, lutênio e novas técnicas de microscopia intravital, redimensionaram não só a estrutura, mas a relevância de seu papel fisiológico na homeostasia vascular. Estima-se que o glicocálix endotelial em humanos tenha uma espessura que varia de acordo com o leito vascular, de cerca de 0,5 μm em vasos da microcirculação, até 4,5-5 μm em artérias de grande calibre, como nas carótidas (46); podendo ocupar cerca de 12 - 25% do lúmen capilar, e abrigar cerca de 1 – 1,7 litros de plasma não-circulante. (51)

O glicocálix endotelial é formado por um emaranhado de carboidratos, ancorados ao endotélio por proteoglicanos e glicoproteínas, que dão sustentação à estrutura e estabelecem ligações com glicosaminoglicanos (GAGs), proteínas plasmáticas, entre outras moléculas, determinando um equilíbrio dinâmico entre os componentes sintetizados e derramados dessa camada e do sangue circulante, que, continuamente, afeta a composição e espessura do glicocálix. (46) Os proteoglicanos são as proteínas consideradas mais importantes para dar o suporte ao glicocálix, capazes de se ligar covalentemente a diversas cadeias de GAGs. Apresenta dois grandes subgrupos, os sindecanos-1, 2, 3 e 4, que são proteínas transmembranas, e os glipicanos-1, 2, 3, 4, 5 e 6, ligadas ao glicosil-fosfatidil-inositol. Outros proteoglicanos, como o perlecan, mimecan e biglipican, são também secretados, sendo o componente mais relevante e estudado, o sindecano-1. (46) As principais glicoproteínas são da família da integrina, selectina e moléculas de adesão (como ICAM-1 e 2, VCAM-1 e PECAM-1), que expressam terminais de ácido siálico, importantes na interação de leucócitos e plaquetas com o endotélio. (40)

Os GAGs são representados por 5 subgrupos de polímeros e podem ser sulfatados e negativamente carregados, como o heparan-sulfato, o sulfato de condroitina, o dermatan-sulfato e o queratan-sulfato, que são cadeias de dissacarídeos de diversos tamanhos, formando uma força eletrostática que inibe a adesividade de proteínas e células circulantes à parede vascular. O ácido hialurônico, também chamado de hialurano, é diferente dos outros GAGs. É uma molécula enorme não-sulfatada e de carga neutra, de mais de 10^4 kDa, formando uma estrutura helicoidal que pode se expandir muito em solução aquosa. Essa incrível propriedade viscoelástica garante a estabilização dessa camada gelatinosa e contribui para a função de barreira do glicocálix endotelial. Suas cadeias ligam-se a proteínas de superfície celular CD44 e são capazes de se ligar a outros GAGs, formando grandes complexos, capazes de interagir com diversas moléculas, como albumina, trombomodulina, fibronectina, superoxidase dismutase, xantina oxireductase, anti-trombina III, proteína C, entre outros. (48) Assim, o glicocálix endotelial poderia servir como um reservatório de diversas moléculas, como quimiocinas e componentes da coagulação e fibrinólise, moldando a ativação leucocitária e a cascata da coagulação. (52,53)

No seu estado fisiológico, o glicocálix endotelial apresenta características anticoagulantes, antioxidantes e vasculoprotetoras; e age como uma barreira endotelial, formando um gradiente oncótico ao longo do próprio glicocálix, que favorece a reabsorção de fluido para o lúmen vascular. (54)

A degradação experimental do glicocalix endotelial foi suficiente para induzir edema tecidual. (55,56) Em 2003, van den Berg *et al.* (57) demonstraram que a infusão de hialuronidase em coração isolado de ratos levou a edema miocárdico, apontando para o papel determinante do hialurano na integridade do glicocálix endotelial. Figura 2.

Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica de capilar miocárdico de ratos, à direita com glicocálix endotelial íntegro, e à esquerda, após o tratamento com hialuronidase, com degradação da sua estrutura e edema pericapilar associado. Figura obtida de (57)

Estudos experimentais em ratos com deleção (knockout, do inglês) para sindecano-1 mostraram aumento da adesão e migração vascular de leucócitos mesmo em condições basais. (58) O glicocálix íntegro, de pelo menos 0,5 μm , esconderia as moléculas de adesão de cerca de 100 nm, cujos sítios de ligação ficariam expostos quando há lesão dessa estrutura. (52) Estudos *in vitro* com cultura de células (59) e *ex vivo* de artérias femorais (60) mostraram que a degradação de heparan-sulfato com heparanase e de hialurano com hialuronidase, respectivamente, levou a redução importante da produção de óxido nítrico (NO) induzida pela tensão parietal. Sugere-se que a deformação do glicocálix transmita esse sinal biomecânico, levando a reorganização do citoesqueleto, que vai estimular a liberação de NO. (61)

Assim, o glicocálix parece ser um grande contribuinte à homeostasia vascular, e parece modular processos chaves da função endotelial, como controle da permeabilidade vascular à fluidos, mediação da diapedese leucocitária (62), da adesão plaquetária e modulação do tônus vasomotor. (60) Fatores lesivos que degradam essa estrutura podem levar a um aumento da permeabilidade vascular, edema tecidual, adesão e migração leucocitária, agregação plaquetária e a um tônus vascular aberrante, levando a heterogeneidade de fluxo. (63) Há mudança para um fenótipo pró-inflamatório, pró-trombótico e oxidativo, em que as próprias moléculas clivadas constituintes do glicocálix, potencialmente, bioativas, quando derramadas na circulação sanguínea, são capazes de amplificar respostas tanto locais quanto

sistêmicas. Assim, a dosagem de marcadores de lesão do glicocálix endotelial tem se correlacionado com o grau de comprometimento desta estrutura. (64)

Crescentes evidências apontam que a degradação do glicocalix endotelial ocorre em diversos contextos clínicos, principalmente, relacionados ao paciente crítico, como sepse (48,65,66), isquemia-reperfusão (67,68), infarto agudo do miocárdio (69,70), hipervolemia (54) e trauma (51,71,72).

Rehm *et al.* (67) encontraram elevação dos níveis de sindecano-1 e heparan-sulfato no plasma após cirurgia vascular em pacientes com isquemia regional. Mostraram ainda que o heparan-sulfato clivado do glicocálix pode ativar diretamente leucócitos e plaquetas, que por sua vez, liberam heparanases que vão degradar mais cadeias de heparan-sulfato, desencadeando um ciclo vicioso, em que é, muitas vezes, difícil determinar o evento inicial. Estudos recentes (73,74) mostraram que o vírus dengue leva a importante degradação do glicocálix endotelial, podendo ser um dos fatores responsáveis pela alteração da permeabilidade vascular aberrante durante esta infecção.

Algumas enzimas podem mediar esse degradação, como heparanases, capazes de degradar heparan-sulfato, hialuronidases, capazes de degradar hialurano e metaloproteinases, que degradam sindecano-1. A infusão de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (75) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (76) em modelo animal, levou à redução da espessura do glicocálix endotelial e à elevação de seus marcadores no plasma e na urina. No entanto, os mecanismos que levam a essa degradação podem variar amplamente de acordo com o leito vascular e com o fator lesivo, e ainda são pouco compreendidos. (77)

1.5 O vírus Influenza

Os relatos da última pandemia, a gripe suína de 2009, que em cerca de três meses se alastrou pelo mundo, com alta virulência, especialmente, em segmentos da população que não faziam parte do grupo de risco convencional, com mortalidade que variou de 14 a 46% dos pacientes hospitalizados (78), são uma lembrança recente da potencial ameaça que esses vírus representam à saúde mundial.

Sua circulação é endêmica em todo o mundo, com sazonalidade mais característica em países temperados, principalmente, aumentando sua transmissibilidade em épocas de clima frio e seco. (79) Anualmente, estima-se que mais de um bilhão de pessoas sejam infectadas pelo vírus influenza, levando a cerca de 5 milhões de hospitalizações e 500 a 645 mil óbitos pelo mundo, em que o comprometimento respiratório é a principal causa de internação em CTI e de morte. (80)

Esses vírus, que pertencem à família Orthomyxoviridae, são partículas envelopadas que contêm RNA segmentado como material genético, com oito genes que codificam 17 proteínas, ilustrados na Figura 3.

Figura 3. Estrutura do vírus Influenza A, formado

por hemaglutinina (HÁ), neuraminidase (NA) e proteínas da matrix 1 (M1), que compõe a superfície viral, as proteínas da matrix 2 (M2), que são canais iônicos que reduzem o pH do endossomo da célula hospedeira e liberam o vírus para o citosol, além das nucleoproteína (NP), as proteínas não-estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2), envolvidas na evasão imune, e as polimerases ácidas (PA), básica 1 (PB1) e básica 2 (PB2), que parecem induzir morte celular. Adaptado de (81,82)

São conhecidos três tipos, A, B e C, o último é mais raro e causa doença leve, o tipo B circula somente em humanos e tem apenas duas linhagens genéticas, o Victoria e o Yamagata, caracterizados por sofrerem mutações genéticas de forma mais lenta; e o tipo A, subclassificado de acordo com as propriedades antigênicas das duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (H), que vai se ligar a resíduos de ácido siálico na célula hospedeira, e a neuraminidase (N), que libera as partículas virais da célula infectada, clivando as ligações com ácido siálico. (83) Até hoje, já foram descritos 18 subtipos de H e 11 subtipos de N. Atualmente, em circulação em humanos estão o H1N1, o H2N2 e H3N2, com transmissão estável de pessoa a pessoa, através de gotículas, aerossol e contato direto com indivíduos infectados. (84)

O influenza A circula em diversas espécies animais, apresenta ampla variabilidade genética e são altamente dinâmicos, propensos a mutações genéticas frequentes. Essas mutações podem ocorrer durante a replicação viral, levando a alterações pontuais no H e no N, gerando variantes de cepas às vezes mais virulentas que outras, chamada de *drift* antigênico; e através de uma troca completa de segmentos de material genético quando uma mesma célula é infectada por mais de um subtipo, levando a grandes mudanças gênicas, chamada de *shift* antigênico, com surgimento de subtipos novos, para o qual a maioria da população é imunologicamente susceptível, conferindo assim um potencial pandêmico. (85) A influenza A é o tipo mais associado a formas graves e o grande responsável pelas quatro pandemias dos últimos 100 anos: a Gripe Espanhola de 1918, causada pelo influenza A(H1N1), a Gripe Aviária de 1957 causada pelo influenza A(H2N2), a Gripe de Hong-Kong de 1968 causada pelo influenza A(H3N2) e a Gripe Suína de 2009 causada pelo influenza A(H1N1). (86)

Algumas características da cepa estão relacionadas a sua virulência, como por exemplo, o tipo de ligação que a hemaglutinina estabelece com o ácido siálico da célula

hospedeira. Ligações alfa 2,6 são mais expressas em células da via aérea alta, enquanto que ligações alfa 2,3 estão mais presentes no epitélio alveolar; cepas que se ligam ao ácido siálico, preferencialmente, através de alfa 2,3 apresentam um tropismo maior à infecção pulmonar. (87)

A partir do momento que o vírus consegue atingir o alvéolo e infectar, principalmente, pneumócitos tipo I e II, uma resposta imune inata é deflagrada. Especialmente, o RNA viral é reconhecido via receptor Toll-like-3 e 7, estimulando uma cascata de sinalização, que vai alterar a expressão de centenas de genes, armando uma resposta antiviral via interferon-gama (INF-gama) e uma resposta pró-inflamatória via NFkB, com liberação de TNF α e diversas citocinas, como IL-1 β , IL-6 e quimiocinas, que vão amplificar a inflamação. Essas respostas visam o clearance viral, mas podem levar a dano tecidual. Estudos experimentais com influenza A(H1N1) mostram que o vírus infecta primariamente pneumócitos, nos quais causa lesão direta; no entanto, a célula endotelial não é infectada de forma relevante pelo vírus e os mecanismos lesivos à face capilar não são bem compreendidos. (88)

Formas graves de lesão pulmonar estão associadas, principalmente, a uma resposta antiviral diminuída, que não consegue conter a replicação viral, seguido de uma resposta pró-inflamatória exacerbada, com liberação de uma tempestade de citocinas e um excesso de resposta citotóxica de células T CD8. (89)

Os fatores de risco à evolução desfavorável, tradicionalmente, conhecidos estão ligados exatamente a grupos de indivíduos com maior chance de ter uma resposta imune ineficaz. A população idosa é drasticamente acometida pelo influenza, cuja incidência de influenza grave pode chegar a sete vezes à comparada em adultos com menos de 60 anos. (90)

Portadores de doenças crônicas, imunossuprimidos e transplantados de medula óssea também têm risco maior de evolução com quadros graves após uma gripe. (79)

No entanto, a previsibilidade do vírus influenza de causar doença grave e SDRA ainda hoje é um desafio. O médico maranhense Raimundo Nina Rodrigues, professor da Faculdade de Medicina da Bahia e pesquisador de doenças tropicais e medicina legal do século passado, frente à epidemia de doença gripal na época, já chamava a atenção para o desafio do diagnóstico precoce e imprevisibilidade de evolução desfavorável:

“Alguns indivíduos, mesmo os de idade avançada e previamente acometidos por doenças respiratórias, alcançavam a cura, enquanto outros, em excelente condição de saúde, vinham a falecer. Embora a gripe fosse considerada benigna, sua gravidade parecia depender de condições individuais, bem como de complicações e acidentes fortuitos que poderiam acometer o gripado no decurso da enfermidade.” (2)

Especialmente, em situações de pandemia, um grupo de jovens sem fator de risco previsível é desproporcionalmente acometido. (91) Exemplo disso é o gráfico de mortalidade durante a Gripe Espanhola nos EUA, em forma de W.

Figura 4. Gráfico mostrando a distribuição da faixa etária dos casos fatais da pandemia de 1918, acometendo uma parcela desproporcionalmente grande de adultos entre 25 e 45 anos, quando comparada a influenza sazonal nos anos subsequentes. Adaptado de (81)

As manifestações clínicas também auxiliam pouco nas pistas para detecção precoce dos quadros graves, e assim, muitos pacientes evoluem, inesperadamente, com SDRA, que, não raro, são reconhecidos tardiamente. Muitos esforços vem sendo feitos a fim de se aprimorar estratégias de identificação de risco de complicação.

Um estudo de 2015, com quase 800 pacientes com H1N1 confirmado por PCR em tempo real, encontrou que mediadores inflamatórios estavam associados a um risco de cerca de três vezes de evolução desfavorável. Mas, assim como os biomarcadores na SDRA, nenhum foi capaz de predizer diagnóstico e prognóstico de forma satisfatória. Ainda assim, apesar de extensas investigações, não sabemos os mecanismos que vão determinar um indivíduo a ter uma infecção benigna e auto-limitada ou progredir para infecção pulmonar grave e SDRA. Até hoje, não há uma ferramenta disponível que ajude a guiar a avaliação inicial de pacientes com suspeita de infecção por influenza. As evidências atuais baseiam-se na lesão epitelial causada pelo vírus e nas vias inflamatórias desreguladas. No entanto, o papel do glicocalix endotelial pulmonar neste contexto ainda não foi investigado e pode ser um gatilho importante para o desenvolvimento de SDRA. Assim, a nossa hipótese é que a lesão do glicocálix endotelial pulmonar esteja envolvida no processo de instalação da SDRA após uma síndrome gripal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Principal

Avaliar os marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com síndrome gripal divididos em dois grupos: com e sem desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

2.2. Secundários

Avaliar potenciais fatores lesivos do glicocálix endotelial durante instalação da SDRA após síndrome gripal.

Avaliar correlação dos marcadores de lesão do glicocálix endotelial com a gravidade de apresentação da SDRA.

Avaliar o impacto prognóstico dos marcadores de lesão do glicocálix endotelial após episódio de síndrome gripal.

Avaliar potencial participação da lesão do glicocálix endotelial na infiltração leucocitária e formação de membrana hialina no processo de estabelecimento do Dano Alveolar Difuso.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Estudo observacional do tipo transversal, realizado entre março de 2016 a dezembro de 2019, que recrutou pacientes adultos com suspeita de infecção por vírus respiratório que necessitaram de internação na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (UE-HCFMRP-USP) e que procuraram atendimento ambulatorial na Unidade Básica Distrital de Saúde "Dr. Marco Antônio Sahão" Vila Virgínia (UBDS-Vila Virgínia). Ambos os serviços, localizados na cidade de Ribeirão Preto, integram a Rede Sentinela de Influenza, um sistema nacional de vigilância, criado pelo Ministério da Saúde em 2000, a fim de monitorar os atendimentos por síndrome gripal, acompanhar a morbimortalidade dos casos e identificar os principais vírus respiratórios em circulação.

A UE-FMRP-USP é um hospital universitário, referência terciária para 26 municípios da Divisão Regional Saúde XIII (DRS XIII) do Estado de São Paulo, abrangendo uma população de cerca de 4 milhões de habitantes, destinado ao atendimento de emergências, contando com 34 leitos de Centro de Terapia Intensiva e 135 leitos de enfermaria, e faz a vigilância sentinela dos casos de pacientes hospitalizados por Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), além de desenvolver atividades relacionadas a ensino, pesquisa e assistência. Os atendimentos, cerca de 30.000 ao ano, são, exclusivamente, a pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS).

A UBDS-Vila Virgínia é uma unidade de saúde municipal, localizada na Zona Sul de Ribeirão Preto, abrangendo cerca de 33 mil habitantes, que além de oferecer atendimentos básicos e de urgência, atua como Unidade Sentinela de Síndrome Gripal, realizando coletas semanais de dados clínico-demográficos e de amostras de secreção respiratória de pacientes em atendimento ambulatorial.

3.2. Aprovação ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição sob o parecer número 3758/2016 (ANEXO A) e foi conduzido em conformidade com a Declaração de Helsinki, a Resolução CNS 466/12 e o Documento de Las Américas. Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) através do qual os participantes ou os seus representantes legais (em caso de incapacidade) foram convidados a participar da pesquisa.

3.3. Caracterização da amostra e distribuição nos grupos do estudo

Foram incluídos pacientes, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, com quadro de Síndrome Gripal. Para definição de Síndrome Gripal (SG) foram usados os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (92): (1) presença de um episódio documentado de febre ($T > 37,8^{\circ}\text{C}$) e (2) associação a pelo menos dois dos seguintes sintomas: calafrios, mialgia, tosse seca, dor de garganta, prostração ou rinorréia. Os pacientes incluídos foram divididos em dois grupos: o primeiro, com comprometimento pulmonar evidente, que preenchiam critérios para Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Esses pacientes constituíram o grupo chamado de Síndrome Gripal com SDRA. Esses pacientes foram incluídos na UE-HCFMRP-USP. Os critérios para SDRA usados foram os definidos em Berlim 2012 (28): (1) sintomas agudos de início nos últimos sete dias, (2) presença de infiltrado bilateral no exame de imagem do tórax, (3) hipoxemia arterial com relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$, em que o edema pulmonar não pode ser totalmente explicado por cardiopatia ou sobrecarga hídrica.

