CHANG YIN CHIA

**Avaliação da função de um novo surfactante de origem
porcina obtido da extração orgânica acoplada à adsorção em
derivado de celulose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Celso Moura Rebello

SÃO PAULO

2004

CHANG YIN CHIA

**Avaliação da função de um novo surfactante de origem
porcina obtido da extração orgânica acoplada à adsorção em
derivado de celulose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Celso Moura Rebello

SÃO PAULO

2004

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado àqueles que ajudaram a construí-lo e àqueles que virão a tirar proveito dele;

*Dedico àqueles que me dão motivação para me tornar uma pessoa cada vez melhor : meu marido, **Renato**; meus filhos, **Julia**, **Christian** e **Victor**; e meus pais;*

Dedico à vida, principalmente aos recém-nascidos, fonte inesgotável de inspiração a novos conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao

Dr. Celso Moura Rebello,

meu orientador,

pela sua infinita paciência,

pelos tantos ensinamentos

e cuja inteligência e bom senso

deram vida

à Unidade de Pesquisa Experimental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a

Prof^a. Dra. Cléa Rodrigues Leone,

a quem palavras são insuficientes para descrever

a harmonia com que consegue compor

a arte de chefiar e a humanidade de lidar com as pessoas de sua equipe.

Desta forma, tem me apoiado e orientado em questões

tanto profissionais quanto pessoais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor da Vida.

A meus pais, que nunca tiveram a oportunidade, mas sempre souberam da importância do conhecimento e tiveram a sabedoria de transmiti-la.

Ao meu marido, Renato, cujo apoio e abnegação foram essenciais para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus filhos, Julia, Christian e Victor, que mesmo sem compreender, souberam dar apoio, carinho e inspiração.

Ao meu irmão e à minha cunhada Milena, pelo suporte nos momentos de dificuldade e pelo cuidado que têm com os meus filhos.

Ao Prof. Dr. José Lauro de Araújo Ramos, pelo seu esforço incansável de transmitir conhecimento; pela sua disposição e receptividade, desde os tempos da graduação; e pelo seu incentivo à pesquisa experimental.

Ao Prof. Dr. Milton de Arruda Martins, por permitir que o experimento fosse realizado no Laboratório de Poluição Experimental – FMUSP.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva, pelo incentivo à pesquisa experimental, desde o quarto ano da graduação, e orientações na histopatologia.

Ao Dr. João César Lyra e Dra. Renata Suman Mascaretti, cuja amizade e apoio, especialmente na fase experimental, e auxílio na histopatologia foram indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos Dr (a)s. Alexander Precioso, Ana Margarita de Andrade Reyes e Maria Augusta Ciccaroni Gibelli, pelo suporte na fase experimental do trabalho.

A Dra. Rosângela Moreira Arcas pelo seu empenho na fase inicial do trabalho.

A Dra. Marisa Dolnikoff, pela orientação na análise histopatológica.

A Fernanda Magalhães Arantes, pelo auxílio na realização da mecânica pulmonar.

A Dra. Lílian dos Santos Rodrigues Sadeck, pessoa sempre amiga e preocupada em formar não somente profissionais mas indivíduos; e pela sua inestimável contribuição como membro da Banca de qualificação.

A Dra. Maria Esther Jurvest Ceccon e Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs, que muito contribuíram como membros da Banca de qualificação.

Ao Dr. Mário Cícero Falcão, Dra. Valdenise Martins Laurindo Tuma Calil e Dra. Marta M.G.Mataloun, pela amizade e apoio incessantes.

A Dra. Laura Emília M.B.Cardoso, pela preciosa amizade e pela sua disposição em ajudar.

A Dra. Silvana Darcie, pela sua prontidão em ajudar e pelos seus valiosos conselhos.

A Dra. Maricy Tacla, pela sua paciência, amizade e compreensão; e pelo cuidado e carinho como tem conduzido a minha terceira gravidez, transmitindo tranquilidade que foi essencial na fase de qualificação deste mestrado.

Ao Dr. Miguel Borrelli Neto e a Dra. Dominique Z. Orkov, pela amizade inestimável e o cuidado que têm com os meus filhos.

Ao Dr. Pedro Paulo do Amaral Corrêa, pela importante amizade, por compartilhar comigo, não somente nos momentos de conquista mas também nos momentos de angústia deste mestrado e por me suportar nos plantões do São Luiz.