E um segundo grupo, sem comprometimento pulmonar evidente, que apresentavam síndrome gripal, porém não preenchiam os critérios de SDRA. Estes pacientes constituíram o grupo chamado de síndrome gripal sem SDRA. A maioria destes pacientes foi recrutada em

caráter ambulatorial na UBDS-Vila Virgínia. Os fatores de risco para gripe grave e óbito por influenza foram analisados de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde e abrange além de doenças crônicas (cardiovasculares, pulmonares, neurológicas, renais, hepáticas, diabetes mellitus e imunossupressão), idade superior a 60 anos ou inferior a 5 anos, obesidade, indígenas e mulheres grávidas ou no puerpério até 42 dias. (93) Para motivos de comparação, foi estabelecido um terceiro grupo de indivíduos saudáveis, sem sintomas infecciosos nas últimas duas semanas ou vacinação nas últimas seis semanas, para constituição do grupo chamado controle.

Foi optado por utilizar os critérios de SDRA e não os critérios de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) para constituição do grupo de pacientes com maior gravidade, a fim de analisar de forma mais específica pacientes com síndrome gripal com acometimento pulmonar grave, já que a definição de SRAG abrange condições inespecíficas, como descompensação de doença prévia ou somente a queda da saturação arterial de oxigênio.

Foram excluídos os pacientes com algum foco de infecção bacteriana documentado, como infecção do trato urinário, celulite, meningite, presença de tosse com secreção purulenta, duração de febre superior a sete dias, presença de consolidação do tipo lobar na radiografia de tórax. Também foram excluídos os pacientes com choque circulatório, definido como pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou pressão arterial média < 65 mmHg ou necessidade de uso de drogas vasoativas e portadores de neoplasia ativa.

Apesar de pacientes portadores de diabetes mellitus poderem sofrer lesão do glicocálix endotelial devido aos níveis hiperglicêmicos, como é uma condição que faz parte dos fatores de risco para evolução desfavorável após infecção por influenza, esses pacientes não foram excluídos.

3.4. Coleta de dados

3.4.1. Dados clínicos e epidemiológicos

Todos os pacientes incluídos foram avaliados em relação às suas características demográficas (idade, sexo, raça e cidade de origem), comorbidades associadas e medicações de uso habitual. A presença e duração dos sintomas foram avaliados, através da análise de registo em prontuário médico e entrevista direta, com preenchimento de fichas para facilitar a coleta de informações (ANEXO B e C).

Os pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA foram avaliados quanto à necessidade de ventilação não-invasiva e mecânica invasiva, os parâmetros ventilatórios, o tempo de ventilação mecânica, evolução para lesão renal aguda (LRA), o tempo de internação na UTI e o tempo de internação hospitalar, a taxa de mortalidade intra-hospitalar, a mortalidade por todas as causas em 28 dias. Foram calculados o grau de disfunção orgânica através do escore SOFA (do inglês, Sequential Organ Failure Assessment) na admissão hospitalar e com 72h de internação, e o índice prognóstico APACHE II (do inglês, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) na admissão hospitalar.

Os pacientes que necessitaram de ventilação mecânica invasiva foram analisados em relação aos parâmetros ventilatórios, ao tempo de ventilação mecânica e em relação aos dias livres de ventilação mecânica (VFD, do inglês, Ventilator free days), que expressa o número de dias do dia 1 ao 28 em que o paciente respirou sem assistência ventilatória; os pacientes que evoluíram a óbito ou ficaram mais de 28 dias em ventilação mecânica, tiveram pontuação zero. (94)

3.4.2. Análise de espécimes clínicas

3.4.2.1. Exames gerais

Os exames laboratoriais gerais colhidos na rotina hospitalar e no atendimento ambulatorial dos pacientes foram analisados, como hemograma, função renal, proteína C reativa (PCR), gasometria arterial, eletrólitos, entre outros, bem como exames de imagem.

3.4.2.2. Teste molecular e sorológico da infecção por vírus Influenza

As amostras de secreção respiratória de pacientes atendidos com síndrome gripal entre o 3º e 5º dia após o início dos sintomas, na UE-HCFMRP-USP e na UBDS-Vila Virgínia, foram encaminhadas e processadas pelo instituto Adolf Lutz (IAL), o Laboratório de Referência Regional para o Estado de São Paulo, que integra o Programa Nacional de Vigilância de Influenza e a Rede Global de Vigilância de Influenza da Organização Mundial da Saúde. A secreção respiratória foi colhida, através de aspirado nasofaríngeo, swabs tipo Rayon combinados de orofaringe e nasofaringe ou aspirado traqueal. As análises para identificação viral das amostras foram realizadas na mesma semana do recebimento, através de imunofluorescência direta (IFD) para detecção de vírus respiratório com o Kit comercial D3 Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit (Quidel Corporation, San Diego, Califórnia, USA) e, em todas as amostras positivas, inconclusivas e em 10% das amostras negativas, prosseguiu-se a investigação com realização do teste molecular padrão-ouro rt-PCR, realizado conforme protocolo IAL 2009, (95) adaptado do CDC, com utilização do método de QIAamp Viral RNA Mini Kit para extração de ácido nucleico e detecção molecular dos vírus através do kit comercial GoTaq 1-Step RT-qPCR System.

Os pacientes com síndrome gripal também foram avaliados quanto à quantificação de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) através de kit comercial de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) da IBL America, Minneapolis, EUA.

3.4.2.3. Biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e citocinas

No momento em que os pacientes foram incluídos no estudo, na admissão hospitalar de pacientes na UE-HCFMRP-USP ou no atendimento ambulatorial na UBDS-Vila Virgínia, uma amostra de sangue de cerca de 4 ml foi colhida em tubo heparinizado. O sangue foi centrifugado a 3500 x g por 15 minutos a 18°C e o plasma separado em alíquotas de 0,5 ml e armazenado em freezer -70°C. A dosagem dos biomarcadores foi realizada através de kits comerciais de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Foram dosados marcadores de lesão do glicocálix endotelial: hialurano (R&D, Mineapolis, USA, limites de detecção: 0,37 – 90 ng/mL), sindecano-1 (Abcam, Cambridge, USA, limites de detecção: 8 – 256 ng/mL) e trombomodulina (R&D, Mineapolis, USA, limites de detecção: 62,5 – 4.000 pg/mL); citocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , limites de detecção: 15,6 – 1.000 pg/mL), interleucina-6 (IL-6, limites de detecção: 3,13 – 100 pg/mL) e interleucina 1-beta (IL-1 β , limites de detecção: 3,9 – 125 pg/mL), através de kits da R&D, Mineapolis, USA.

3.4.2.4. Histopatologia

Os casos submetidos à autópsia foram revisados por patologista para classificação diagnóstica e graduação histológica das lesões morfológicas pulmonares através de cortes histológicos do parênquima pulmonar corados através da hematoxilina-eosina. O grau de lesão da membrana alvéolo-capilar foi determinado pela análise morfométrica da extensão da membrana hialina dividida pelo perímetro determinado pelo septo alveolar por meio do software Image Pro Plus. Para tanto, foram tiradas randomicamente 10 fotos de grande aumento (400x) através de microscópio óptico (Novel) acoplado a câmera HD lite 1080p. Para cada paciente foi feita uma média das 10 medidas. Da mesma forma, foi feito a

contagem manual do número de neutrófilos e dividido pelo perímetro determinado pelo septo alveolar.

3.5. Determinação do tamanho amostral

Baseado em estudos prévios que avaliaram a lesão do glicocálix endotelial em outros cenários clínicos em pacientes críticos, foram feitas estimativas baseadas na dosagem do biomarcador sindecano-1. Considerando um nível de sindecano-1 de 20 ± 20 ng/ml no grupo controle e um nível de sindecano-1 de 40 ± 20 ng/ml no grupo síndrome gripal com SDRA, um alfa de 0,05 e um poder de 80%, foi estimado a necessidade de incluir cerca de 20 pacientes em cada grupo.

3.6. Análise estatística

As variáveis contínuas foram avaliadas para o tipo de distribuição com o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas com distribuição normal foram expressas em média $\pm$ desvio padrão da média, as demais foram expressas em mediana e intervalo interquartil. Para avaliar a diferença entre duas variáveis contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de Student. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre duas variáveis contínuas sem distribuição normal. As variáveis categóricas foram expressas em frequência ou porcentagem. Para comparar duas variáveis categóricas, utilizou-se o teste do qui-quadrado.

Para comparar os níveis dos biomarcadores entre os três grupos, como não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, para comparações múltiplas. Para testar a diferença entre três médias de variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Para testar a correlação entre duas variáveis contínuas utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman.

Para determinar o melhor ponto de corte para cada biomarcador para identificação de pacientes com SDRA, assim como, determinação da mortalidade em 28 dias, utilizou-se a curva ROC (do inglês, Receiver Operating Characteristic Curve), sendo calculado a área sob a curva (AUC). Foi feita a avaliação do melhor ponto de corte para cada biomarcador, através do índice de Youden. Com o valor de corte obtido pelo método de Youden, foi calculado o odds ratio (OR) ou risco relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) de 95% para cada biomarcador. Para análise de sobrevida, as curvas de Kaplan-Meier foram construídas e comparadas através do teste de log-rank.

Um valor de p bicaudal menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo e um valor menor que 0,0001 muito significativo. A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00 (Califórnia, EUA) e o software STATA versão 13 (College Station, Texas, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise descritiva do estudo

4.1.1. Características demográficas

Durante o período do estudo, 73 pacientes com síndrome gripal foram elegíveis, sete pacientes foram excluídos. Assim, foram analisados 66 indivíduos com síndrome gripal, sendo 30 no grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e 36 no grupo síndrome gripal sem SDRA. Além destes, 35 indivíduos saudáveis foram incluídos no grupo controle, totalizando 101 indivíduos. O fluxograma de inclusão de pacientes é mostrado na Figura 5.

Não foi observada diferença estatística em relação a idade entre os três grupos (44 ± 16 anos para o grupo síndrome gripal com SDRA, 39 ± 17 anos para o grupo síndrome gripal sem SDRA e 44 ± 9 anos no grupo controle, $p = 0,28$). A distribuição em relação ao gênero também foi semelhante entre os três grupos, 57% (17/30) de homens no grupo síndrome gripal com SDRA, 42% (15/36) no grupo síndrome gripal sem SDRA e de 51% (18/35), $p = 0,70$. As características demográficas são mostradas na Tabela 1.

A raça declarada pelos pacientes foi negra em 20% (6/30) dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA, 28% (10/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA e 18% (6/35) no grupo controle, $p = 0,54$. Os grupos síndrome gripal sem SDRA e controle foram constituídos 100% por habitantes de Ribeirão Preto.

4.1.2. Comorbidades e presença de fator de risco para gripe grave

A presença de pelo menos uma comorbidade foi semelhante entre os dois grupos com síndrome gripal, presente em 30% (9/30) dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA e 36% (13/36) dos pacientes no grupo síndrome gripal sem SDRA. A presença de pelo menos

um fator de risco para gripe grave e óbito por influenza, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, também não apresentou diferença entre os dois grupos com síndrome gripal; $p = 0,69$, presente em 47% (14/30) dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA e 42% (15/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA. O gráfico comparando os fatores de risco presentes nos dois grupos com síndrome gripal é mostrado na Figura 6. Nenhuma gestante, puérpera ou indígena foram incluídos no estudo.

A presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi de 23% (7/30) no grupo síndrome gripal com SDRA e 8% (3/36) no grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,10$; a presença de diabetes mellitus (DM) foi de 17% (5/30) no grupo síndrome gripal com SDRA e de 6% (2/36) no grupo síndrome gripal sem SDRA, $p = 0,16$. A presença de cardiopatia foi de 6% (2/30) no grupo síndrome gripal com SDRA e 7% (2/36) no grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 1,0$. Apresentava diagnóstico de doença pulmonar, 16% (5/30) dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA e 14% (5/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,76$. Em relação à doença neurológica, foi presente em 7% (2/30) dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA e 8% (3/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,81$. Também não houve diferença entre os grupos em relação ao tabagismo, presente em 17% (5/30) do grupo síndrome gripal com SDRA e 11% (4/36) do grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,52$.

A obesidade foi presente em 27% (8/30) no grupo síndrome gripal com SDRA e em 17% (6/36) no grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,33$. A média de peso foi de 83 ± 26 kg no grupo síndrome gripal com SDRA e 71 ± 15 kg no grupo síndrome gripal sem SDRA; $p = 0,08$. Os antecedentes pessoais dos dois grupos são mostrados na Tabela 2.

4.1.3. Características clínico-laboratoriais da síndrome gripal

A apresentação clínica e laboratorial dos pacientes com síndrome gripal é descrita na Tabela 3. A duração do início dos sintomas até a primeira procura a atendimento médico foi semelhante nos dois grupos, com mediana de 4 dias, $p = 0,69$. Os pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA, procuraram cerca de 2 (1-3) vezes atendimento médico até serem encaminhados à UE-HCFMRP-USP, e demoraram cerca de 1 (1-3) dia, desde o serviço médico de menor complexidade até à admissão na UE-HCFMRP-USP, chegando com uma mediana de 5 (4-7) dias do início dos sintomas gripais, momento em que foram incluídos no estudo, enquanto que os pacientes com síndrome gripal sem SDRA foram incluídos com 4 (2-5) dias do início dos sintomas; $p < 0,0001$. Os pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA apresentaram dispneia cerca de 4 (3-5) dias do início dos sintomas.

Os sintomas a seguir foram semelhantes entre os grupos sem e com SDRA ($p > 0,05$ para todas as comparações). A presença de febre foi observada em 89% (32/36) e 93% (28/30), respectivamente, assim como, tosse em 78% (28/36) e 87% (26/30), mialgia em 75% (27/36) e 60% (18/30). A queixa de prostração e perda do apetite foi frequente em ambos os grupos, 80% (29/36) e 63% (19/30), respectivamente. Sintomas rinofaríngeos, como coriza, obstrução nasal, espirros e odinofagia foram relatados em 69% (25/36) e 50% (15/30), sintomas gastrointestinais, como náusea, vômitos ou diarreia, estavam presentes em 36% (13/36) e 20% (6/30); artralgia foi referida por 28% (10/36) e 20% (6/30) dos pacientes; e alterações oculares, como hiperemia e irritação conjuntival em 16% (6/36) e 7% (2/30).

A queixa de dispnéia esteve presente em 39% (14/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA e em 97% (29/30) dos pacientes do grupo com SDRA, único sintoma que apresentou diferença significativa entre os grupos; $p < 0,0001$. Cerca de 1/3 (14/36) dos pacientes do grupo síndrome gripal sem SDRA queixaram de dispneia, sintoma considerado alarme importante e definidor de síndrome respiratória aguda grave pelo

Ministério da Saúde, apenas 28% (4/14) destes apresentou necessidade de oxigênio suplementar. Assim, a presença de dispneia nesse grupo não se correlacionou com necessidade de internação, uso de oxigênio suplementar ou presença de fator de risco. Dos 17% (6/36) dos pacientes que necessitaram de internação hospitalar, 1/3 (2/6) não referiu dispneia e 100% (6/6) necessitou de oxigenioterapia suplementar.

Em relação ao achados do exame físico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação a temperatura, pressão arterial sistólica ou pressão arterial diastólica. A frequência cardíaca foi maior no grupo com SDRA em comparação ao grupo sem SDRA (104 ± 21 bpm vs. 86 ± 15 bpm; $p = 0,0009$); assim como uma frequência respiratória mais elevada (32 ± 10 ipm vs. 21 ± 3 ipm; $p < 0,0001$).

Em relação aos exames laboratoriais, o número absoluto de linfócitos e os níveis plaquetários foram significativamente menores no grupo com SDRA em comparação ao grupo sem SDRA (linfócitos: 900 cél/mm^3 vs. 1.800 cél/mm^3 respectivamente; $p < 0,0001$; e plaquetas: $168 \text{ mil plaquetas/mm}^3$ vs. $210 \text{ mil plaquetas/mm}^3$, respectivamente; $p = 0,02$).

Os níveis de proteína C reativa (PCR) e desidrogenase láctica (LDH) foram mais elevados no grupo com SDRA [$11,9 (8,5-21,5) \text{ mg/dl}$ vs. $2,2 (0,9-5,2) \text{ mg/dl}$; $p < 0,0001$ e $1059 (631-1645) \text{ mg/dl}$ vs. $372 (324-448) \text{ mg/dl}$; $p < 0,0001$, respectivamente]. Os níveis de albumina também foram significativamente menores no grupo com SDRA que no grupo sem SDRA [$3,2 (2,7-3,5) \text{ mg/dl}$ vs. $4,3 (4,0-4,5) \text{ mg/dl}$; $p < 0,0001$], respectivamente.

4.1.4. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus Influenza

Apresentaram testes positivos sugestivos de infecção aguda por Influenza A 57% (17/30) dos pacientes com síndrome gripal com SDRA e 36% (13/36) do grupo síndrome gripal sem SDRA, valor $p = 0,1$. Em relação ao teste molecular, o rt-PCR, foi realizado em 48 dos 66 pacientes com síndrome gripal, sendo positivo para influenza A(H1N1) pdm09 em

31,2% (15/48). No grupo SDRA, dos 30 pacientes, 23 colheram amostras de secreção respiratória; destes, 9 pacientes colheram com 5 dias ou menos de sintomas do início da gripe e 14 pacientes colheram com mais de 6 dias de início dos sintomas. Ainda assim, o teste foi positivo em 52% (12/23) dos pacientes. No grupo síndrome gripal sem SDRA, dos 36 pacientes, 25 colheram amostras para o teste, todos com 5 dias ou menos de duração dos sintomas, sendo positivo em 12% (3/25), valor $p = 0,002$. Em relação ao teste sorológico, apresentaram IgM para Influenza A positivo 27% (8/30) dos pacientes do grupo SDRA e 28% (10/36) do grupo síndrome gripal sem SDRA, valor $p = 0,93$. A linha do tempo da evolução dos sintomas dos pacientes com teste positivo para influenza A é mostrada na Figura 7.