Aos meus colegas do Berçário Anexo à Maternidade do HCFMUSP, pelo apoio, amizade e paciência, pelas tantas ajudas na escala de plantão e pela cobertura dos meus plantões durante a minha licença maternidade, dentre tantas outras questões imprescindíveis à realização deste trabalho.

À equipe de enfermagem do Berçário Anexo à Maternidade do HCFMUSP, pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas do Berçário da Maternidade São Luiz, pelo apoio que recebi, direta ou indiretamente.

À equipe de enfermagem do Berçário da Maternidade São Luiz, pelo apoio e pela ajuda no recolhimento de material de sucata.

Ao Prof. Dr. Isaiás Raw, diretor do Instituto Butantan, pelo fornecimento do surfactante Butantan.

A Dra. Flávia S. Kubrusky, responsável no desenvolvimento e descrição do surfactante testado.

A Marisa Kazue Umetsu e sua equipe da Biblioteca do Instituto da Criança – HCFMUSP, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Marcelo Silva dos Santos, técnico da Unidade de Pediatria Experimental, pela organização e manutenção dos materiais de experimento.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo processamento dos pulmões e realização das lâminas para histopatologia.

Aos coelhos e todas as formas de animais de experimentação, pela sua doação involuntária à ciência.

Aos recém-nascidos, vidas compostas de beleza, fragilidade e mistérios, servindo de grandes inspirações a infindáveis estudos.

A SADIÁ, pelo fornecimento do material pulmonar para a extração do surfactante.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de quadros, tabelas, gráficos e figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	02
1.1. O Sistema Surfactante	02
1.1.1. Histórico e fisiologia pulmonar	02
1.1.2. Descrição e composição	06
1.1.3. Tensão superficial e função do surfactante	08
1.1.4. Metabolismo	12
1.2. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-nascido	14
1.2.1. Histórico	14
1.2.2. Epidemiologia	15
1.2.3. Fisiopatologia	18
1.2.4. Quadro clínico	21
1.2.5. Prevenção e tratamento	23
1.2.6. Evolução	24
1.3. Terapêutica de reposição com o surfactante exógeno	24
1.3.1. Histórico	24
1.3.2. Tipos de surfactante	26
1.3.3. Extração e produção	28
1.3.4. Indicações	29
1.3.5. Efeitos do uso do surfactante exógeno	30
1.3.6. Custos da terapêutica de reposição com o surfactante exógeno	33
1.3.7. O surfactante Butantan	34
1.4. Modelos experimentais de disfunção do surfactante e da terapêutica de reposição com o surfactante exógeno	34
1.5. Hipótese	38
2. Objetivos	40

3. Material e métodos	42
3.1. Surfactantes	42
3.1.1. Survanta	42
3.1.2. Surfactante Butantan	43
3.2. Animais de experimentação	44
3.2.1. Nascimento	44
3.2.2. Grupos de estudo	45
3.2.3. Ventilação mecânica	46
3.2.4. Curva pressão-volume pulmonar	47
3.2.5. Critérios de exclusão	48
3.2.6. Manipulação e processamento dos pulmões	48
3.3. Histopatologia	49
3.4. Análise estatística	50
3.5. Desenho do Estudo	51
4. Resultados	53
4.1. Descrição e caracterização dos grupos de estudo	53
4.2. Volume-corrente	54
4.3. Pressão ventilatória	56
4.4. Complacência dinâmica	58
4.5. Curva pressão-volume pulmonar	60
4.6. Histopatologia	63
5. Discussão	69
6. Conclusões	82
7. Considerações finais	84
8. Anexos	86
9. Referências	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RN	recém-nascido
SDR	síndrome do desconforto respiratório do RN
DMH	doença das membranas hialinas
DBP	displasia broncopulmonar
HIC	hemorragia intracraniana
PC	fosfatidilcolina
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
SP-A	Proteína específica do surfactante A
SP-B	Proteína específica do surfactante B
SP-C	Proteína específica do surfactante C
SP-D	Proteína específica do surfactante D
rSP-C	SP-C recombinante
mRNA	RNA mensageiro
DEAE-celulose	dietilaminoetil-celulose
MS	Ministério da Saúde
USP	Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP
PEEP	pressão expiratória positiva final
PV	pressão ventilatória
CD	complacência dinâmica
Curva PV	curva pressão-volume
dp	desvio padrão
ep	erro padrão
<i>Lm</i>	intercepto linear médio
ID	índice de distorção
Å	Angstrom
°C	graus Celsius
mg	miligramas
kg	kilogramas
ml	mililitros
kDa	kilodaltons
GA	Gauge
cmH ₂ O	centímetros de água
min	minutos