4.1.5. Internação hospitalar, internação em CTI, complicações e mortalidade

Quanto às taxas de internação hospitalar, 17% (6/36) do grupo síndrome gripal sem SDRA teve indicação de internação, com uma média de 2 ± 4 dias de internação hospitalar [variando de 3-16 dias]. Nenhum paciente apresentou necessidade de internação em CTI e nenhum paciente desse grupo evoluiu a óbito. Todos os pacientes do grupos SDRA necessitaram de internação hospitalar (100%), 83% (25/30) dos pacientes apresentaram indicação de internação em CTI, porém 20% (6/30) dos pacientes permaneceram em leito monitorizado na sala de urgência e 63% (19/30) foram internados em CTI, cuja duração média de internação no CTI foi de 11 ± 6 dias e de internação hospitalar de 18 ± 17 dias. A mortalidade intra-hospitalar foi de 40% (12/30) e a taxa de mortalidade em 28 dias foi de 33% (10/30).

4.1.6. Análise das características do grupo síndrome gripal com SDRA

A classificação da gravidade da SDRA foi 57% (17/30) como SDRA grave, 23% (7/30) como SDRA moderada e 20% (6/30) como SDRA leve. Dos pacientes classificados

como SDRA leve, todos receberam oxigenoterapia suplementar e 50% (3/6) fez uso de ventilação mecânica não-invasiva (VNI).

A maioria do grupo foi classificada como SDRA moderada e grave 80% (24/30). Destes, 87% (21/24) evoluiu com necessidade de ventilação mecânica invasiva (VMI); a qual ocorreu em 95% (20/21) dos casos nas primeiras 72h de internação, sendo que 33% (7/21) dos pacientes chegaram à UE-HCFMRP-USP em franca insuficiência respiratória e foram submetidos à intubação orotraqueal (IOT) no momento da admissão hospitalar, e outros 19% (4/21) evoluíram com falência respiratória nas primeiras 24h de internação. A mediana de dias de sintomas de gripe em que os pacientes foram intubados foi de 6 (4 – 7) dias do início dos sintomas e 2 (1-3 dias) dias do início da dispneia.

A ventilação mecânica foi considerada protetora em 76% (16/21) dos casos, respeitando os limites de volume corrente de 6ml por quilo de peso predito e pressão de platô de 30 cmH₂O, 67% (14/21) fizeram uso de bloqueador neuromuscular, um paciente foi submetido à posição prona e dois pacientes ao recrutamento alveolar. Os parâmetros ventilatórios e gasométricos estão mostrados na Tabela 4. Os pacientes permaneceram em ventilação mecânica, em média 10±9 dias. A média de dias livre de ventilação mecânica, que expressa o número de dias até o dia 28 que o paciente respirou sem assistência ventilatória, foi de 4±6 dias, pois pacientes que evoluem à óbito ou persistem em ventilação mecânica por mais de 28 dias são excluídos.

Os pacientes receberam tratamento antiviral com oseltamivir em 97% (29/30) dos casos, no entanto, apenas 7% (2/30) iniciaram a medicação no tempo recomendado de 48h do início dos sintomas. O tempo de evolução de sintomas até o início do oseltamivir foi de 5 (4-6) dias. A maioria dos pacientes recebeu tratamento com antibioticoterapia para cobertura dos principais germes associados à infecção bacteriana secundária pós-influenza: *Streptococcus*

pneumoniae, com uso de ceftriaxone em 97% (29/30) dos casos e *Staphylococcus aureus*, com uso de oxacilina em 87% (26/30) dos casos.

Cerca de metade dos pacientes, 53% (16/30), evoluiu com lesão renal aguda, sendo significativamente, presente no subgrupo SDRA não-sobreviventes (13/15) que no subgrupo sobreviventes (2/15); $p = 0,0004$. No entanto, apenas 20% (3/15) realizou terapia renal substitutiva. Outra complicação significativa também presente foi a ocorrência de fenômenos associados a distúrbios da coagulação 20% (6/30) dos pacientes, com diagnósticos de trombose venosa profunda associada a tromboembolismo pulmonar, coagulação intravascular disseminada, hemorragia alveolar difusa e hemorragia digestiva.

Em relação ao grau de disfunção orgânica e o índice prognóstico foram avaliados no grupo síndrome gripal com SDRA, através do SOFA do 1º, 2º e 3º dia de internação, cuja média foi de $6,8 \pm 4$, $6,7 \pm 4$ e $6,6 \pm 4$, respectivamente, e do APACHE II do 1º dia de internação, que foi de $15 \pm 9,9$.

4.2. Avaliação dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial

Os níveis dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial são mostrados na Tabela 5, em comparação com os grupos síndrome gripal com SDRA, síndrome gripal sem SDRA e controles.

Os níveis de sindecano-1 foram mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA [28 (24-57) ng/ml] em comparação ao grupo síndrome gripal sem SDRA [24 (24-25) ng/ml]; $p=0,009$, contudo, não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Os níveis de hialurano mostraram-se significativamente mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA [31 (12-56) ng/ml] em comparação com síndrome gripal sem

SDRA [5 (3 -10) ng/ml]; $p < 0,0001$ e com o grupo controle [5 (2-8) ng / ml], $p < 0,0001$. O gráfico do tipo box-plot dos níveis de hialurano entre os grupos é mostrado na Figura 8.

Os níveis de trombomodulina foram mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA [1.411 (878-2.237) pg/ml] e síndrome gripal sem SDRA [1.390 (21-1.746) pg/ml], em comparação com o controle [219 pg/ml (21-601)], $p < 0,0001$, contudo, não houve diferença entre estes dois primeiros grupos, $p = 0,57$. Os níveis de trombomodulina apresentaram correlação moderada com lesão renal aguda, $\rho = 0,37$, $p = 0,05$. Os níveis em foram significativamente mais elevados no subgrupo que evoluiu com lesão renal aguda [1.756 (1098-2402) pg/ml] em comparação com o subgrupo sem lesão renal [1.231 (260-1.600) pg/ml], $p = 0,04$.

Foi realizada uma subanálise onde foram incluídos somente os pacientes com confirmação laboratorial de influenza A através do rt-PCR para Influenza A(H1N1)pdm09 ou do IgM anti-influenza A positivos. Neste subgrupo, os níveis de hialurano continuaram significativamente mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA [34 (16-62) ng/ml] em relação ao grupo síndrome gripal sem SDRA [8 (4-15) ng/ml] e grupo controle [5 (2-8) ng/ml]; $p = 0,001$. Em relação a trombomodulina, os níveis plasmáticos estão mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA [1.374 (923-1.980) pg/ml] e sem SDRA [1.339 (575-1.888) pg/ml] em relação ao grupo controle [219 (21-601) pg/ml], $p < 0,0001$; contudo não foi observada diferença significativa entre os dois primeiros grupos. Em relação aos níveis de sindecano-1 não foi observada diferença entre os grupos.

Analisando somente o subgrupo com rRT-PCR positivo para influenza A H1N1 pdm09, que apesar do reduzido número, os níveis plasmáticos de hialurano foram significativamente mais elevados no grupo síndrome gripal com SDRA em relação ao grupo com síndrome gripal sem SDRA [33 (16 -52) ng/ml vs. 8 (5-10) ng/ml]; $p = 0,05$, mostrado na Tabela 6.

Por último, foram comparados os níveis dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial no subgrupo de sobreviventes e não-sobreviventes dos pacientes com síndrome gripal com SDRA, mostrado na Tabela 7. O hialurano, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo sobreviventes e não-sobreviventes [30 (11-50) ng/ml vs. 31 (18-90) ng/ml]; $p = 0,39$, mostrou uma tendência de níveis mais elevados quando foi dosado no 2º e 3º dia da dispneia, mostrando também uma tendência de níveis mais altos no subgrupo de não-sobreviventes, ilustrado na Figura 9.

4.3. Avaliação da acurácia diagnóstica dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial para identificação dos pacientes com SDRA

Na análise através das curvas ROC para se avaliar o desempenho os biomarcadores para identificação de pacientes com síndrome gripal que desenvolveram SDRA, a melhor acurácia diagnóstica foi do hialurano, com valor de corte de 12,4 ng/ml, apresentou uma área sob a curva ROC de 0,80 (IC95% 0,70-0,90)], com odds ratio (OR): 15 (IC 95%: 5-43), $p=0,0001$. A trombomodulina apresentou uma área sob a curva de 0,73 (IC 95% 0,62-0,83), usando como ponto de corte o valor de 817 pg/ml, OR: 9 (IC95%: 3-25); $p = 0,0001$. O nível de sindecano-1, com ponto de corte de 25 ng/ml, mostrou uma área sob a curva de 0,63 (IC95% 0,51-0,74), com OR: 3 (IC95%:1,13-6,55); $p=0,02$. O desempenho destes biomarcadores para identificação dos pacientes com SDRA é mostrado na tabela 8 e figura 10.

4.4. Avaliação da resposta inflamatória através das citocinas inflamatórias

Não foi observada diferenças significativas entre os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 entre os grupos síndrome gripal com SDRA, síndrome gripal sem SDRA e controles, com valor $p > 0,05$ para todas as comparações, mostradas na Tabela 5.

Quando analisado o subgrupo de sobreviventes e não-sobreviventes nos pacientes com síndrome gripal SDRA, os níveis de IL-6 foram mais elevados no subgrupo não-sobreviventes [104 (30-616) pg/ml] em relação ao sobreviventes [32 (16-71) pg/ml]; $p = 0,05$. Os níveis de TNF- α e IL-1 β não mostraram diferenças entre os subgrupos, com $p > 0,05$.

4.5. Correlação entre lesão do glicocálix endotelial e gravidade da SDRA

Analisando os dados restritos dos pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA ($n=30$), não foi observada nenhuma correlação entre os níveis plasmáticos dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: [hialurano ($\rho=0,01$; $p=0,95$); trombomodulina ($\rho=-0,18$, $p=0,33$) e sindecano-1 ($\rho=-0,30$, $p=0,12$)].

Em relação a gravidade da SDRA, foi observado níveis de trombomodulina significativamente mais elevados nos grupos moderado e grave em relação ao grupo leve [1.787(1.404-2;675) pg/ml vs. 1.417 (1.016-2.242) pg/ml vs. 528 (31-1.231) pg/ml respectivamente; $p=0,02$, mostrado na Figura 11.

Já para os níveis de hialurano não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos leve, moderada e grave [26 (13-44) ng/ml vs. 36 (27-64) ng/ml vs. 27 (10-55) ng/ml respectivamente; $p=0,51$, assim como, para os níveis de sindecano-1 [24 (20-24) ng/ml vs. 43 (24-125) ng/ml vs. 38 (24-47) ng/ml respectivamente; $p=0,26$.

4.6. Correlação entre os níveis dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e as citocinas inflamatórias e as imunoglobulinas anti-influenza A

Houve uma correlação positiva moderada entre os níveis de sindecano-1 com os níveis de TNF- α ($\rho=0,50$; $p<0,0001$) e de IL-6 ($\rho=0,60$; $p<0,0001$), mostrados nas Figuras 12 e 13. Não foi observada nenhuma outra correlação significativa entre os demais marcadores de lesão do glicocálix endotelial (hialurano, sindecano-1, trombomodulina) com as citocinas

inflamatórias ($p>0,05$). Os níveis de hialurano mostraram uma correlação positiva fraca com a quantificação de imunoglobulina G (IgG) anti-influenza IgG ($\rho = 0,27$, $p=0,04$), mostrada na Figura 14. Não foi observada nenhuma outra correlação entre os níveis de imunoglobulinas (IgG e IgM) com os outros marcadores de lesão do glicocálix endotelial.

4.7 Correlação dos marcadores de lesão do glicocálix endotelial com a membrana hialina e com o número de neutrófilos no septo alveolar

A autópsia foi realizada em quatro pacientes do grupo síndrome gripal com SDRA que evoluíram a óbito. As características detalhadas de cada um destes pacientes foram relatadas nas figuras 15, 16, 17 e 18. Apesar de serem somente quatro pacientes, realizou-se a mensuração do perímetro da membrana hialina e a quantificação do número de neutrófilos corrigidos pelo perímetro do septo alveolar destes pacientes. Observou-se uma correlação positiva entre a espessura da membrana hialina e o níveis plasmáticos de trombosmodulina ($\rho=0,89$; $p=0,05$) e entre o número de neutrófilos e os níveis plasmáticos de hialurano ($\rho=0,89$; $p=0,05$), mostrados nas Figuras 19 e 20.

4.8. Comparação entre os sobreviventes e não-sobreviventes

Esta análise foi realizada no grupo de pacientes com síndrome gripal com SDRA, em que foram considerados para composição do subgrupo não-sobreviventes pacientes com óbito intra-hospitalar, sendo excluídos 3 pacientes com óbito após a alta hospitalar. Não houve diferença em relação as características demográficas, presença de fatores de risco para evolução desfavorável, dias de sintomas até o início do oseltamivir e índice de massa corporal entre os sobreviventes e não sobreviventes. Os pacientes não sobreviventes apresentaram mais disfunções orgânicas avaliadas através do escore de SOFA ($9,1\pm3,8$ vs. 5 ± 2 ; $p=0,001$) e APACHEII (20 ± 10 vs. 11 ± 8 ; $p=0,008$). Além disso, os não sobreviventes tiveram maior

necessidade de ventilação mecânica invasiva (87% vs. 53%, $p = 0,05$), menos dias livres de ventilação ($0,7 \pm 2$ vs. $11,5 \pm 5,8$; $p = 0,001$) e maior incidência de lesão renal aguda (92% vs. 13%); $p = 0,0004$.

Não houve diferença nos níveis dos biomarcadores entre os pacientes sobreviventes e não sobreviventes: hialurano [30 ng / ml (11-50) vs. 31 ng / ml (18-90)], $p = 0,39$; trombomodulina [1.303 (547-1.800) pg/ml vs. 1.644 (986-2.377) pg/ml, $p = 0,39$ e sindecano-1 [24 (24-50) ng/ml vs. 40 (23-137) ng/ml], $p = 0,59$. Os níveis de TNF-alfa [15 (15-18) pg/ml vs. 27 (15-214) pg/ml] e IL-1beta [4 (0,4-98) pg/ml vs. 4 (0,4-49) pg/ml] não mostraram diferenças significativas; $p > 0,05$. Os níveis de IL-6 foram mais elevados no subgrupo de não-sobreviventes [104 (30-616) pg/ml vs. 32 (16-71) pg/ml], $p = 0,05$.

4.9. Biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial como marcadores prognósticos após síndrome gripal

Análise incluindo todos os pacientes com síndrome gripal através da curva ROC, observou-se que o hialurano foi o biomarcador que apresentou a melhor acurácia prognóstica para prever a mortalidade em 28 dias [ASC: 0,74 (IC95%: 0,58-0,89)] comparado com a trombomodulina [ASC: 0,57 (IC95%: 0,38-0,78)] e com o sindecano-1 [ASC: 0,57 (IC95%: 0,37-0,780)]. Figura 21.

Através do índice de Youden determinamos o melhor ponto de corte dos níveis de hialurano para determinação da mortalidade em 28 dias. Considerando todos os pacientes com síndrome gripal este valor foi 19 ng/ml com uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 72%, considerando somente o grupo síndrome gripal com SDRA este valor foi de 70 ng/ml com sensibilidade de 33% e especificidade de 94%.

Considerando todos os pacientes com síndrome gripal, os níveis plasmáticos de hialurano >19 ng/ml associou-se com uma mortalidade em 28 dias mais elevada, risco relativo

(RR): 6,95 (IC95%:2-26); $p=0,0017$. Figura 22 Assim como, no grupo síndrome gripal com SDRA, a dosagem de hialurano > 70 ng/ml também associou-se a uma mortalidade em 28 dias mais elevada, RR: 6,96 (IC95%: 2-23), $p=0,0023$. Figura 23

Tabela 1. Características demográficas dos três grupos estudados

Características demográficas	Síndrome gripal com SDRA N=30	Síndrome gripal sem SRDA N=36	Controle N=35	P
Idade (anos), média $\pm$ desvio padrão	44 $\pm$ 16	39 $\pm$ 17	44 $\pm$ 9	0,28
Sexo masculino, n (%)	17 (57)	15 (42)	18(51)	0,70
Raça negra, n (%)	6 (20)	10 (28)	6 (18)	0,54
Origem de Ribeirão Preto	18 (60)	36 (100)	35 (100)	0,001

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo

Tabela 2. Comorbidades e fatores de risco para evolução grave nos pacientes com síndrome gripal divididos com e sem apresentação da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

Antecedentes pessoais	Síndrome gripal com SDRA N=30	Síndrome gripal sem SDRA N=36	P
Comorbidades, n (%)	9 (30)	13 (36)	0,61
HAS, n (%)	7 (23)	3 (8)	0,10
DM, n (%)	5 (17)	2 (6)	0,16
Cardiopatia, n (%)	2 (7)	2 (6)	0,10
Doença pulmonar, n (%)	5 (16)	5 (14)	0,76
Doença neurológica, n (%)	2 (7)	3 (8)	0,81
Tabagismo, n (%)	5 (17)	4 (11)	0,52
Obesidade, n (%)	8 (27)	6 (17)	0,33
Peso; kg, média $\pm$ dp	83 $\pm$ 26	71 $\pm$ 15	0,08
Fator de Risco, n (%)	14 (47)	15 (42)	0,69
Idade > 60 anos	3 (10)	4 (11)	0,89
Doença crônica	9 (30)	7 (19)	0,32
Obesidade	8 (27)	6 (17)	0,33
Gestação	0	0	1,00

HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; kg: quilogramas; dp: desvio-padrão.