LISTA DE QUADROS, TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Quadro 1 - Tipos de surfactantes naturais e métodos de produção	32
Tabela 1 – Descrição e caracterização dos grupos de estudo	53
Tabela 2 – Resultados de volume-corrente	54
Tabela 3 - Resultados de pressão ventilatória	56
Tabela 4 – Resultados de complacência dinâmica	58
Tabela 5 – Curva pressão-volume pulmonar	61
Tabela 6 – Resultados de tamanho alveolar médio (L_m) e índice de distorção (ID)	63
Gráfico 1 - Volume-corrente	55
Gráfico 2 – Pressão ventilatória	57
Gráfico 3 – Complacência dinâmica	59
Gráfico 4 – Curva pressão-volume pulmonar	62
Gráfico 5 - Tamanho alveolar médio (L_m) e índice de distorção (ID)	64
Figura 1 – A: Corte histológico de pulmão do grupo controle (aumento 100x)	65
Figura 1 –B: Corte histológico de pulmão do grupo controle (aumento 200x)	65
Figura 2 – A: Corte histológico de pulmão do grupo Butantan (aumento 100x)	66
Figura 2 – B: Corte histológico de pulmão do grupo Butantan (aumento 200x)	66
Figura 3 – A: Corte histológico de pulmão do grupo Survanta (aumento 100x)	67
Figura 3 – B: Corte histológico de pulmão do grupo Survanta (aumento 200x)	67

Resumo

Resumo

CHANG, Y. C. **Avaliação da função de um novo surfactante de origem porcina obtido da extração orgânica acoplada à adsorção em derivado de celulose.** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

INTRODUÇÃO: O tratamento das doenças decorrentes das deficiências quantitativa ou qualitativa do surfactante pulmonar consiste na reposição exógena, porém, esta terapêutica é de alto custo devido, basicamente, à metodologia sofisticada de produção do surfactante e à necessidade de importação. Com o propósito de reduzir os custos deste tratamento, o Instituto Butantan, em São Paulo, Brasil, desenvolveu uma nova tecnologia de produção, que demanda menor custo, através da extração orgânica de macerado de pulmão de suínos acoplada à adsorção em um derivado de celulose (DEAE-celulose).

MÉTODOS: Com o objetivo de testar a eficácia deste novo produto, 74 coelhos prematuros de 27 dias de gestação foram randomizados em três grupos de estudo, de acordo com o tipo de tratamento realizado: Grupo Controle (n = 28, sem tratamento), Grupo Butantan (n = 22, Surfactante Butantan 50 mg/kg) e Grupo Survanta (n = 24, Survanta® 50 mg/kg).

Os animais foram submetidos à ventilação mecânica com frequência respiratória de 60 ciclos/ minuto, pressão expiratória positiva final de zero, tempo inspiratório de 0,5 segundo e fração inspirada de oxigênio de 21%, durante 20 minutos. O volume-corrente foi ajustado manualmente em 8 ml/kg durante o período da ventilação e a pressão ventilatória (pressão inspiratória - pressão expiratória final positiva) atingida foi registrada através de um pletismógrafo a cada 5 minutos. A complacência dinâmica foi determinada pela relação entre o volume-corrente e a pressão ventilatória. Ao final da ventilação, os animais foram divididos em dois grupos, um para a realização da curva pressão-volume e o outro para o estudo histopatológico. A análise histopatológica foi realizada com a determinação do tamanho alveolar médio, através da estimativa do intercepto linear médio (Lm); e com o cálculo do índice de distorção (ID) que indica a heterogeneidade do parênquima pulmonar.

RESULTADOS: O volume-corrente alvo de 8 ml/kg foi atingido nos três grupos de estudo. Quanto a pressão ventilatória, foi observado menores pressões nos animais dos grupos Survanta® e Butantan durante todo o período da ventilação em relação ao grupo Controle. Melhor complacência dinâmica foi observada, não havendo diferença significativa entre os grupos Survanta® e Butantan. Em relação à curva pressão-volume, volumes pulmonares maiores foram observados nos grupos Butantan e Survanta® comparados aos do grupo Controle; houve, também, melhor estabilização dos volumes pulmonares na fase expiratória entre os animais dos grupos tratados em relação ao grupo Controle. A análise histopatológica mostrou maior quantidade de alvéolos normais e menor de alvéolos hiperdistendidos

ou colapsados nos animais do grupo que recebeu o novo surfactante e o grupo Survanta. No grupo controle, além de apresentar mais alvéolos colapsados e hiperdistendidos, houve também maior ocorrência de áreas com edema alveolar e derrame de material hialino na luz alveolar em relação aos outros dois grupos.

CONCLUSÕES: Baseado nos resultados acima, concluiu-se que a administração do novo surfactante, produzido a partir da extração orgânica acoplada à adsorção em derivado de celulose, uma tecnologia de menor custo desenvolvida no Brasil, leva a melhora significativa das propriedades mecânicas pulmonares e da histerese na curva pressão-volume, além de apresentar melhor aeração do parênquima pulmonar e de forma mais homogênea, em coelhos prematuros. Estes efeitos foram semelhantes aos produzidos com a administração de um surfactante disponível no mercado para o uso clínico rotineiro.

Descritores: 1.COELHOS 2.PREMATURO 3.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS 4.DOENÇAS DO RECÉM-NASCIDO 5.SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO 6.SURFACTANTES PULMONARES/administração & dosagem 7.SURFACTANTES PULMONARES/uso terapêutico 8.SUÍNOS 9.CROMATOGRAFIA DEAE-CELULOSE 10.GRUPOS CONTROLE 11.MECÂNICA RESPIRATÓRIA 12.PULMÃO

Summary

SUMMARY

CHANG, Y. C. ***In vivo* function of a new porcine pulmonary surfactant obtained by organic extraction coupled with adsorption on a cellulose derivative.** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

INTRODUCTION: Pulmonary diseases related to quantitative or qualitative surfactant deficiency are well described, mainly in neonatology. The treatment with surfactant replacement is effective although costly, due to the complexity of surfactant production and imports costs. Aiming the reduction of the cost associated with this therapy, the Butantan Institute, São Paulo, Brazil, developed a new technology based in organic extraction coupled with adsorption on a cellulose derivative, resulting in lower final cost.

METHODS: In order to test the *in vivo* efficacy of this new product, 27 days gestation preterm rabbits were randomized after tracheostomy into 3 study groups, according to the type of treatment received: Control Group (n = 28, no treatment), Butantan Group (n = 22, Butantan surfactant, 50 mg/kg) or Survanta Group (n = 24, Survanta® 50 mg/kg). Mechanical ventilation was initiated with respiratory rate, 60 cycles/min; positive end expiratory pressure, zero and inspiratory time, 0.5 sec; FiO₂, 21%. Inspiratory pressure and tidal volume was continuously evaluated using a pletismograph, and set according to the necessary in order to ventilate with a preset target tidal volume of 8 ml/kg. Respiratory parameters were recorded each five min until the end of ventilation, after 20 min. Ventilatory pressure was defined as inspiratory pressure – positive end expiratory pressure (cmH₂O); dynamic compliance (DC) was calculated as $DC = \{ [Tidal\ volume\ (ml) / (Body\ weight\ (g)/1000)] / ventilatory\ pressure\ (cmH_2O) \}$. After the end of ventilation period the animals were divided into two groups: the first for PV curve evaluation and the second for histopathological analysis. The histopathological analysis was performed with determination of mean alveolar size, using mean linear intercept (*Lm*) and the distortion index, to evaluate the heterogeneity of pulmonary parenchyma. Statistical analysis was by ANOVA ONE WAY, with Student-Newman-Keuls as post hoc test. Significance level was set at p = 0.05.

RESULTS: The target tidal volume was achieved in all groups. We found lower ventilatory pressures, higher dynamic compliances and pulmonary volumes in both surfactant treated groups compared to the Control group, with no difference between them. Butantan surfactant and Survanta resulted in increased *Lm* and lower alveoli asymmetry, as evaluated by distortion index.

CONCLUSION: We conclude that the new surfactant produced by Butantan Institute resulted in improvement of lung mechanics and histopathological findings similar to the obtained with a clinically available surfactant, with no differences between them.