Tabela 3. Características clínicas, laboratoriais e relacionadas a internação hospitalar dos pacientes com síndrome gripal incluídos nesta investigação divididos com e sem síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

Características	Síndrome gripal com SDRA N=30	Síndrome gripal sem SDRA N=36	P
Sintomas			
Febre, n. (%)	28(93)	32(89)	0,68
Tosse, n. (%)	26(87)	28(78)	0,67
Mialgia, n. (%)	18(60)	27(75)	0,28
Cefaléia, n. (%)	17(57)	29(80)	0,06
Prostração e perda de apetite, n. (%)	19(63)	29(80)	0,12
Sintomas rinofaríngeos, n. (%)	15(50)	25(69)	0,11
Sintomas gastrointestinais, n. (%)	6(20)	13(36)	0,18
Artralgia, n. (%)	6(20)	10(28)	0,47
Alterações oculares, n. (%)	2(7)	6(17)	0,22
Dispnéia, n. (%)	29(97)	14(39)	<0,0001
Duração dos sintomas; dias, mediana (IQ)	5(4-7)	4 (2-5)	<0,0001
Exame físico			
Temperatura; °C, média ± dp	36,6±0,8	36,5±0,7	0,69
PAS; mmHg, média ± dp	117±21	119±13	0,75
PAD; mmHg, média ± dp	73±15	74±8	0,70
PAM; mmHg, média ± dp	88±17	90±10	0,85
Frequência cardíaca; bpm, média ± dp	104±21	86±15	0,0009
Frequência respiratória; ipm, média ± dp	32±10	21±3	<0,0001
Glasgow, mediana (IQR)	14 (13-15)	15 (14-15)	0,05
Exames laboratoriais			
Hemoglobina, g/dl, mediana (IQR)	13,2 (11,7-14,7)	13,7(12,8-16,6)	0,06
Leucócitos; mm ³ , mediana (IQR)	6.150 (3.900-10.100)	8.400 (6.400-11.200)	0,05
Segmentados; mm ³ , mediana (IQR)	4.600 (2.950-7.200)	5.350 (3.600-8.175)	0,33
Linfócitos; mm ³ , mediana (IQR)	900 (600-1.300)	1.800 (1.400-2.200)	<0,0001
Plaquetas; 10 ³ mm ³ , mediana (IQR)	168 (126-234)	210 (176-266)	0,02
Proteína C Reativa; mg/dl, mediana (IQR)	11,9 (8,5-21,5)	2,2(0,9-5,2)	<0,0001
LDH; mg/dl, mediana (IQR)	1.059 (631-1.645)	372 (324-448)	<0,0001
Albumina; mg/dl, mediana (IQR)	3,2 (2,7-3,5)	4,3 (4,0-4,5)	<0,0001
Creatinina; mg/dl, mediana (IQR)	1,0 (0,8-1,6)	0,9(0,8-1,2)	0,2
Diagnóstico laboratorial da infecção viral			
Teste molecular, rRT-PCR influenza, n/n (%)	12/23*(52)	03/25*(12)	0,02
Teste sorológico, Influenza A IgM, n (%)	8 (27)	10 (28)	0,93
Influenza A positivo rRT-PCR ou IgM, n(%)	17 (57)	13 (36)	0,1
Hospitalização, n (%)	30 (100)	06 (17)	<0,0001
Dias da internação hospitalar; média ± dp	18±17	2±4	<0,0001
Dias de internação em CTI, média ± dp	11 ± 14	0	<0,0001
Mortalidade intra-hospitalar, n (%)	12(40)	00(00)	<0,0001

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; dp: desvio-padrão; IQR: intervalo interquartil; bpm: batimentos por minuto; ipm: incursões por minuto; LDH: desidrogenase láctica; CTI: centro de terapia intensiva

Tabela 4. Parâmetros clínicos, ventilatórios e prognósticos do grupo com SDRA

Parâmetros avaliados	SDRA N=30	SDRA sobreviventes N=15	SDRA não- sobreviventes N=12	P
Clínicas e demográficas				
Idade (anos), média $\pm$ desvio padrão	44 $\pm$ 16	38 $\pm$ 15	49 $\pm$ 14	0,09
Sexo masculino, n (%)	17 (57)	9 (60)	8 (53)	0,73
Fator de risco presente	14 (47)	5 (33)	10 (67)	0,08
Dias de sintomas até início de oseltamivir	5 (4-6)	4 (4-6)	5 (4-6)	0,64
IMC; kg/m ² , média $\pm$ dp	32 $\pm$ 11	31 $\pm$ 11	34 $\pm$ 10	0,29
APACHE II	15 +- 9,9	11 +- 8,4	20,2 +-9,1	0,008
SOFA D1	6,8 +- 4	4,5 +- 2,2	9,1 +-3,8	0,001
SOFA D2	6,7 +- 4	5 +- 3,2	8,5 +-4	0,02
SOFA D3	6,6 +-4,2	4,8 +-3,1	9+-4,3	0,02
Classificação SDRA grave-moderada, n(%)	24 (80)	10 (67)	13 (87)	0,21
Ventilatórias e trocas gasosas				
Relação PaO ₂ /FiO ₂ D1	115 $\pm$ 66	143 $\pm$ 74	87 $\pm$ 43	0,02
Relação PaO ₂ /FiO ₂ D2	137 $\pm$ 77	180 $\pm$ 88	101 $\pm$ 39	0,03
Relação PaO ₂ /FiO ₂ D3	176 $\pm$ 93	214 $\pm$ 85	124 $\pm$ 80	0,007
Ventilação mecânica invasiva	21 (70)	8 (53)	13 (87)	0,05
Dias de sintomas até IOT	6 (4,5-7)	5 (4-7)	6 (5-7)	0,26
Volume corrente; ml/kg de pp, D1	6,3 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 1	6,3 $\pm$ 1,5	0,57
Volume corrente; ml/kg de pp, D2	6,3 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 1,1	0,03
Volume corrente; ml/kg de pp, D3	5,9 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,6	0,37
PEEP D1	12 $\pm$ 5	11 $\pm$ 5	12 $\pm$ 5	0,22
PEEP D2	11 $\pm$ 5	9 $\pm$ 3	13 $\pm$ 5	0,04
PEEP D3	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3,5	12 $\pm$ 4	0,19
Pressão Platô D1	34,5 $\pm$ 2,1	33 $\pm$ 0,2	36 $\pm$ 0,3	0,9
Pressão Platô D2	28,4 $\pm$ 3,8	26 $\pm$ 0,3	29 $\pm$ 4,1	0,8
Pressão Platô D3	27 $\pm$ 3,6	25 $\pm$ 3,6	27,8 $\pm$ 3,3	1,0
Driving Pressure D1	13,5 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 0,3	12 $\pm$ 0,4	0,8
Driving Pressure D2	13,6 $\pm$ 2,8	13 $\pm$ 4,2	14 $\pm$ 2,8	1,0
Driving Pressure D3	14,2 $\pm$ 3,2	13 $\pm$ 3	15,2 $\pm$ 3,1	0,9
Dias de ventilação mecânica	10,2 $\pm$ 8,6	16,5 $\pm$ 5,8	7,2 $\pm$ 8,2	0,02
Dias livres de ventilação em 28 dias	4,1 $\pm$ 6,2	11,5 $\pm$ 5,8	0,7 $\pm$ 2	0,001

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; IMC: índice de massa corporal. D1: 1º dia. D2: 2º dia. D3: 3º dia de internação. PEEP: pressão positiva ao final da expiração; pp: peso predito. SDRA não-sobreviventes: pacientes com óbito intra-hospitalar.

Tabela 5. Dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias nos três grupos investigados.

Biomarcadores, mediana (IQR)	Sd gripal com SDRA (N=30)	Sd gripal sem SDRA (N=36)	Controles (N=35)	P
Sindecano-1 (ng/ml)	28 (24-57)	24 (24-25)	24 (17-41)	0,011
Hialurano (ng/ml)	31 (12-56)	5 (3-10)	5 (2-8)	<0,0001*
Trombomodulina (pg/ml)	1.411 (878-2.237)	1.390 (21-1.746)	219 (21-601)	<0,0001‡
TNF- α (pg/ml)	15 (15-51)	15 (15-43)	23 (5-110)	0,85
IL-1 β (pg/ml)	4 (0,4-32)	0,4 (0,4-45)	4 (0,4-10)	0,788
IL-6 (pg/ml)	39 (12-129)	33 (6-83)	16 (6-41)	0,081
Teste positivo para Influenza A rt-PCR ou IgM	N = 17	N = 13	N = 35	P
Sindecano-1 (ng/ml)	24 (24-41)	23 (20-55)	24 (17-41)	0,36
Hialurano (ng/ml)	34 (16-62)	7 (4-15)	5 (2-8)	0,0009**
Trombomodulina (pg/ml)	1.374 (923-1.980)	1.292 (461-1.822)	219 (21-601)	0,0001‡‡
TNF- α (pg/ml)	15 (15-30)	15 (12-24)	23 (5-110)	0,68
IL-1 β (pg/ml)	4 (0,4-33)	4 (0,4-33)	4 (0,4-10)	0,94
IL-6 (pg/ml)	37 (12-83)	52 (6-95)	16 (6-41)	0,23

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; Sd: síndrome, IQR: intervalo interquartil; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1: interleucina-1beta; IL-6: interleucina-6; rt-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real; IgM: imunoglobulina M

* com SDRA vs sem SDRA p = 0,0002; com SDRA vs controle p<0,0001; sem SDRA vs controle p>0,99

‡ com SDRA vs sem SDRA p=0,57; com SDRA vs controle p<0,0001; sem SDRA vs controle p=0,0001

** com SDRA vs sem SDRA p= 0,003; com SDRA vs controle p=0,0009, sem SDRA vs controle p=0,15

‡‡ com SDRA vs sem SDRA p=0,62; com SDRA vs controle p<0,0001; sem SDRA vs controle p=0,0016

Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias entre os pacientes com rt-PCR positivo para Influenza A H1N1 pdm09

Biomarcadores, mediana (IQR)	Sd gripal com SDRA (n=12)	Sd gripal sem SDRA (n=3)	controles (n=35)	P
Sindecano-1	26 (20 – 42)	24 (24)	24 (17-40)	0,35
Hialurano	31 (14-53)	8 (5-10)	4 (2-8)	0,01
Trombomodulina	1098 (575-2050)	21 (21-1953)	219 (21-601)	0,001
TNF- α	15 (15 – 35)	15 (15)	22 (5-110)	0,58
IL-1 β	4 (0,4 – 9)	0,4 (0,4-36)	4 (0,4-9)	0,9
IL-6	39 (11-112)	78 (33-85)	16 (6-41)	0,09

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; Sd: síndrome, IQR: intervalo interquartil; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1: interleucina-1beta; IL-6: interleucina-6; rt-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

Tabela 7. Comparação dos níveis plasmáticos dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial e das citocinas inflamatórias entre sobreviventes e não sobreviventes do grupo síndrome gripal com SDRA

Biomarcadores, mediana (IQR)	Sd gripal com SDRA (n=30)	SDRA sobreviventes (n=15)	SDRA não sobreviventes (n=12)	P
Sindecano-1	26 (24 – 55)	24 (24-50)	40 (23-137)	0,59
Hialurano	32 (13-60)	30 (11-50)	31 (18-90)	0,39
Trombomodulina	1411 (878-2237)	1303 (547-1800)	1644 (986-2377)	0,39
TNF- α	15 (15 – 51)	15 (15-18)	27 (15-214)	0,26
IL-1 β	4 (0,4 – 32)	4 (0,4-98)	4 (0,4-49)	0,91
IL-6	39 (12-129)	32 (16-71)	104 (30-616)	0,05

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; Sd: síndrome, IQR: intervalo interquartil; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1: interleucina-1beta; IL-6: interleucina-6; rt-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real. SDRA não-sobreviventes: pacientes com óbito intra-hospitalar

Tabela 8. Desempenho diagnóstico dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial para identificação dos pacientes que desenvolvem síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) após um episódio de síndrome gripal.

Biomarcadores	OR (IC95%)	ASC (IC95%)	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
Hialurano $\geq 9,75$ ng/ml	15(5-43)	0,80(0,70-0,88)	80%(61-92)	79%(68-88)	70%(59-79)	87%(76-93)
Trombomodulina ≥ 817 pg/ml	9(3-25)	0,73(0,64-0,82)	83%(65-94)	63%(51-74)	58%(50-60)	86%(73-93)
Sindecano-1 ≥ 25 ng/ml	3(1-6)	0,62(0,51-0,72)	57%(37-74)	68%(56-78)	52%(40-63)	72%(62-80)

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; ASC: área sob a curva ROC; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

Figura 5. Fluxograma de inclusão dos pacientes e divisão dos mesmos nos grupos relacionados nesta investigação.

Figura 6. Presença de fator de risco no grupo síndrome gripal com SDRA e síndrome gripal sem SDRA.

Figura 7. Linha do tempo mostrando a evolução desde o início dos sintomas gripais dos pacientes com teste laboratorial positivo para Influenza A

Figura 8. Gráfico do tipo box-plot mostrando os níveis plasmáticos do hialurano (ng/ml) nos três grupos de estudo: síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome gripal sem SDRA e controle.

Figura 9. Gráfico de barras mostrando os níveis plasmáticos de hialurano (ng/ml) de acordo com a duração em dias do sintoma de dispneia no momento da admissão hospitalar, em sobreviventes e não-sobreviventes do grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo. As dosagens foram realizadas na admissão e relacionadas ao tempo em dias da queixa de dispneia.

Figura 10. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) comparando a acurácia diagnóstica dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial (hialurano, sindecano-1 e trombomodulina) na identificação dos pacientes que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) entre aqueles com síndrome gripal.

Figura 11. Gráfico do tipo box-plot mostrando os níveis plasmáticos da trombomodulina (pg/ml) nos três níveis de gravidade no grupo síndrome gripal com síndrome do desconforto respiratório agudo: leve, moderado e grave, de acordo com a definição de Berlim.

Figura 13. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os níveis plasmáticos de sindecano-1 (log10 ng/ml) e da citocina inflamatória interleucina-seis (IL-6, log10 pg/ml).

Figura 15. Mulher, 34 anos, sobrepeso (IMC: 29 Kg/m²). História de febre, mialgia, artralgia e odinofagia. No quarto dia evoluiu com dispneia com piora progressiva com necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica, ralação PO₂/FIO₂: 65. Evolui com hipoxemia refratária e óbito após um dia de admissão hospitalar (5 dias de sintomas). Foi confirmado H1N1 pdm09 na imunohistoquímica do tecido pulmonar. As dosagens dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial na admissão foram: sindecano-1 de 39 ng/ml, trombomodulina de 894 pg/ml e hialurano de 90 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateral (painel A). A histopatologia mostra pneumonite aguda com edema intersticial com exsudato neutrofílico (painel B) e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 16. Homem, 53 anos, com antecedente de etilismo e tabagismo. História de febre, mialgia, tosse e rinorréia. No sexto dia de evolução, evoluiu com dispneia, insuficiência respiratória com necessidade de intubação e ventilação mecânica, com relação PO_2/FIO_2 de 85. Evolui com hipoxemia refratária e choque circulatório e óbito após dois dias de hospitalização (oito dias de sintomas). Foi confirmado o H1N1 pdm09 na RT-PCR das secreções respiratórias. A dosagem dos marcadores de lesão do glicocálix mostrou: sindecano-1 de 18 ng/ml, trombomodulina de 1016 pg/ml e hialurano de 20 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateral (painel A). A histopatologia mostra pneumonite aguda com edema intersticial e exsudato neutrofílico (painel B) e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 17. Mulher, 37 anos, obesa ($\text{IMC: } 31\text{Kg/m}^2$), sem outras comorbidades. História de febre, mialgia, cefaleia há quatro dias da admissão evoluiu com síndrome do desconforto respiratório agudo (relação PO_2/FIO_2 : 57). Foi confirmado H1N1 pdm09 através de RT-PCR de swab da secreção de vias aéreas. Evoluiu com hipoxemia refratária mesmo com FIO_2 de 100% e PEEP elevada: 18 cmH_2O . Foi a óbito após cinco dias da admissão (nove dias do início) dos sintomas. A dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix na admissão foram: sindecano-1: 24 ng/ml ; trombomodulina 1262 pg/ml e hualurano: 32 ng/ml . A radiografia de tórax AP mostrou infiltrado pulmonar difuso bilateralmente (painel A). Na histopatologia foi observada penumonia aguda com edema intersticial (painel B), hemorragia alveolar e formação de membrana hialina (painel C).

Figura 18. Mulher, 55 anos, obesa (IMC: 35Kg/m²), hipertensa e diabética. História de febre, tosse, prostração, mialgia e odionofagia. Foi admitida com seis dias de evolução em insuficiência respiratória com necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica com relação PO₂/FIO₂ de 110). Foi confirmado H1N1 pdm09 através do RT-PCR das secreções das vias aéreas. Evolui com hipoxemia refratária e choque circulatório com óbito após nove dias da admissão (15 dias de sintomas). Dosagem dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial com sindecano-1 de 256 ng/ml, trombomodulina de 2674 pg/ml e hialurano de 27 ng/ml. A radiografia de tórax AP mostra infiltrado pulmonar difuso bilateralmente (painel A). Na histopatologia foi observado quadro de pneumonite aguda com intenso edema e hemorragia alveolar (painel B) com formação de membrana hialina e pneumonia organizante fibrinóide (painel C).

Figura 19. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre o perímetro da membrana hialina dividida pelo perímetro determinado pelos septos alveolares com os níveis plasmáticos de trombomodulina (pg/ml) nos quatro pacientes com síndrome gripal e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) que evoluíram a óbito e foram submetidos a necropsia. O painel A (hematoxilina-eosina) mostra uma membrana hialina preenchendo todo o espaço alveolar (400x) e o painel B (hematoxilina-eosina) mostra uma membrana hialina com menor dimensão em relação ao espaço alveolar (400x).

Figura 20. Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre o número de neutrófilos no septo alveolar definido pelo número de neutrófilos dividido pelo perímetro do septo alveolar com os níveis plasmáticos de hialurano (log 10 ng/ml) nos quatro pacientes com síndrome gripal e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) que evoluíram a óbito e foram submetidos a necropsia. O painel A mostra um septo alveolar (400x) com um número elevado de neutrófilos no seu interior e o painel B mostra um septo alveolar (400x) com número reduzido destas células.

Figura 21. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) comparando a acurácia prognóstica dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial (hialurano, sindecano-1 e trombomodulina) na determinação da mortalidade em 28 dias em pacientes com síndrome gripal. Somente o hialurano apresentou um desempenho adequado para predição da mortalidade neste grupo.

Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida em 28 dias em todos os pacientes com síndrome gripal (n=66 pacientes). A dosagem de hialurano > 19 ng/ml foi associada a um aumento significativo da mortalidade: risco relativo (RR): 6,95, intervalo de confiança de 95% (IC95%): 1,88-25,67, p=0,0017.

Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida em 28 dias no grupo de pacientes com síndrome gripal que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (n=30 pacientes). A dosagem de hialurano > 70 ng/ml foi associada há um aumento significativo da mortalidade: risco relativo (RR): 7,0, intervalo de confiança de 95% (IC95%): 2-23, p=0,0023.

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desencadeamento de SDRA após uma síndrome gripal, até hoje, não são completamente compreendidos e diversos fatores podem contribuir para a instalação dessa complexa entidade clínica. (23,30,38,96,97) Evidências crescentes apontam o papel-chave que o glicocálix endotelial pulmonar desempenha na manutenção da homeostasia e integridade da barreira alvéolo-capilar. (77,98) Estudos clínicos e experimentais mostram a participação central do glicocálix endotelial no controle da permeabilidade (54,55) e do tônus vascular (59,60,99), na regulação da adesão e migração de leucócitos (62,100), na adesão e agregação plaquetária (69,101); processos fisiopatológicos fundamentais na lesão pulmonar aguda e no desenvolvimento da SDRA. Existem evidências sobre a participação da lesão do glicocálix endotelial no estabelecimento da SDRA após sepse bacteriana. (48,77,102) No entanto, o papel desta estrutura na SDRA de etiologia viral ainda não havia sido investigado. A fim de preencher esta lacuna, este trabalho objetivou avaliar os marcadores de lesão do glicocálix endotelial em pacientes com síndrome gripal durante um período de epidemia de influenza A(H1N1)pdm09, que desenvolveram quadro de SDRA, com evidências de que o comprometimento desta estrutura está presente nestes pacientes.

5.1 Características clínicas, laboratoriais e histológicas da casuística

Neste estudo observacional, foram incluídos 66 pacientes com síndrome gripal, em período de circulação elevada do vírus influenza A(H1N1)pdm09. Dos 30 pacientes que evoluíram com manifestações respiratórias graves e foram diagnosticados com SDRA, a média da idade foi de 44 anos. No ano de 2016, momento em que nosso estudo foi iniciado, uma epidemia de influenza A(H1N1)pdm09 ocorreu no Brasil, com mais de 54.000 casos de gripe grave notificados, em grande parte, em adultos jovens previamente hígidos, cuja

mediana de idade foi de 39 anos. (103) Nos anos subsequentes, a circulação nacional voltou ao padrão de influenza sazonal, com menos da metade de notificação de casos graves, a maioria em idosos, com mediana de idade dos óbitos próxima a 60 anos, sendo que em mais de 75% dos casos, havia pelo menos um fator de risco associado a evolução desfavorável. (93) A amostra de nosso estudo foi compatível com a apresentação epidêmica da influenza.

O amplo espectro de gravidade clínica e a variedade da virulência com que se apresenta a cada ano, tornam a influenza um desafio à saúde pública. Anualmente, a gripe acomete 15% dos adultos e 30% das crianças, com maior circulação no inverno, assim chamada de influenza sazonal, causando doença benigna na maioria dos infectados. (14) Os principais grupos com risco de evolução desfavorável são idosos, portadores de doenças crônicas e crianças muito jovens (104), que num padrão habitual de influenza sazonal representam cerca de 80% dos casos graves. No entanto, em situações de epidemias e pandemias, os índices de morbimortalidade são muito mais elevados e apenas 15% dos óbitos apresentam fatores de risco conhecidos. (91) Em nossa investigação, 47% dos pacientes que evoluíram para SDRA apresentavam pelo menos um fator de risco para evolução desfavorável e 42% dos pacientes com síndrome gripal sem SDRA também apresentavam pelo menos um fator de risco para influenza grave, mostrando uma limitação destes critérios epidemiológicos, principalmente, durante epidemias.

Historicamente, após a emergência de uma pandemia de influenza, ondas pós-pandêmicas são observadas, com surtos de elevada mortalidade mesmo anos após a pandemia. (105) Na pandemia da gripe suína de 2009, a faixa etária acometida foi, principalmente, em indivíduos entre 15 e 50 anos, com idade média de 38 anos. (106) Cerca de metade dos pacientes que necessitaram de internação ou evoluíram a óbito não tinham qualquer condição médica preexistente. (107) O vírus influenza A(H1N1)pdm09, mesmo na era pós-pandêmica,

persiste apresentando ciclos com recrudescência de surtos epidêmicos com virulência elevada em adultos jovens. (108)

No Brasil, o Ministério da Saúde define que os indivíduos que fazem parte do grupo de risco são os seguintes: indivíduos com menos de cinco ou mais de 60 anos de idade; indivíduos com doença pulmonar crônica, incluindo asma; portadores de endocrinopatias, incluindo, diabetes mellitus tipo um e dois, portadores de doenças hematológicas, neurológicas, cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, indivíduos imunossuprimidos, transplantados e indivíduos com trissomia. No período de 1999, quando se deu início às campanhas de vacinação contra influenza, até 2010, esse era o grupo que tinha direito a vacinação anual anti-influenza de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde. Com a pandemia de 2009, dois outros grupos de alto risco para complicações e óbito ficou evidente: obesos e mulheres no ciclo gravídico-puerperal, especialmente, no terceiro trimestre e até 42 dias após o parto. (109)

A obesidade foi uma das comorbidades mais comumente reportadas em pacientes infectados por influenza A(H1N1)pdm09 admitidos em CTI em todo o mundo. (109) Em um estudo multicêntrico nos EUA, 62% dos pacientes notificados com infecção grave tinham $IMC > 30\text{kg/m}^2$. Na cidade de Nova Iorque, quase 60% dos pacientes que morreram de abril a julho de 2009 devido infecção por influenza A(H1N1)pdm09 eram obesos ou obesos mórbidos. (110) Um estudo experimental com modelo animal (111), demonstrou que ratos obesos apresentam replicação viral aumentada e maiores índices de infecção bacteriana secundária após infecção pelo vírus influenza, sugerindo que a gravidade observada na obesidade está associada a uma série de eventos desregulados da resposta imune inata e das vias metabólicas que levam à lesão pulmonar aguda. Em nosso estudo, um terço dos pacientes com síndrome gripal e SDRA apresentavam obesidade.

De forma ainda pouco esclarecida, gestantes também foram um grupo de elevado risco para evolução desfavorável após infecção pelo vírus influenza e, na pandemia de 2009, apresentaram morbimortalidade assustadora. Comparadas à população geral, gestantes tiveram maior necessidade de hospitalizações, maior indicação de internação em CTI, elevados índices de parto pré-termo e mortalidade fetal e neonatal e uma mortalidade pelo menos cinco vezes maior que a população geral. (112) Esse fato motivou maiores investigações, que com o advento do estudo de *proteomics* na influenza grave, foi encontrado um padrão de moléculas associado a alterações na via do metabolismo de lipídios, que parece contribuir para a replicação viral aumentada e infecção grave. Gestantes e obesos, que tem níveis reduzidos de adiponectina, tem exatamente o perfil lipídico associado ao favorecimento de replicação viral. (113–115) Na nossa casuística, nenhuma gestante ou puérpera foi incluída.

Assim, a partir de 2011, a vacinação se estendeu, e hoje, está disponível, além dos grupos supracitados, para trabalhadores da saúde, professores, povos indígenas, população privada de liberdade e funcionários do sistema prisional. (116)

Estudos brasileiros *post-mortem* de vítimas da pandemia de 2009 (117) e da epidemia de 2012 (118) que evoluíram com SDRA, encontrou uma mediana de idade de 34 anos e 35,5 anos, respectivamente. Apesar de extensa investigação nestes e em outros estudos, as características que mais diferem entre a influenza epidêmica da influenza sazonal não são as características histopatológicas observadas, mas, essencialmente, a distribuição não habitual da faixa etária acometida por gripe grave. (104) As características histopatológicas observados no exame necroscópico dos quatro pacientes do nosso estudo, são condizentes com achados anteriores: presença de dano alveolar difuso em graus variáveis, bem como pneumonite intersticial, presentes em todos os casos estudados. A presença de áreas com

hemorragia alveolar, necrose em bronquíolos e septos alveolares e presença de atelectasias também foi encontrada na maioria dos casos, assim como em outras séries. (117–121)

Os principais sintomas observados no nosso estudo foram febre (93%), tosse (87%), mialgia (60%), prostração e perda de apetite (63%) e cefaleia (57%). A presença de dispneia (97%), taquicardia (FC 104 ± 21 bpm) e taquipneia (FR 32 ± 10 ipm) foram significativamente mais frequentes no grupo com síndrome gripal e SDRA, com valor $p < 0,001$. A duração dos sintomas até procura por atendimento médico foi em média de 4-5 dias, momento também referido por outros autores (11,106). A dispneia foi referida, em média, no 4º dia de sintoma, que evoluiu com rápida deterioração do quadro respiratório e necessidade de ventilação mecânica invasiva em 70% dos casos, com intubação nas primeiras 24h da admissão hospitalar em 53% dos casos. A evolução fulminante da falência respiratória é frequentemente observada em quadros de influenza grave. (122,123) A experiência com a postergação da intubação e uso ventilação não-invasiva em pacientes com hipoxemia refratária e o uso de corticoterapia mostraram associarem-se a piores desfechos na SDRA induzida por influenza. (124–126)

Metade dos pacientes com síndrome gripal que evoluíram com SDRA não referiram sintomas rinofaríngeos e uma minoria apresentou artralgia (20%), sintomas gastrointestinais (20%) e oculares (7%). Esse quadro clínico foi semelhante a outros relatos na literatura (117,118,127,128), sendo os principais sintomas de indivíduos que evoluem com gravidade a presença de febre, tosse, dispneia e mialgia. Ressalta-se que também nesses outros trabalhos a queixa de rinorreia e sintomas de via aérea alta, como dor de garganta, foi presente numa minoria dos pacientes que evoluíram com SDRA, em cerca de 20% dos casos.

5.2 Confirmação da etiologia viral

A confirmação laboratorial da infecção viral por influenza foi realizada através do teste sorológico e do teste molecular no presente estudo. Apesar da avaliação dos títulos de anticorpos IgM não ser validada para a prática clínica, ela é considerada útil em surtos e em estudos clínicos (79,129–131). Vikerfors T. *et al.* (132) mostrou que a detecção de IgM anti-influenza A aumentou a acurácia diagnóstica em relação a imunofluorescência para antígenos virais na secreção nasofaríngea. Um estudo japonês avaliando o impacto prognóstico da influenza em uma coorte prospectiva também utilizou-se do método sorológico somado a rt-PCR para análise de dados dos pacientes. (133) Assim, na nossa casuística, 55% dos pacientes incluídos com síndrome gripal apresentaram comprovação laboratorial de infecção recente pelo vírus influenza A. O método considerado padrão-ouro para confirmação diagnóstica atual é o rt-PCR, o qual foi realizado apenas em 73% dos pacientes, com positividade em 31% das amostras, em que o vírus influenza A(H1N1)pdm09 foi identificado em todos estes pacientes.

Apesar da baixa confirmação diagnóstica, a baixa detecção do agente etiológico é uma realidade presente na prática médica atual. Em um estudo conduzido pelo CDC (90), para investigação da etiologia de pneumonia adquirida na comunidade, nenhum patógeno foi identificado em 62% dos casos, mesmo após extensa investigação e ampla disponibilidade de métodos de elevada sensibilidade e especificidade. No Brasil, a positividade média das amostras coletadas para realização do teste molecular é de cerca de 20%. (103)

Não obstante, ressaltam-se alguns pontos que favorecem a possibilidade de uma parcela dos nossos casos representarem resultados falsos-negativos. 1. Os pacientes com síndrome gripal que evoluíram com SDRA chegaram no hospital com cinco dias de sintomas, momento em que a sensibilidade da técnica por rt-PCR reduz acentuadamente; 2. Apenas 17% dos pacientes com síndrome gripal com SDRA tiveram aspirado traqueal colhido, sendo

a maioria das amostras obtidas através de swab naso-faríngeo. É relatado que até 10% dos pacientes com influenza grave que tiveram swab negativo, apresentavam secreção traqueal com rt-PCR positivo (134); 3. O método de processamento das amostras estabelecida pelo Laboratório Regional do IAL de Ribeirão Preto pode ter implicado um prejuízo à sensibilidade, já que era realizado inicialmente a IFD para posterior confirmação com rt-PCR nos casos positivos e em 10% dos casos negativos. Assim, foi utilizado um teste de triagem de sensibilidade inferior ao teste para confirmação subsequente. E ainda, como para realização da IFD, as amostras deveriam ser encaminhadas no dia da coleta e não poderiam ser congeladas, isso pode ter contribuído para um encaminhamento de um número menor de amostras.

Por fim, a cuidadosa seleção clínica dos pacientes, somada a elevada circulação do vírus influenza A(H1N1)pdm09 no período de inclusão destes pacientes, faz-nos acreditar que a não-confirmação da infecção pelo método rt-PCR em parte dos pacientes não prejudicou a investigação.

5.3 Evolução, complicação, internação em CTI e mortalidade

Assim como já relatado em outros estudos, os pacientes que evoluíram com SDRA após síndrome gripal apresentavam desde o primeiro dia de internação índices prognósticos e grau de disfunção orgânica elevados, com uma média do escore de APACHE II (do inglês, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) de $15,5 \pm 9,9$; semelhante ao estudo de Perz-Padilla *et al.* (106), que foi de 14; e média do escore de SOFA (do inglês, Sequential Organ Failure Assessment) de $6,8 \pm 4,0$; próximo aos valores encontrados pelo mesmo autor, de 6. Entre os não sobreviventes, foram encontrados valores ainda maiores, de 20 para o escore de APACHE II e 9 para o escore de SOFA, demonstrando uma gravidade clínica ainda maior.

Todos os pacientes receberam tratamento antiviral com oseltamivir, no entanto, apenas 7% recebeu a medicação dentro do tempo recomendado de 48h do início dos sintomas. Estudos apontam que o atraso de um dia é associado a piores desfechos e é um fator preditor independente de mortalidade em diversos trabalhos. (135–138) A maioria dos pacientes recebeu antibioticoterapia para cobertura de *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, bactérias comumente relatadas como as grandes causadoras de pneumonia bacteriana secundária após infecção pelo vírus influenza.

No nosso estudo, todas as indicações de internação em CTI foram por falência respiratória. Apesar da potencial ocorrência de outras complicações associada ao influenza, com encefalite, miocardite e miosite, a grande causa responsável pelas internações em CTI em nosso e em outros estudos foi a hipoxemia refrataria e evolução para SDRA. (123,139–142) A média de internação hospitalar foi de 18 dias, para os pacientes com síndrome gripal com SDRA, variando de 2 a 66 dias, e de dois dias, variando de 3 a 16 dias, para os paciente com síndrome gripal sem SDRA. Um terço dos pacientes com SDRA evoluíram a óbito dentro de 28 dias.

Foram observadas algumas diferenças em relação aos exames laboratoriais gerais entre os grupos com e sem SDRA. Pacientes que evoluíram com SDRA apresentam linfopenia importante, com número absoluto médio de 900 células/mm³. Linfopenia também foi um achado encontrado por outros trabalhos. (117,118) Perez-Padilla *et al.* (106) encontraram linfopenia inferior a 1000 células/mm³ em quase dois terços dos pacientes. Níveis plaquetários mais baixos também foram observados nos pacientes com síndrome gripal e SDRA em relação ao grupo sem SDRA (168mil plaquetas/mm³ vs. 210 mil plaquetas/mm³). Outras alterações laboratoriais observadas, foram os níveis de proteína C reativa (PCR), desidrogenase láctica (LDH) e albumina, achados também compatíveis com dados prévios da literatura.(118) Pacientes que evoluíram com SDRA apresentaram níveis séricos mais

elevados de PCR (12 mg/dl vs. 2,2 mg/dl) e de LDH (1059mg/dl vs. 372 mg/dl) e níveis menores de albumina plasmática (3,2 mg/dl vs. 4,3 mg/dl) em relação aos pacientes com síndrome gripal sem SDRA. Os níveis de PCR já foram estudados a fim de auxiliar a avaliação de pacientes com suspeita de infecção por influenza na unidade de emergência. Apesar de interessante a iniciativa de associar variáveis clínicas e laboratoriais, a predição foi muito baixa e não conseguiu distinguir causas infecciosas bacterianas. (143,144)

Cerca de metade dos pacientes evoluiu com lesão renal aguda e foi significativamente mais presente no subgrupo SDRA não-sobreviventes, complicação também bastante presente em não-sobreviventes de outras análises. (106) Outra complicação, até hoje, não muito bem compreendida, mas consistentemente documentada há décadas em investigações sobre a infecção por influenza é a discrasia sanguínea, com tendência aumentada a fenômenos trombóticos e hemorrágicos. Na nossa investigação, uma parcela de pacientes, 20% dos casos de síndrome gripal com SDRA, apresentou quadros associados a distúrbios da coagulação, com diagnósticos de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar, coagulação intravascular disseminada, hemorragia alveolar difusa e hemorragia digestiva, eventos relevantes durante a internação, com aumento de necessidade de dias de internação hospitalar.

5.4. Evidências da lesão do glicocálix endotelial na SDRA

De todos os tecidos de mamíferos, o pulmão é o que apresenta as mais altas concentrações de GAGs, o que coincide com um dos maiores glicocálix de leitos capilares, com tamanho estimado de 1,5 μm na microvasculatura alvéolo-capilar (145,146), enquanto que outros capilares extra-pulmonares, a estimativa é de um tamanho de cerca de 0,6-0,8 μm (147,148); o que pode representar a importância evolutiva dos mecanismos do glicocálix endotelial em minimizar o fluxo transvascular de fluido, onde seria extremamente deletério

para as trocas gasosas, e ainda, em favorecer a tolerância imune, contribuindo para a baixa adesão leucocitária frente à elevada carga de partículas constantemente inaladas. (77)

A maneira que o glicocálix endotelial contribue para a homeostasia vascular é diretamente dependente da estrutura de seus componentes. A infusão de hialuronidase, heparinase e condroitinase em veias de ratos, em um estudo feito por Gao e Lipowsky (149), a fim de se avaliar a permeabilidade do glicocalix endotelial, demonstrou uma redução da espessura do glicocalix após cada tratamento, no entanto, apenas a hialuronidase e condroitinase foram capazes de alterar a permeabilidade vascular, sugerindo que o hialurano e o sulfato de condroitina contribuem de forma importante nesse processo.

No pulmão, o hialurano é encontrado em elevadas concentrações, a maior parte incorporada ao glicocálix endotelial e a matrix extracelular. (150) Os níveis plasmáticos, em condições normais, são baixos, com clearance hepático e renal quando caem na circulação. Essa molécula é altamente hidrofílica, capaz de se ligar mais de mil vezes seu peso à água, e assim, apresenta propriedade altamente viscosa, sendo um dos grandes responsáveis pela integridade biomecânica do glicocálix endotelial. No entanto, essas características são extremamente dependentes de seu peso molecular. O hialurano de alto peso molecular, de mais de 1000 kDa, apresenta efeitos protetores de barreira, enquanto que o hialurano de baixo peso molecular, com menos de 500 kDa, apresenta efeitos inflamatórios e promotor de migração celular. (151)

Um estudo experimental com modelo animal de lesão pulmonar induzida por LPS (152), mostrou elevação dos níveis de hialurano de baixo peso molecular no plasma e no lavado broncoalveolar de animais com SDRA, sugerindo seu papel na manutenção da barreira alveolo-capilar. Outros estudos corroboraram essa hipótese, Singleton *et al.* (153) mostraram através de diversos experimentos *in vitro* e em modelo animal, que o hialurano de alto peso molecular inibe a atividade enzimática de proteases regulatórias da coagulação. Mostraram

ainda que a deleção de CD44 em camundongos, sítio de ligação do hialurano na membrana da célula endotelial, leva a aumento da permeabilidade vascular pulmonar, e que essa molécula pode estar associada a caveolina-1, de forma que alterações na sinalização hialurano/CD44 vão alterar a conformação do citoesqueleto e a modulação do tônus vascular. O pré-tratamento, com administração intravenosa e intratraqueal de hialurano de alto peso molecular, foi capaz de proteger contra o edema pulmonar em modelo de SDRA induzida por LPS. Bai *et al.* (154), em modelo animal de lesão pulmonar induzida pela ventilação (VILI, do inglês, ventilator-induced lung injury), mostrou que hialurano de baixo peso molecular apresentou correlação com infiltração leucocitária aumentada. Além disso, a expressão das três enzimas responsáveis pela síntese de hialurano, as hialurano sintases 1, 2 e 3, estão alteradas em doenças pulmonares, como hipertensão arterial pulmonar e hiperresponsividade brônquica. (155) Em nossa investigação, também mostramos uma correlação entre os níveis plasmáticos de hialurano e a infiltração neutrofílica do septo alveolar nos casos com SDRA que evoluíram a óbito.