Key Words: Rabbits, preterm, animal models of disease, disease of the newborn, respiratory distress syndrome, lung surfactant, pigs, DEAE-cellulose, control groups, respiratory mechanic, lung.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O processo da respiração pulmonar em mamíferos é dotado de uma série de eventos, onde a presença de um complexo de substâncias composto basicamente de fosfolípides e proteínas, denominado de surfactante, facilita a ocorrência de uma de suas etapas. O surfactante é produzido pelo pneumócito tipo II, sendo responsável pela redução da tensão superficial intra-alveolar, facilitando a abertura pulmonar na inspiração e mantendo o pulmão mais estável na expiração. O amadurecimento dos processos metabólicos envolvidos na produção do surfactante é dependente da idade gestacional, desta forma, o nascimento prematuro pode estar associado à insuficiência respiratória com comprometimento da vitalidade do recém-nascido. Com o avanço da medicina, além de medidas de suporte, a insuficiência respiratória do prematuro pode ser tratada com a reposição específica desta substância, reduzindo a morbi-mortalidade neonatal.

1.1. O sistema surfactante

1.1.1. Histórico e fisiologia pulmonar

A mecânica do sistema respiratório decorre do balanço e da interação de forças que agem sobre o pulmão, tendo como componentes, as propriedades elásticas inerentes do tecido pulmonar (fibras elásticas,

colágenas e a arquitetura destes no conjuntivo) e as forças de recolhimento devidas à interface ar-líquido e o surfactante (Cardoso, 1987). Estudos iniciais a este respeito datam do século XVII, sendo que as relações volume-pressão foram mais especificadas a partir do século XVIII. Nesta época, já se sabia da necessidade de pressões crescentes para se atingir altos volumes pulmonares. Estudos posteriores demonstraram em pulmões de humanos *post mortem* variação destas relações em re-expansões pós-colapso (Mead, 1961).

O fisiologista von Neegard, em 1929, foi o pioneiro na demonstração do papel da tensão superficial nas forças de retração dos pulmões ao mostrar que o pulmão inflado com ar tinha uma pressão transpulmonar maior que o pulmão inflado com o mesmo volume de água, especulando que a atelectasia do recém-nascido poderia ser causada por consideráveis forças retráteis da tensão superficial nos pulmões. Em 1933, foi reconhecida a existência de forças de coesão que seriam responsáveis pela atelectasia e pela resistência à expansão pulmonar em recém-nascidos (Wilson e Faber, 1933). Em 1947, foi feita a descrição de que a tensão superficial na interface ar-líquido seria a responsável pelo aumento da resistência pulmonar à aeração (Gruenwald, 1947), onde pulmões de recém-nascidos autopsiados tinham a semelhança de um órgão maciço, com perda da arquitetura normal quando inflados com ar. Em 1959, o aumento da tensão superficial, decorrente da deficiência do surfactante, foi relacionado como sendo a causa do colapamento alveolar na doença da membrana hialina (Avery e Mead, 1959).

Dois sistemas são responsáveis pelo recolhimento pulmonar, fazendo conter uma imensa superfície de troca gasosa num volume relativamente pequeno pulmonar. São: as propriedades visco-elásticas do tecido pulmonar, que dependem da composição e da organização de fibras elásticas e do colágeno no conectivo pulmonar; e as forças de recolhimento devido à interface ar-líquido da superfície alveolar.

A interface ar-líquido da superfície alveolar é a principal força atuante no recolhimento pulmonar. Em condições normais, esta interface é responsável pelo fenômeno da histerese, definida como sendo a incapacidade de um sistema seguir um mesmo padrão na aplicação e na retirada de um estímulo. Desta forma, um pulmão dotado de surfactante, ao ser insuflado com ar necessita de menores pressões para se atingir o mesmo volume e, quando desinsuflado, mantém a distensibilidade pulmonar mais estável e por mais tempo (Mead, 1961).

O comportamento da mecânica pulmonar estática pode ser analisado através do diagrama pressão-volume pulmonar semi-estático (curva pressão-volume), inflando-se os pulmões com fluido ou com ar. Em situações normais, inflando-se o pulmão livre de ar até a sua capacidade pulmonar total e desinsuflando até a capacidade residual funcional, nota-se que geralmente ocorre uma grande histerese, ou seja, para se preencher um pulmão com ar, a partir do zero transmural de pressão, acréscimos iniciais de pressão produzem pequeno efeito sobre o volume pulmonar, sendo representado, em grande parte, apenas por alargamento dos ductos alveolares; a seguir, maiores incrementos de pressão levam à abertura de

alvéolos pulmonares, gerando grandes volumes, até atingir o volume pulmonar máximo, quando, então, acréscimos de pressão praticamente não alteram mais o volume pulmonar. A curva de retorno, na deflação, mostra que o volume pulmonar continua elevado mesmo após com progressivas reduções de pressão, traçando um caminho diferente em relação à insuflação, até atingir a capacidade residual funcional, quando o componente de superfície é praticamente nulo, existindo apenas o componente tecidual. Esta diferença da resposta do volume pulmonar frente à mesma pressão, na introdução e na retirada desta, representa a histerese.

A ação do surfactante é mais evidente com baixas pressões pulmonares, agindo como um potente estabilizador de parede alveolar, reduzindo o trabalho expiratório, facilitando também a re-expansão alveolar em ciclos respiratórios sucessivos, evitando colapsos e prevenindo atelectasias.

No pulmão desprovido de surfactante, a curva PV mostra-se deslocada para a direita, onde são necessárias maiores pressões para se obter variações de volume pulmonar, sendo que a histerese é praticamente nula (Mead, 1961; Cardoso, 1987).

Em 1980 publicou-se o primeiro trabalho com o uso do surfactante exógeno (Fujiwara et al, 1980), a partir de então, foram surgindo surfactantes de várias origens e inúmeros ensaios clínicos e experimentais foram realizados com o objetivo de se testar a sua função nas doenças com deficiência do surfactante pulmonar.

1.1.2. Descrição e composição

Sob microscopia eletrônica, o surfactante se mostra como um filme osmiofílico superficial uniforme na interface aérea do alvéolo pulmonar, medindo 4,2 nm, com aparência de camada de fosfolípide análoga à membrana celular, sendo denominado de filme superficial. A configuração da estrutura molecular em fase lamelar é a responsável pela atividade de superfície na redução da tensão superficial (Goerke, 1998). Abaixo desta, fica a hipofase, camada irregular composta de agregado de lípides sob a forma de vesículas e lamelas, e estruturas semelhantes a venezianas, denominadas de mielina tubular. A mielina tubular é caracterizada por estruturas cristalinas, de paredes osmiofílicas, composta por uma camada dupla de fosfolípidos, particularmente a dipalmitoil-lecitina e mede de 380 a 430 Å (Cardoso, 1987).

Quimicamente, o surfactante é composto por cerca de 90% em massa de lípides, sendo 45% dipalmitoilfosfatidilcolina (fosfatidilcolina saturada), 25% fosfatidilcolina insaturada, 5% fosfatidilglicerol, menos de 10 % de fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, menos de 5% de colesterol e seus ésteres; e 5 a 10% de proteínas e carboidratos. Esta composição é bastante semelhante entre as espécies de mamíferos (Shelley et al., 1984).

A quantidade de surfactante presente no pulmão pode ser determinada analisando-se o conteúdo lipídico do surfactante obtido por lavado broncoalveolar, o que representa o surfactante presente na luz alveolar; associado à homogeneização dos pulmões em soro fisiológico

gelado através do uso de trituradores de tecidos, representando o surfactante intracelular presente no interior dos pneumócitos tipo II (Rebello et al., 1996b). Este pool se correlaciona de maneira logarítmica à superfície alveolar em várias espécies animais (Gail et al., 1978). Em seres humanos, foi feita uma estimativa de 3 mg/kg do pool alveolar de surfactante, através de lavagens subsegmentares dos pulmões de voluntários adultos (Pre et al., 1983); sendo posteriormente confirmado em um estudo utilizando humanos post mortem, de 13 meses a 80 anos, onde a estimativa do pool alveolar foi de 4mg/kg e do pulmão total foi de 56 mg/kg (Rebello et al., 1996b). Esta quantidade diminui com a idade. Em recém-nascidos prematuros com SDR, a quantidade do surfactante alveolar é cerca de 1 a 5 mg/kg (Hallman et al., 1986), semelhante ao do adulto, porém cerca de 10 vezes menor que a encontrada em recém-nascidos de termo.

As proteínas do surfactante foram identificadas como sendo a proteína A (SP-A), a proteína B (SP-B), a proteína C (SP-C) e a proteína D (SP-D).