Assim, os fenômenos observados na SDRA induzida por vírus respiratório, de edema pulmonar exuberante, infiltração leucocitária aumentada e tônus vascular aberrante, com áreas de hemorragia e trombose microvascular poderiam ser explicadas pela degradação do glicocálix endotelial pulmonar, especialmente pela desintegração da rede polimérica do hialurano. Em nosso estudo, foi evidenciado uma elevação significativa dos níveis de hialurano em pacientes com síndrome gripal com SDRA, em média de 31 ng/ml, em comparação com pacientes com síndrome gripal sem SDRA, que foi em média cerca de 5 ng/ml. Produtos da degradação de hialurano, que formam as moléculas de baixo peso molecular, podem induzir produção de espécies reativas de oxigênio e a ativação de células inflamatórias, com liberação de citocinas, metaloproteinases, que vão, de forma subsequente,

levar a mais degradação do glicocálix endotelial, contribuindo para lesão adicional e propagação do insulto.

Outros estudos em humanos também encontraram elevação do hialurano em outros contextos clínicos, no entanto, as evidências até hoje vêm de estudos relacionados principalmente à sepse bacteriana, em que o sítio primário da lesão é o endotélio. (150,156,157) Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar SDRA por lesão direta de etiologia viral. Ainda assim, Schmidt *et al.* (158) em um estudo com 17 pacientes com insuficiência respiratória aguda, observaram que os níveis de hialurano e heparan-sulfato estavam significativamente mais elevados em pacientes com SDRA. Foi demonstrado ainda que o padrão de glicosaminoglicanos circulantes varia entre o tipo de insulto sofrido. Pacientes com lesão pulmonar indireta apresentaram níveis mais elevados de glicosaminoglicanos sulfatados, enquanto que pacientes com SDRA por lesão direta tiveram níveis de hialurano significativamente mais elevados, o que também foi corroborado pelo nosso estudo.

Yagmur *et al.* (159), em um estudo observacional em CTI, encontrou que pacientes sépticos tinham níveis de hialurano muito mais elevados ($n=97$, $344 \mu\text{g/ml}$ [2-2641]) quando comparados a pacientes sem SIRS ($n=20$, $115 \mu\text{g/ml}$ [10-2457]); $p = 0,01$. Os níveis de hialurano nesse estudo apresentou correlação com gravidade, avaliada através do escore de SOFA ($\rho = 0,28$, $p = 0,001$) e com os níveis de procalcitonina, PCR, IL-6 e IL-10, porém também não demonstram correlação com mortalidade. Nelson *et al.* (160), comparando 24 pacientes com choque séptico e 24 controles, encontrou que os níveis de hialurano estavam significativamente mais elevados em pacientes sépticos, $p<0,001$, e os níveis foram mais altos em não-sobreviventes que em sobreviventes, $p = 0,006$.

Outro estudo observacional de Schmidt *et al.* (102), comparando 25 pacientes com trauma grave com 30 pacientes com choque séptico, encontrou que os pacientes com choque

séptico apresentavam níveis urinários de hialurano mais elevados que pacientes traumatizados, $p < 0,05$. Os pacientes que evoluíram com lesão renal aguda apresentavam níveis muito mais elevados de hialurano; $p = 0,01$. Não-sobreviventes tiveram níveis plasmáticos de hialurano mais elevados que sobreviventes, $p < 0,05$.

Outro achado interessante de nossa investigação foram os níveis de trombomodulina, que se mostraram significativamente mais elevados em pacientes com síndrome gripal que em controles (1356 vs. 219, $p < 0,0001$). A trombomodulina é uma proteína transmembrana presente na célula endotelial e é altamente expressa em capilares pulmonares, e facilita a conversão de proteína C em proteína C ativada. (161) Assim, contribui para manter um *status* anti-trombótico no microambiente pulmonar. Em condições normais, baixos níveis de trombomodulina solúvel circulam no plasma. O glicocálix endotelial pode servir de reservatório também para trombomodulina solúvel. (46) Assim, níveis elevados de trombomodulina tem sido relacionados a lesão endotelial, mas mesmo situações em que a célula endotelial é preservada, níveis elevados de trombomodulina podem ser encontrados após lesão do glicocálix endotelial, com derramamento dessa molécula na circulação sanguínea. Níveis elevados de trombomodulina também foram encontrados na CIVD e na trombose vascular. (162) Em nossa investigação, os níveis plasmáticos de trombomodulina mostraram-se elevados nos pacientes com síndrome gripal; os níveis de trombomodulina apresentaram correlação com a gravidade da SDRA, estando mais elevado nos pacientes com SDRA moderada/grave e com maior prejuízo nas trocas gasosas, assim como, houve uma correlação dos níveis deste biomarcador com o perímetro da membrana hialina avaliado através de histometria dos pacientes que evoluíram a óbito.

Na sepse, a trombomodulina foi capaz de prever disfunção de múltiplos órgãos e mortalidade. (163) Na SDRA, níveis elevados de trombomodulina também se associaram a mortalidade e suporte ventilatório prolongado. (164) Um estudo em população pediátrica com

SDRA, encontrou níveis de trombomodulina mais elevados em pacientes com SDRA por lesão indireta quando comparado a lesão direta (100 ng/mL vs. 86 ng/mL, $p=0,02$). Os níveis de trombomodulina apresentaram correlação com disfunção orgânica ($\rho=0,37$, $p<0,01$) e foram capazes de prever mortalidade nos pacientes com SDRA por lesão indireta. (OR 2,7 por log da concentração da trombomodulina, $p=0,02$). (164) Outro estudo em SDRA em adultos, encontrou níveis mais elevados de trombomodulina em não-sobreviventes comparado a sobreviventes (147 (IQR, 95–218) vs. 89 (56–129) ng/mL, $p < 0,0001$). A adição dos níveis de trombomodulina junto com o escore de APACHE III melhorou a discriminação de 77 para 83%, $p < 0,03$, apesar de não mostrar associação com gravidade da SDRA.

Os achados do nosso estudo são consistentes com as evidências atuais, que sugerem o *status* pró-trombótico esteja associado a elevação dos níveis de trombomodulina (46,150), proveniente do componente solúvel presente no glicocálix endotelial degradado e da própria lesão endotelial, podendo contribuir no desencadeamento de fenômenos trombóticos observados em pacientes com infecção por influenza.

O sindecano-1 é o marcador de lesão do glicocálix endotelial mais estudado em diversos contextos clínicos, inclusive na SDRA; no entanto, todos relacionados à etiologia bacteriana da SDRA por lesão direta. No nosso estudo, os níveis médios de sindecano-1 no grupo com síndrome gripal com SDRA, apesar de mais elevados em relação ao grupo síndrome gripal sem SDRA, foi bastante inferior aos níveis previamente reportados de SDRA bacteriana. Este achado nos remete a pensar que o mecanismo de lesão do glicocálix endotelial durante a infecção viral possa vir a ser diferente daquele observado durante infecções bacterianas.

Em um estudo com pacientes sépticos, Puskarich *et al.* (165) compararam os níveis de sindecano-1 entre pacientes que necessitaram de intubação e aqueles que não necessitaram e também não encontraram diferença significativa entre os grupos. O que apresentou diferença

foram os níveis de sindecano-1 em pacientes que desenvolveram lesão renal aguda, significativamente maiores do que naqueles que não desenvolveram esta complicação (193 ng/mL [IQR 63-441] vs 93 ng/mL [IQR 23-187], $p < 0,001$). Outro estudo, mostrou níveis mais elevados de sindecano-1 em pacientes com SDRA por lesão indireta secundária à sepse não-pulmonar em comparação com SDRA por lesão direta secundária a pneumonia bacteriana. Sallisami, *et al.* (166), em um estudo observacional prospectivo com 20 pacientes sépticos e 20 controles, pacientes adultos intubados com choque séptico tiveram níveis de sindecano-1 significativamente mais elevado do que controles saudáveis e também apresentaram correlação significativa dos níveis de sindecano-1 com o escore SOFA no primeiro dia da admissão na UTI ($r = 0,654$, $p < 0,002$). Murphy *et al.* (167) encontraram que os níveis de sindecano-1 estavam fortemente associados a disfunção orgânica e morte no subgrupo de pacientes com SDRA secundária a sepse não-pulmonar.

5.4 O processo fisiopatológico da instalação da SDRA após infecção pelo vírus influenza

O vírus influenza, quando consegue atingir os alvéolos, atinge primariamente os pneumócitos tipo I e II. Especialmente as cepas que estabelecem a ligação da hemaglutinina com a membrana celular via ligação alfa-2,3 com o ácido siálico, apresentam tropismo que acomete principalmente pneumócitos tipo II. Estudos *in vitro* também mostraram que a infecção de pneumócitos por influenza levou a diminuição da atividade dos canais ENaC na superfície apical dessas células, um dos grandes regulares epiteliais do clearance de fluido nos alvéolos, que pode também ser mediado pela hemaglutinina e pelos canais iônicos M2 do vírus. (89)

O vírus influenza também pode ativar vias de morte celular, tanto apoptose, como necrose, o que levaria a destruição da arquitetura da barreira alvéolo-capilar, no entanto, isso parece ser mais importante no epitélio brônquico, o que é compatível com os achados em

autópsia do nosso e de outros estudos. (117,120,139) Estudos *in vitro* com células epiteliais de bronquíolo e traqueia e estudos em modelo animal com ferrets infectados por influenza A, demonstraram uma elevação nos níveis de TNF-alfa, CXCL10, IL-6, IL-8, CCL5, entre outras quimiciocinas, que poderiam recrutar células inflamatórias e assim levariam a quebra da barreira alvéolo-capilar, entretanto, os mecanismos através do qual, as citocinas inflamatórias causam a repercussão na barreira alvéolo-capilar não está compreendido. (168)

Estudos *in vitro* com o vírus influenza A(H5N1) mostraram que a infecção do pneumócito foi capaz de induzir aumento na expressão de E-selectina e P-selectina no endotélio, mas isso não aconteceu com estudos com o influenza A(H1N1), tanto na cepa sazonal quanto na cepa pandêmica de 1918. (169) A ativação do endotélio parece ser um processo fisiopatológico central na instalação da SDRA. Pela proximidade da célula endotelial com os alvéolos, este processo parece ocorrer através de mediadores produzidos pelos pneumócitos tipo I e II. Contudo, a infecção direta da célula endotelial pelo vírus influenza não pode ser descartada como mostrada em alguns estudos como por exemplo de Susan M. Armstrong *et al.*. (170) A infecção viral da célula endotelial pelo influenza parece conseguir desencadear a produção de citocinas pela célula endotelial, como CCL2, CXCL10, interferon gama, IL-6, TNF-alfa, que recruta leucócitos.

Neutrófilos também já foram muito estudados na SDRA por outras etiologias, e na influenza, camundongos depletados de neutrófilos evoluíram com replicação viral descontrolada e desfechos desfavoráveis. (171) Entretanto, seu papel nos mecanismos de lesão da barreira alvéolo-capilar parecem estar implicados principalmente na liberação de metaloproteinases. Em estudos em modelo animal, camundongos deficientes de metaloproteinases apresentaram menos edema pulmonar que animais controles após infecção por influenza. (172) Já foi descrito na literatura científica que metaloproteinases podem clivar

diretamente o sindecano-1 na sua inserção na célula endotelial, desestabilizando a estrutura do glicocálix endotelial. (173–175)

Eric Schimdt *et al.* (52), estudando a ativação neutrofílica em modelo experimental intravital, sugeriu que na presença de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), como material genético viral, as células endoteliais na microcirculação pulmonar seriam capazes de reconhecer e ativar estoques endógenos de heparanase-1, que então, degradaria heparan-sulfato do glicocálix endotelial pulmonar, com redução da espessura dessa camada a ponto de permitir exposição de sítios de ligação de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, levando ao influxo de leucócitos e perda da função da barreira alvéolo-capilar, com edema intersticial e extravasamento de fluido para o espaço alveolar.

Outro achado interessante não completamente elucidado foi o estudo de Akaike *et al.* (176), que mostrou uma redução na gravidade e na mortalidade em um modelo experimental de influenza fatal após a inibição da óxido nítrico (NO) sintetase. Ratos knockout para NO sintetase indutível 2 (NOS2) não apresentaram SDRA após infecção por influenza, ao contrário dos camundongos controles. Estudos de Pahakis *et al.* (177), investigando a mecanotransdução em células endoteliais de bovinos, encontraram que a remoção enzimática de hialurano, heparan-sulfato e ácido siálico pode individualmente bloquear a produção de NO induzido pela tensão parietal.

Se os quadros de SDRA resultam da resposta inflamatória do hospedeiro e das alterações da microcirculação, mais do que da lesão direta pelo vírus, o tratamento não deve ser centrado apenas na terapia antiviral. Novas estratégias terapêuticas com alvo do endotélio pulmonar representam abordagem promissora.

5.6. Potenciais mecanismos de lesão do glicocálix endotelial durante infecção viral

Os mecanismos responsáveis pela lesão do glicocálix endotelial na SDRA secundária à infecção pelo influenza ainda não estão esclarecidos. Pelos dados da literatura científica parece que diferentes mecanismos lesivos podem desestruturar o glicocálix endotelial.

As citocinas inflamatórias parece ser um mecanismo lesivo ao glicocálix endotelial, inclusive observamos uma correlação entre os níveis plasmáticos de sindecano-1 com TNF- α e IL-6 em nossa investigação. Na sepse, Steppan *et al.* (178) também encontrou níveis de sindecano-1 significativamente maiores nos pacientes sépticos, e mostrou uma correlação positiva com os níveis de IL-6 e TNF- α . Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β podem ativar metaloproteinases que conseguem clivar diretamente proteoglicanos, como o sindecano-1. Contudo, outros mecanismos além das citocinas inflamatórias podem participar deste processo de degradação do glicocálix endotelial.

Davenport *et al.* (179) identificaram duas assinaturas transcricionais distintas em pacientes admitidos em CTI com pneumonia e choque séptico. Interessantemente, não houve diferença entre os perfis inflamatórios ou tipo de infecção da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, IL6, IL1B. (35) Foi recentemente descrito que a infecção pelo vírus influenza em modelo animal em porcos, a expressão do TNF-alfa apresenta um pico no primeiro dia da infecção e reduz significativamente seus níveis em seguida. Se isso também for semelhante em humanos, isso pode explicar em partes nossos achados, já que os pacientes estavam no quarto e quinto dia da doença gripal e os níveis das citocinas inflamatórias teriam se elevado em uma fase mais precoce.

Outros mecanismos que poderiam contribuir para a lesão do glicocálix endotelial durante a infecção pelo vírus influenza são: a degradação de resíduos de ácido siálico pela neuraminidase (sialidase) do vírus influenza, e a ativação de hialuronidase e heparinase por vias independentes das citocinas inflamatórias, por mecanismos ainda a serem esclarecidos e a

destruição por reação cruzada das imunoglobulinas anti-influenza. Estudos recentes vem mostrando a lesão do glicocálix endotelial durante outras infecções virais, como por exemplo, durante infecção pelo vírus dengue, sendo que a lesão desta estrutura parece ser fundamental para as alterações da permeabilidade vascular observadas nesta doença. (73,74,180–182)

5.7 Biomarcadores para definição prognóstica após síndrome gripal

Atualmente, não existem biomarcadores disponíveis na prática clínica para identificar aqueles pacientes com síndrome gripal que apresentam um risco elevado para evolução desfavorável e instalação de SDRA e que mereceriam maior vigilância clínica. Os critérios epidemiológicos utilizados para identificação do grupo de risco apresentam inúmeras limitações, principalmente durante epidemias. Deste modo, é desejável o desenvolvimento de biomarcadores que ajudariam nesta estratificação. Os biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial, principalmente, o hialurano, é um potencial candidato para esta finalidade. Em nosso estudo, o hialurano foi um marcador prognóstico entre os pacientes com síndrome gripal de uma forma geral e entre os pacientes com síndrome gripal que desenvolveram SDRA. Contudo, para uma validação desta utilização é necessária a realização de estudos multicêntricos de coorte prospectiva, onde um grande número de pacientes com síndrome gripal tenham o nível plasmático de hialurano mensurado na fase precoce da infecção e sejam prospectivamente acompanhados para avaliação de desfechos clínicos como: hospitalização, desenvolvimento de SDRA, morte, etc.

5.8 Limitações do estudo

A presente investigação apresenta algumas limitações. Por ser um estudo em sua essência, observacional do tipo transversal, não permite a determinação definitiva de causalidade entre a lesão do glicocálix endotelial e a instalação da SDRA após uma episódio de síndrome gripal.

A identificação etiológica do vírus foi possível em um número restrito de pacientes, e o método empregado da imunofluorescência antes da rt-PCR pode ter contribuído para este achado.

Um reduzido número de pacientes que evoluiu a óbito foi submetido à autópsia. Contudo, esta é uma dificuldade crescente, principalmente, pela necessidade de concordância de três responsáveis que tem que consentir com a realização deste procedimento.

Não conseguimos documentar o *status* vacinal dos pacientes que evoluíram com SDRA, fato importante e relevante quanto a questões de saúde pública, permanecendo ignorado apesar da busca em todas as bases pesquisadas: prontuários eletrônico do HCFMRP-USP e sistema hygia da secretária municipal de saúde de Ribeirão Preto.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou pela primeira vez que pacientes que desenvolvem SDRA após síndrome gripal apresentam evidências laboratoriais de lesão do glicocálix endotelial, principalmente, com elevação significativamente estatística dos níveis plasmáticos de hialurano.

Os níveis plasmáticos de hialurano foram um marcador prognóstico em pacientes com síndrome gripal e em pacientes com SDRA secundária a infecção viral.

Mostrou-se evidências que a lesão do glicocálix endotelial correlaciona-se com processos fisiopatológicos centrais observados na SDRA, como a infiltração leucocitária no septo alveolar e a formação de membrana hialina.

Em conclusão, esses achados sugerem que o dano ao glicocálix endotelial ocorre durante a instalação da SDRA após síndrome gripal. O hialurano é um biomarcador promissor para ajudar a selecionar pacientes com risco elevado de desenvolvimento de SDRA após síndrome gripal. Novos estudos prospectivos, multicêntricos, com maior tamanho amostral, são necessários para validar a utilização clínica deste biomarcador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS*

*De acordo com normas de Vancouver – colocar no rodapé

1. Kash JC, Taubenberger JK. The Role of Viral , Host , and Secondary Bacterial Factors in Infl uenza Pathogenesis. Am J Pathol [Internet]. 2015;185(6):1528–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.030>
2. Cruz CM. A epidemia de gripe espanhola : um desafio à medicina baiana. 2008;945–72.
3. Monto AS, Webster RG. Infl uenza pandemics : History and lessons learned. 2013;
4. Maria L, Merchan-hamann E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira : breve histórico e caracterização dos cenários *. 2016;55(61):11–25.
5. Burns DAR, Arns CC, Lomar A V, Neto JT. No Title. 1967;58.
6. Dandachi D, Rodriguez-barradas MC. Viral pneumonia : etiologies and treatment. 2018;1–9.
7. Vincent EJ. Edited by J.-L.Vincent. 2017.
8. Choi S, Hong S, Ko G, Lee Y, Park HJ, Park S, et al. Viral Infection in Patients with Severe Pneumonia Requiring Intensive Care Unit Admission.
9. Hong H, Hong S, Ko G, Huh JW, Sung H, Kim S, et al. Viral Infection Is Not Uncommon in Adult Patients with Severe Hospital-Acquired Pneumonia. 2014;9(4).
10. Visseaux B, Burdet C, Voiriot G, Chougar T, Brugi O, Crestani B, et al. Prevalence of respiratory viruses among adults , by season , age , respiratory tract region and type of medical unit in Paris , France , from 2011 to 2016. 2017;1–15.

11. Luyt C-édouard, Combes A, Trouillet J, Nieszkowska A, Chastre J. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: Epidemiology, management and outcome. *Presse Med* [Internet]. 2011;40(12):e561–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2011.05.027>
12. Bresee J, Fitzner J, Campbell H, Cohen C, Cozza V, Jara J. Progress and Remaining Gaps in Estimating the Global Disease Burden of Influenza. 2018;24(7):1173–7.
13. Diseases I, Farrar J, Diseases T, Chi H, City M, Han AM, et al. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. 2005;1374–85.
14. No Title. p. <https://www.who.int/influenza/gip-anniversary/en/>.
15. Al-hazmi A. Challenges presented by MERS corona virus , and SARS corona virus to global health. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2016;23(4):507–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.019>
16. No Title. p. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6635a2.ht>.
17. Swerdlow D FL. Preparation for Possible Sustained Transmission of 2019 Novel Coronavirus Lessons From Previous Epidemics. *JAMA*. 2020;19426:2019–20.
18. Henderson WR, Chen L, Amato MBP, Brochard LJ. Respiratory Mechanics in Acute Respiratory Distress Syndrome. 2017;196(7):822–33.
19. Gattinoni L, Haren F Van, Larsson A, Mcauley DF, Ranieri M. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. 2016;
20. Brigham KL, Staub NC. Pulmonary Edema and Acute Lung Injury Research.

- 1998;157:109–13.
21. e [Internet]. Available from: <https://archive.org/details/9308214.nlm.nih.gov/page/n133>
 22. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. IN ADULTS. 1967;
 23. Of E, In E. CRITICAL CARE PERSPECTIVE FIFTY YEARS OF RESEARCH IN ARDS The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome A 50th Birthday Review. 2017;195(7):860–70.
 24. Cardinal-fern P. Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. 2017;14(6).
 25. Damage-the DA, Oxygen ROF, Factors R. REVIEW ARTICLE.
 26. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. Pulmonary Perspectives An Expanded Definition of the Adult Respiratory. 1988;(Hl 19155):720–3.
 27. Viana WN. Artigo Síndrome de Angústia Respiratória Aguda após Berlim Acute Respiratory Distress Syndrome after Berlin Resumo Críticas às Definições de Berlim. 24(21):31–5.
 28. Definition TB. Acute Respiratory Distress Syndrome. 2012;
 29. Matthay MA, Mcauley DF, Ware LB. Clinical trials in acute respiratory distress syndrome : challenges and opportunities. Lancet Respir [Internet]. 2017;5(6):524–34. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30188-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30188-1)
 30. Meyer NJ, Calfee CS. Review Novel translational approaches to the search for precision therapies for acute respiratory distress syndrome. Lancet Respir [Internet]. 2017;5(6):512–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30187-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30187-X)

31. Azevedo LCP, Park M, Salluh JIF, Rea-neto A, Souza-dantas VC, Varaschin P, et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units : a multicenter , prospective , cohort study. Crit Care [Internet]. 2013;17(2):R63. Available from: <http://ccforum.com/content/17/2/R63>
32. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Taylor B, Ware LB, Matthay MA. NIH Public Access. 2015;2(8):611–20.
33. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. 2017;195:331–8.
34. Sinha P, Delucchi KL, Thompson BT, Mcauley DF, Michael A, Francisco S, et al. HHS Public Access. 2019;44(11):1859–69.
35. Sarma A, Calfee CS, Ware LB. B i o m a r k e r s a n d P r e c i s i o n M e d i c i n e : State of the Art Biomarkers Precision medicine Prognostic enrichment Predictive enrichment. Crit Care Clin [Internet]. 2020;36(1):155–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.08.012>
36. Sweeney R Mac, Mcauley DF, Hospital RV. Acute respiratory distress syndrome. Lancet [Internet]. 2016;6736(16). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00578-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00578-X)
37. Article R. Acute Respiratory Distress Syndrome. 2017;
38. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. 2019;1(212).
39. Metwaly XSM, Cote A, Donnelly SJ, Banoei MM, Mourad AI, Winston XBW.

- Evolution of ARDS biomarkers : Will metabolomics be the answer ? 2020;(32):526–34.
40. Millar FR, Summers C, Grif MJ, Toshner MR, Proudfoot AG. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome : insights and therapeutic opportunities. 2016;462–73.
 41. West JB. Fragility of pulmonary capillaries. 2019;1–15.
 42. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli : structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2018;150(6):661–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9>
 43. Weibel ER. Occasional Essay It Takes More than Cells to Make a Good Lung. 2013;187:342–6.
 44. Levitzky MG. Pulmonary Physiology, 8th Edition. Lange Physiology Series.
 45. Curry FE, Adamson RH, Biology M. HHS Public Access. 2016;40(4):828–39.
 46. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Van Zandvoort MAMJ, Oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2007;454(3):345–59.
 47. Dane MJC, Berg BM Van Den, Lee DH, Boels MGS, Tiemeier GL, Avramut MC, et al. A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. 2019;956–66.
 48. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx : a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. 2019;1–12.
 49. Biochemical Laboratory,. 1939;

50. JH L. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* 1966;25(6):1773–83.
51. Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption , protection and regeneration : a narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* [Internet]. 2016;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13049-016-0239-y>
52. Schmidt EP, Lee WL, Zemans RL, Yamashita C, Downey GP. On , Around , and Through : Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity. 2011;334–47.
53. Schmidt EP, Kuebler WM, Lee WL, Downey GP. Adhesion molecules: Master controllers of the circulatory system. *Compr Physiol.* 2016;6(2):945–73.
54. Jacob M, Chappell D. Reappraising Starling: The physiology of the microcirculation. *Curr Opin Crit Care.* 2013;19(4):282–9.
55. Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: Evidence from enzyme treatments. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2000;278(4 47-4):1177–85.
56. Singh A, Satchell SC, Neal CR, Mckenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW. Glomerular Endothelial Glycocalyx Constitutes a Barrier to Protein Permeability. 2007;2885–93.
57. Van den Berg BM, Vink H, Spaan JAE. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res.* 2003;92(6):592–4.
58. Masouleh BK, Ten Dam GB, Wild MK, Seelige R, van der Vlag J, Rops AL, et al. Role of the Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan-1 (CD138) in Delayed-Type Hypersensitivity. *J Immunol.* 2009;182(8):4985–93.

59. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res*. 2003;93(10).
60. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JAE, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2003;285(2 54-2):722–6.
61. Zeng Y, Zhang XF, Fu BM, Tarbell JM. The Role of Endothelial Surface Glycocalyx in Mechanosensing and Transduction. 2018;
62. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;283(4 52-4):1282–91.
63. Mason McClatchey P, Schafer M, Hunter KS, Reusch JEB. The endothelial glycocalyx promotes homogenous blood flow distribution within the microvasculature. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2016;311(1):H168–76.
64. Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Iijima T. Hanae Kataoka, DDS, PhD, * Akira Ushiyama, PhD, † Yoshihiro Akimoto, PhD, ‡ Sachie Matsubara, § Hayato Kawakami, PhD, ‡ and Takehiko Iijima, DDS, PhD *. 2017;XXX(Xxx):1–10.
65. Iba T, Levy JH, Medicine D, Medicine D. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. 3111:0–2.
66. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio A, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care [Internet]*. 2015;19(1):26. Available from: <http://ccforum.com/content/19/1/26>
67. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and

- regional ischemia. *Circulation*. 2007;116(17):1896–906.
68. Sieve I, Münster-Kühnel AK, Hilfiker-Kleiner D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2017;(September):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28919014><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189117301805>
 69. Miranda CH, de Carvalho Borges M, Schmidt A, Marin-Neto JA, Pazin-Filho A. Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2016;247:184–8.
 70. Ostrowski SR, Pedersen SH, Jensen JS, Mogelvang R, Johansson PI. Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care* [Internet]. 2013;17(1):R32. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc12532>
 71. Rovas A, Lukasz A, Vink H, Urban M, Sackarnd J, Pavenstädt H. Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit – the GlycoNurse study. 2018;1–8.
 72. Rodriguez EG, Cardenas JC, Lopez E, Cotton BA, Tomasek JS, Ostrowski SR, et al. Early Identification of the Patient with Endotheliopathy of Trauma by Arrival Serum Albumin. *Shock* [Internet]. 2017 Oct 18 [cited 2017 Oct 26];1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00024382-9000000000-97961>
 73. Glasner DR, Ratnasiri K, Puerta-guardo H, Espinosa DA, Beatty PR, Harris E. Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. 2017;1:1–22.

74. Puerta-guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx , Leading to Hyperpermeability. 2016;1:1–29.
75. Wiesinger A, Peters W, Chappell D, Kentrup D, Reuter S, Pavenstädt H, et al. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. PLoS One. 2013;8(11):1–14.
76. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, Lieshout MHP Van, Hayden A, Levi M, et al. Tumor necrosis factor- α inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. 2009;202:296–303.
77. Larivière WB, Schmidt EP. The Pulmonary Endothelial Glycocalyx in ARDS : A Critical Role for Heparan Sulfate [Internet]. 1st ed. Vol. 82, Membranes in Pulmonary Vascular Disease. Elsevier Inc.; 2018. 33–52 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.005>
78. Lee N, Chan PKS, Lui GCY, Wong BCK, Sin WWY, Choi K, et al. Complications and Outcomes of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection in Hospitalized Adults : How Do They Differ From Those in Seasonal Influenza ? 2011;203:1739–47.
79. Paules C, Subbarao K. Seminar Influenza. 2017;6736(17):1–12.
80. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality : a modelling study. :1285–300.
81. Morens DM, Taubenberger JK. The mother of all pandemics is 100 years old (and going strong)! Am J Public Health. 2018;108(11):1449–54.
82. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. Nat Publ Gr

- [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
83. Forleo-neto E, Halker E, Paiva TM. *Influenza*. 2003;36(2):267–74.
 84. Paules C, Subbarao K. No Title. 2017;697–708.
 85. Pandemic HN, Gagnon A, Acosta E, Hallman S, Bourbeau R, Dillon LY, et al. crossm
Pandemic Paradox : Early Life H2N2 Pandemic Influenza Infection Enhanced
Susceptibility to Death during the 2009. 2018;9(1):1–15.
 86. Potter CW. A history of in - uenza. 2001;572–9.
 87. Tscherne DM, García-sastre A. Science in medicine Virulence determinants of
pandemic influenza viruses. 2011;121(1).
 88. Gregory DJ, Kobzik L. Influenza lung injury : mechanisms and therapeutic
opportunities. 2015;(21):1041–6.
 89. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. pathogenesis and implications for
treatment. :1463–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00186214>
 90. Jain S, Self RG, Donnelly HK, Williams DJ, Zhu Y, Arnold SR, Ampofo K, Waterer,
G W CEST. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S.
adults. *N Engl J Med*. 2015;373(5):415–27.
 91. Richardpebodyhpaorguk RGP, Mclean E, Zhao H, Cleary P, Bracebridge S, Foster K,
et al. Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and mortality in the United Kingdom : risk
factors for death , April 2009 to March 2010. 2010;(March):1–11.
 92. No. p. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinica>.
 93. Influenza NSDE. Influenza : Monitoramento até a Semana Epidemiológica 25 de 2019.

- 2019;1–10.
94. Schoenfeld DA, Bernard GR. syndrome. 2002;30(8).
 95. Imunologia C De, Virologia C De, Cesar C. Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010 Implementation and optimization of real time PCR for diagnosis of pandemic influenza A (H1N1) at Institu. 2010;69(1):131–5.
 96. Short KR, Kasper J, Aa S Van Der, Andeweg AC, Zaaraoui-boutahar F, Goeijenbier M, et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions. 2016;954–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01282-2015>
 97. Kollmus H, Pilzner C, Leist SR, Heise M, Geffers R, Schughart K. Of mice and men : the host response to influenza virus infection. Mamm Genome [Internet]. 2018;0(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-018-9750-y>
 98. Wang J, Wu A, Wu Y. Endothelial Glycocalyx Layer : A Possible Therapeutic Target for Acute Lung Injury during Lung Resection. 2017;2017.
 99. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. 2008;12(3):1–11.
 100. Lipowsky HH. Role of the Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte-Endothelium Adhesion. 2018;
 101. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: Searching for the sheddases. Br J Clin

- Pharmacol. 2015;80(3):389–402.
102. Schmidt EP, Overdier KH, Sun X, Lin L, Liu X, Yang Y, et al. Urinary Glycosaminoglycans Predict Outcomes in Septic Shock and Acute Respiratory Distress Syndrome. 2016;194:439–49.
 103. Vigilância S De. Epidemiológico. 2016;
 104. Manuscript A. NIH Public Access. 2008;499–522.
 105. Salto-quintana JN, Rivera-alfaro G, Sánchez-ramos EL, Gómez-gómez A, Noyola DE, Rivera-alfaro G, et al. Post-pandemic influenza-associated mortality in Mexico. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2019;00(00):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1589211>
 106. Leon SP De, Hernandez M, Quiñones-falconi F, Bautista E, Ramirez-venegas A, Rojas-serrano J, et al. Pneumonia and Respiratory Failure from Swine-Origin Influenza A (H1N1) in Mexico. 2009;
 107. Donaldson LJ, Rutter PD, Ellis BM, Greaves FEC, Mytton OT, Pebody RG, et al. Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ*. 2009;339(b5213):1–8.
 108. Buttignol M, Pires-neto RC, Calciolari R, Albino MB. Airway and parenchyma immune cells in influenza A (H1N1) pdm09 viral and non-viral diffuse alveolar damage. 2017;1–10.
 109. Karlsson EA, Marcelin G, Webby RJ, Schultz-cherry S. Review on the impact of pregnancy and obesity on influenza virus infection. 2012;449–60.

110. Louie JK, Winter K, Jean C, Glaser CA, Samuel MC, Rosenberg J, et al. Factors Associated With Death or Hospitalization Due to Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Infection in California. 2015;302(17).
111. Karlsson EA, Meliopoulos VA, Velde NC Van De. crossm A Perfect Storm : Increased Colonization and Failure of Vaccination Leads to Severe Secondary Bacterial Infection in. 2017;8(5):1–15.
112. Williams JL. HHS Public Access. 2015;18(7):1578–82.
113. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017;1–15.
114. Lyon B. HHS Public Access. 2017;19(2):254–66.
115. Sun X, Song L, Feng S, Li L, Yu H, Wang Q, et al. EBioMedicine Fatty Acid Metabolism is Associated With Disease Severity After H7N9 Infection. 2018;33:218–29.
116. Informe Técnico 21ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza Atualização Brasília , 06 de maio de 2019. 2019;1–38.
117. Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, Silva LFF, Schout D, Galas FRBG, et al. Lung Pathology in Fatal Novel Human Influenza A (H1N1) Infection. 2009;
118. Marchiori R, Sakuma C, Bredt DO, Menezes M, Campos F De. Influenza pandêmica A / H1N1 : análise comparativa de alterações histopatológicas pulmonares histopathological findings. 2012;10(45):306–11.

119. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A / H1N1pdm) Virus Infection in Japan : Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. 2010;67–71.
120. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol [Internet]. 2011;25(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2011.125>
121. Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y. Histopathological Findings of Lung with A / H1N1pdm09 Infection-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome in the Post-Pandemic Season. 2017;197–200.
122. Ramsey C, Kumar A. H1N1 : viral pneumonia as a cause of acute respiratory distress syndrome. 2011;617(January 2010).
123. Ramsey CD. In f l uenza an d En d emi c V i ra l P n eum on i a. 2013;29:1069–86.
124. Lansbury LE, Rodrigo C, Leonardi-bee J, Nguyen-van-tam J, Lim WS. Corticosteroids as Adjunctive Therapy in the Treatment of Influenza: An Updated Cochrane Systematic Review and Meta-analysis. 2019;1–9.
125. Rodrigo C, Leonardi-bee J, Nguyen-van-tam JS, Lim WS. Effect of Corticosteroid Therapy on In fl uenza- Related Mortality : A Systematic Review and. 2015;
126. Rodríguez A, Ferri C, Martin-loeches I, Trefler S, Magret M, Moreno G, et al. Risk Factors for Noninvasive Ventilation Failure in Critically Ill Subjects With Confirmed Influenza Infection. 2017;(C):1–9.

127. Reed C, Chaves SS, Perez A, Mello TD, Kirley PD, Aragon D, et al. Complications Among Adults Hospitalized With Influenza : A Comparison of Seasonal Influenza and the 2009 H1N1 Pandemic. 2014;1–9.
128. Monmany J, Rabella N, Margall N, Domingo P, Gich I, Vázquez G. Unmasking Influenza Virus Infection in Patients Attended to in the Emergency Department. 2004;(2):89–97.
129. Fragaszy EB, Warren-gash C, Wang L, Copas A, Dukes O, Edmunds WJ, et al. Cohort profile Cohort Profile : The Flu Watch Study. 2017;18(March 2016):1–11.
130. Krueger WS, Khuntirat B, Yoon I, Blair PJ, Chittagarnpitch M, Putnam SD, et al. Prospective Study of Avian Influenza Virus Infections among Rural Thai Villagers. 2013;8(8):1–7.
131. Document W. Prospective longitudinal cohort study of influenza infection during epidemic periods. :1–20.
132. Vikerfors T, Lindegren G, Grandien M, Logt JOSVANDER. Diagnosis of Influenza A Virus Infections by Detection of Specific Immunoglobulins M , A , and G in Serum. 1989;27(3):453–8.
133. Maruyama T, Fujisawa T, Suga S, Nakamura H. Outcomes and Prognostic Features of Patients With Influenza Requiring Hospitalization and Receiving Early Antiviral Therapy A Prospective Multicenter Cohort Study. Chest [Internet]. 2016;149(2):526–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.14-2768>
134. Rello J, Rodríguez A, Ibañez P, Socías L, Cebrian J, Marques A, et al. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1) v in

- Spain. 2009;13(5):1–9.
135. Margareth S, Sakurada A, Watanabe A, Lúcia M, Salomão M, Queiroz F, et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J Clin Virol* [Internet]. 2019;116(April):62–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
 136. Kumar A. Early versus late oseltamivir treatment in severely ill patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1): speed is life. 2011;(March):959–63.
 137. Lytras T, Mouratidou E, Andreopoulou A, Bonovas S. Effect of early oseltamivir treatment on mortality in critically ill patients with different types of influenza : a multi-season cohort study.
 138. Med LR. HHS Public Access. 2019;2(5):395–404.
 139. Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: Pathophysiology and epidemiology. *Crit Care*. 2019;23(1):1–7.
 140. Viasus D, Revuelta JAO, Martínez-montauti J, Carratalà J. y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2012;30(Supl 4):43–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(12\)70104-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(12)70104-0)
 141. Ambrosioni J, Bridevaux P, Wagner G, Mamin A, Kaiser L. Epidemiology of viral respiratory infections in a tertiary care centre in the era of molecular diagnosis , Geneva , Switzerland , 2011 – 2012. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2013;20(9):O578–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12525>
 142. Access O. Characteristics and outcome of ill critical patients with influenza A infection. 2018;8688:1–8.

143. Vasileva D, Badawi A. C-reactive protein as a biomarker of severe H1N1 influenza. *Inflamm Res* [Internet]. 2019;68(1):39–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1188-x>
144. Kao K. Procalcitonin and C-reactive protein cannot differentiate bacterial or viral infection in COPD exacerbation requiring emergency department visits. 2015;767–74.
145. Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, Gandjeva A, Perez MJ, Zemans RL, et al. NIH Public Access. 2013;18(8):1–20.
146. Ark INP, Hoe KIC, Eo HOS, Wang YOH, Ong EUS, Hn JIA, et al. Intravital imaging of a pulmonary endothelial surface layer in a murine sepsis model. 2018;9(5):300–10.
147. Yen WY, Cai B, Zeng M, Tarbel JM FB. Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels. *Microvasc Res*. 2012;83(3):337–46.
148. Salmon AHJ, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, et al. Loss of the Endothelial Glycocalyx Links Albuminuria and Vascular Dysfunction. 2012;1–12.
149. H GL and L. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc Res*. 2010;80(3):394–401.
150. Lennon FE, Singleton PA. Hyaluronan regulation of vascular integrity. 2011;1(3):200–13.
151. Garantziotis S, Brezina M, Castelnovo P, Drago L. Biomarkers in Lung Diseases : from Pathogenesis to Prediction The role of hyaluronan in the pathobiology and treatment of respiratory disease. 2016;27709.

152. Passmore MR, Byrne L, Obonyo NG, Hoe LES, Boon A, Diab SD, et al. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock. 2018;1–10.
153. Singleton PA, Mirzapouriazova T, Guo Y, Sammani S, Mambetsariev N, Lennon FE, et al. High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. 2010;(16).
154. Bai K, Spicer AP, Mascarenhas MM, Yu L, Ochoa CD, Garg HG, et al. The Role of Hyaluronan Synthase 3 in Ventilator-induced Lung Injury. 2005;
155. Singleton PA LF. Acute lung injury regulation by hyaluronan. J Allergy Ther. 2013;(Table 1):1–19.
156. Petrey AC, Motte CA De. Hyaluronan , a crucial regulator of inflammation. 2014;5(March):1–13.
157. Anand D, Ray S, Mohan L, Bhargava S. Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients. Clin Biochem [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.02.014>
158. Schmidt EP, Li G, Li L, Fu L, Yang Y, Overdier KH, et al. The Circulating Glycosaminoglycan Signature of Respiratory Failure in Critically Ill Adults *. 2014;289(12):8194–202.
159. Yagmur E, Koch A, Haumann M, Kramann R, Trautwein C, Tacke F. Hyaluronan serum concentrations are elevated in critically ill patients and associated with disease severity. Clin Biochem [Internet]. 2012;45(1–2):82–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.016>
160. Nelson A, Berkestedt I, Bodelsson M. Circulating glycosaminoglycan species in septic

- shock. 2014;36–43.
161. Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Fujiwara M, Jiang L, Nagashima M, Shimizu H, Takemura T, Ohaki Y, Arai S, Gomibuchi M, Takeda K, Yu Z F V. Heterogeneous distribution of thrombomodulin and von Willebrand factor in endothelial cells in the human pulmonary microvessels. *J Nippon Med Sch.* 2000;2(67):118–25.
 162. Asakura H, Jokaji H, Saito M, Uotani C, Morishita E, Yamazaki M, et al. Plasma Levels of Soluble Thrombomodulin Increase in Cases of Disseminated Intravascular Coagulation With Organ Failure. 1991;287(1 991):281–7.
 163. Johansen M. Hemostasis and endothelial damage during sepsis. *Dan Med J.* 2015;62(8):B5135.
 164. Orwoll BE, Spicer AC, Zinter MS, Alkhouli MF, Khemani RG, Flori HR, et al. Elevated soluble thrombomodulin is associated with organ failure and mortality in children with acute respiratory distress syndrome (ARDS): a prospective observational cohort study. *Crit Care [Internet].* 2015;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-1145-9>
 165. Puskarich MA, Cornelius DC, Tharp J, Nandi U, Jones AE. intravenous fluid resuscitation. 2019;125–9.
 166. Sallisalimi M, Tenhunen J, Yang R, Oksala N. Vascular adhesion protein-1 and syndecan-1 in. 2012;316–22.
 167. Murphy LS, Wickersham N, Mcneil JB, Shaver CM, May AK, Bastarache JA, et al. Endothelial glycocalyx degradation is more severe in patients with non - pulmonary sepsis compared to pulmonary sepsis and associates with risk of ARDS and other organ

- dysfunction. *Ann Intensive Care*. 2017;
168. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):57–69. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70286-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X)
 169. Endothelial H, Bel M, Guzylack-pirou L, Ruggli N, Liniger M, Mccullough KC, et al. Hemagglutinin-Dependent Tropism of H5N1 Avian Influenza Virus for. 2009;83(24):12947–55.
 170. Armstrong SM, Wang C, Tigdi J, Si X, Dumpit C, Charles S, et al. Influenza Infects Lung Microvascular Endothelium Leading to Microvascular Leak : Role of Apoptosis and. 2012;7(10).
 171. Tate MD, Deng Y, Jones JE, Gary P, Brooks AG, Reading PC, et al. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J Immunol*. 2009;183:7441–50.
 172. Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, et al. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. 2012;(December 2011):171–82.
 173. Manon-jensen T, Multhaupt HAB, Couchman JR. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. 2013;280:2320–31.
 174. Ali M. Role of matrix metalloproteinases and histone deacetylase in oxidative stress-induced degradation of the endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*.

- 2019;316(3):H647–63.
175. Gill SE, Nadler ST, Li Q, Frevert CW, Park PW, Chen P, et al. Shedding of Syndecan-1 / CXCL1 Complexes by Matrix Metalloproteinase 7 Functions as an Epithelial Checkpoint of Neutrophil Activation. 2016;55:243–51.
 176. Akaike T. Nitric oxide and virus infection. 2000;300–8.
 177. Pahakis, MY; Kosky JR, Dull RO TJ. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2007;355(1):228–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 178. Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Ph D, et al. Sepsis and Major Abdominal Surgery Lead to Flaking of the Endothelial Glycocalix Sepsis Causes Marked Increases in Inflammatory Markers. 2011;141:136–41.
 179. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, Humburg P, Hutton P, Mills TC, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis : a prospective cohort study. *Lancet Respir* [Internet]. 2016;2600(16):1–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00046-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00046-1)
 180. Suwanto S, Sasmono RT, Sinto R, Ibrahim E, Suryamin M. Association of Endothelial Glycocalyx and Tight and Adherens Junctions With Severity of Plasma Leakage in Dengue Infection. 2017;215.
 181. Chen H, Chao C, Liu C, Ho T, Tsai P, Perng G, et al. Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability. 2018;1–22.

182. Tang TH, Alonso S, Ng LF, Thein T, Pang VJ, Leo Y, et al. Increased Serum Hyaluronic Acid and Heparan Sulfate in Dengue Fever : Association with Plasma Leakage and Disease Severity. Nat Publ Gr [Internet]. 2017;(March):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep46191>

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-FMRP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 09 de novembro de 2016

Ofício nº 3758/2016
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA LESÃO DO GLICOCÁLIX ENDOTELIAL NA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE ASSOCIADA A INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA"** - versão 3, de 04/11/2016 e o Biorrepositório, foram analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 440ª Reunião Ordinária, realizada em 07/11/2016 e enquadrados na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - versão 2, de 08/09/2016, o Termo de Consentimento para guarda de material biológico - versão 01, de 04/11/2016 e a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo controle, de acordo com o Processo HCRP nº 9031/2016.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
CARLOS HENRIQUE MIRANDA
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FVA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

SÍNDROME GRIPAL

Nome: _____ Nome da mãe: _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Registro Hygia: _____

Telefones para contato: _____ CEP: _____ nº: _____

Sexo: ☐ F ☐ M Raça: _____ Educação/Profissão: _____

Data da vacina anti-influenza: _____ Amostra para rRT-PCR: _____

Data do início dos sintomas: _____ Data da coleta: _____ Duração: _____

➤ SINTOMAS:

- ☐ Febre ☐ Mal-estar/prostração ☐ Mialgia ☐ Artralgia ☐ Hiporexia
☐ Dispnéia ☐ Tosse ☐ Rinorréia ☐ Odinofagia ☐ Cefaleia
☐ Irritação ocular ☐ Sintomas GI (náusea/diarreia) Outros: _____

Duração dos sintomas até melhora completa: _____

➤ ANTECEDENTES PESSOAIS:

- ☐ HAS ☐ DM2 ☐ Etilismo ☐ Tabagismo

☐ Asma/Bronquite Outras comorbidades: _____

Medicações de uso contínuo: _____

➤ EXAME FÍSICO:

Peso _____ PA _____ FC _____ SatO2 _____

➤ OSELTAMIVIR FOI PRESCRITO: _____ Data do início: _____

➤ COMPLICAÇÕES:

- ☐ Necessidade de internação Motivo da internação: _____
☐ Necessidade de antibiótico Quanto tempo após sintomas: _____
Qual ATB: _____
☐ Outras complicações: _____

➤ RESULTADOS:

rRT-PCR Hb GB linfócitos plaquetas PCR LDH albumina Creat
ácido hialurônico trombomodulina sindecano-1 TNF IL1beta IL6

SÍNDROME GRIPAL com SDRA

Registro HC _____
Nome: _____ Sexo: _____ Data de Nasc: _____ Idade: _____ Tel: _____ Cidade: _____ Raça: _____
Educação/Profissão: _____
Vacinação anti-influenza: _____ Tipo de encaminhamento: aceito / vaga zero

Data do início dos sintomas: _____ Data do primeiro atendimento médico: _____ Data da piora clínica: _____

qdo chegou ao serviço 1ário? _____ qdo chegou na UE? _____ quando foi realizado a coleta? _____

Quadro clínico: febre, mal-estar/pros, mialgia, artralgia, hiporexia, tosse, rinorréia, odinofagia, cefaléia, alt ocular, GI

Evolução dos sintomas respiratórios: _____

Presença de fator de risco? _____ Comorbidades: _____ Medicação habitual: _____

Oseltamivir foi prescrito? _____ Data do início oseltamivir: _____ antes / após 48h do início dos sintomas?

Tempo do início dos sintomas até: administração O2 suplementar _____ oseltamivir _____ ATB _____ adm UE _____

Amostra para rRT-PCR coletada? _____ Qual tipo? _____
Data: _____ dia de sintomas: _____

À admissão na UE: Peso _____ PA _____ FC _____
SatO2 _____ Glasgow _____
Suporte ventilatório, dias do início e duração: cateter ou máscara O2 _____ VNI _____ VMI _____ TQT _____

Data da IOT _____ tempo do início dos sintomas _____ tempo da admissão na UE _____

Respeitou ventilação protetora? _____ uso de BNM, início e tempo: _____ Prona _____

RxTx: _____ TC _____ Broncoscopia ou outros _____

Data adm CTI, tempo SU-CTI _____ Dias de CTI _____ Alta, dias de internação hospitalar total _____

Culturas: hemo (colhida/germe/data) aspirado traqueal (colhido/germe/data) > ou < 48-72h?

Complicação: _____ CIVD/trombose: _____
LRA: _____ TRS: _____

Óbito: _____ data do óbito: _____ causa primaria: _____ dias do início dos sintomas: _____

Morte <3d, >5d ? _____ dias da adm UE: _____
Autópsia: _____

FICHA INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

CONTROLES

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

- 1) Você tem conhecimento de diagnóstico de doença crônica? Por ex.: HAS, DM2, hipotireoidismo
- 2) Você toma algum remédio de uso contínuo?
- 3) Já foi submetido a alguma cirurgia?
- 4) Já recebeu tratamento prévio com medicações especiais? Por ex.: imunossupressor, anti-neoplásico
- 5) Nas últimas 2 semanas, você teve algum sintoma de doença aguda ou infecção?
- 6) Nas últimas 2 semanas, você passou por alterações de sono ou humor?
- 7) Nas últimas 2 semanas, você fez exercício físico extenuante?
- 8) Nas últimas 2 semanas, como você considera seu estado de saúde:

A melhor saúde que
você pode imaginar 100

95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
A pior saúde que
você pode imaginar

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)

O Senhor (a), _____, está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada: **“Avaliação da participação da lesão do glicocálix endotelial na fisiopatologia da Síndrome Respiratória Aguda associada à infecção pelo vírus influenza**, na condição de voluntário, que será desenvolvida pelo Prof. Dr. **Carlos Henrique Miranda**.

Esta pesquisa será realizada para fins de estudos científicos para avaliação da possível participação de uma substância dosada no seu sangue no processo de lesão do pulmão desencadeado pelo vírus da gripe.

O senhor (a) será submetido à coleta de uma pequena quantidade de sangue, aproximadamente 5 ml, durante a internação hospitalar para dosagem das substâncias do presente estudo, sabendo que esta coleta será realizada junto com a coleta de exames realizados de rotina na avaliação de todo paciente hospitalizado com quadro semelhante.

Se o senhor (a) aceitar a participar desta pesquisa realizando a coleta de sangue referida acima, o senhor (a) será esclarecido quanto à evolução e os resultados da pesquisa durante qualquer momento de sua execução. O senhor (a) terá toda a liberdade de a qualquer momento retirar-se da mesma, sem nenhum constrangimento. Em nenhum momento, seu nome ou dos demais participantes será identificado.

Os riscos que o senhor (a) está sujeito com esta pesquisa são mínimos e relacionados à dor da picada da agulha, pequenos hematomas na região de punção venosa e a perda de confidencialidade dos dados. O senhor (a) não obterá nenhum benefício direto com a participação desta pesquisa, mas ajudará no entendimento do processo de lesão pulmonar durante esta doença podendo contribuir com os desenvolvimentos de futuros tratamentos específicos. Esta pesquisa não apresentará nenhum custo adicional ou ressarcimento financeiro. Caso ocorra algum dano não previsto nesta investigação, o senhor (a) terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país. O resultado da dosagem deste marcador sanguíneo não será utilizado para determinação de seu tratamento, visto que o médico que esta

acompanhando o seu caso não terá acesso a este resultado, por se tratar de um marcador ainda em investigação.

Informamos que após a dosagem destes biomarcadores, a amostra do seu sangue será armazenada em freezer para potencial utilização em futuros estudos que deveram ser submetidos à aprovação regulamentar do Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição.

Em caso de dúvidas sobre o estudo ou a necessidade de esclarecimentos adicionais, o senhor (a) poderá entrar em contato com o Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda, pelos telefones (16) 3602-1240 ou email chmiranda@fmrp.usp.br ou pelo endereço Rua Bernardino de Campos, 1000, Ribeirão Preto-SP, ou ainda, em caso de dúvidas éticas em relação a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato direto com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP pelo telefone (16) 3602-2228.

DECLARO, portanto, que após devidamente esclarecido pelos pesquisadores e ter entendido o que foi explicado, consinto voluntariamente em participar desta pesquisa. Reforça-se a garantia que o participante da pesquisa receberá uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador.

Nome do

Participante:

_____assinatura:_____data:_____

Nome do

Responsável:

_____assinatura:_____data:_____

Nome do

Pesquisador:

_____assinatura:_____data:_____

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, **Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda**, responsável pelo biorrepositório denominado *Influenza A* criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de sangue para dosagens de possíveis substâncias que participem do processo de lesão pulmonar desencadeado pelo vírus da gripe (influenza A) referente ao Projeto de pesquisa **“Avaliação da participação da lesão do glicocálix endotelial na fisiopatologia da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) devido à infecção pelo vírus influenza A”**, gostaria de convidá-lo (a) para guardar amostra de cinco mililitros (ml) de sangue para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante uma única vez durante a sua avaliação clínica devido suspeita de gripe. Após coletado será guardado em freezer a -70 graus.

Eu, como responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue será identificada por meio de códigos.

Quanto à coleta de material, será coletado um tubo pequeno de sangue uma única vez. Em decorrência da coleta poderá haver discreta dor relacionada à punção venosa e a formação de pequenos hematomas no local, contudo, sem outros riscos maiores. Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico.

Também solicitaremos autorização, caso seja necessário, para o descarte do material armazenado em após conclusão das pesquisas realizadas.

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____,

Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade _____, telefone _

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Henrique Miranda, para fins de pesquisa e análise científica. **Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).**

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: _____

Telefone para contato: ____ (16) 3602-1240 _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____