A SP-A é a maior e a mais abundante proteína do surfactante, representando cerca de 5% em massa, é hidrofílica e possui um grande número de isoformas decorrentes da glicosilação, sendo constituída por 6 a 8 monômeros de 4.7 kDa cada, resultando numa molécula de 650 kDa. A quantidade de SP-A varia com a idade, sendo encontrado proporcionalmente em menor quantidade nos prematuros (Chida et al.; 1988Hawgood, 1992)

A SP-B é uma proteína hidrofóbica de 17,4 kDa, presente no surfactante em forma de dímeros, trímeros e tetrâmeros. Possui 2 canais polipeptídicos dissulfeto-ligados idênticos, fazendo com que esta proteína se posicione entre as duas membranas da bicamada de fosfolípidos (Robertson et al., 2000).

A SP-C também é hidrofóbica, e de peso molecular de 4.2 kDa, tendo uma estrutura helicoidal rígida que se estende entre as duas membranas da bicamada de fosfolípidos e sustenta a monocamada na sua disposição espacial. (Whitsett e Baatz, 1992; Gericke, 1997).

A SP-D é uma glicoproteína formada por agregados de monômeros de 43 kDa, resultando num multímero de 560 kDa, é hidrofílica (Kukori, 1992). Na sua estrutura, possui territórios ligados a lectina e colágeno, caracterizando-se como molécula de atividade imune (Clark e Reid, 2003). Assim, também, é uma proteína de ligação a carboidratos cátion-divalente dependente de cálcio, podendo se ligar a parede de agentes infecciosos facilitando a atuação de macrófagos (Kukori, 1992).

1.1.3. Tensão superficial e função do surfactante

A pressão exercida pela tensão superficial sobre o alvéolo é diretamente proporcional a 2 vezes a tensão superficial e inversamente proporcional ao raio alveolar (Lei de Young-Laplace). Desta forma, ao final da expiração, com a redução do diâmetro alveolar, a força gerada pela interação ar-líquido (tensão superficial) aumenta, tendendo a causar colapamento alveolar.

A principal função dos fosfolípidos do surfactante é de atuar como uma molécula que se situa entre o ar e o líquido, reduzindo a tensão superficial, facilitando a abertura pulmonar na inspiração e mantendo a estabilidade pulmonar na expiração evitando o colapso alveolar; desta forma, sustentando a histerese da curva pressão-volume (Veldhuizen et al., 1998). O papel dos lípidos neutros ainda não é bem conhecido, podendo ser responsável pela fluidez do surfactante, facilitando a sua dispersão e organização (Harwood, 1987). Entretanto, a fosfatidilcolina tem a forma de gel a 37°C, não havendo variação das propriedades da monocamada alveolar *in situ* entre 22 a 37°C (Bermel et al., 1984), passando à forma líquida e se dispersando a 41°C (Goerke, 1998). Portanto, outros componentes do surfactante são responsáveis pela estabilidade do surfactante durante a compressão entre os ciclos respiratórios, pela rápida adsorção da hipofase à superfície alveolar e a capacidade de organização da monocamada, sendo que as proteínas, particularmente a SP-B e a SP-C são as responsáveis por estas propriedades (Tanaka et al., 1983).

São várias as funções da SP-A do surfactante, destacando-se: o papel regulador de sua absorção e secreção pelo pneumócito tipo II, atuando como mediador do metabolismo do surfactante, na secreção, clearance e reciclagem (Hawgood, 1992); a participação na formação da mielina tubular junto com a SP-B (Suzuki et al., 1989); a organização e formação da monocamada lipídica (Kukori e Akino, 1991) dependente de cálcio (Williams, 1991); a função facilitadora de fagocitose pelos macrófagos alveolares (van Iwaarden et al., 1990) e o aumento da resistência à

inativação por proteínas do plasma (Cockshutt et al., 1990 e Yukitake et al., 1995). Além disso, a SP-A interage com outras proteínas do surfactante facilitando as suas funções (Possmayer, 1990).

As funções da SP-B incluem: a estimulação da formação da monocamada de fosfolípides ao lado da SP-A, caboidratos e cálcio, facilitando também a sua adsorção na interface ar-líquido (Possmayer, 1990; Noguee et al., 1994); a organização da formação da mielina tubular (Suzuki et al., 1989) através da lise e fusão das vesículas lipídicas (Whitsett e Weaver, 2002); a intensificação da redução da tensão superficial na compressão dinâmica, a regulação da captação de vesículas de surfactante, participando da reciclagem (Rice et al., 1989). A combinação de SP-B e fosfolípides do surfactante mimetizam a maioria das funções quanto à atividade biofísica do surfactante natural *in vivo* (Rider et al., 1993), assim como aumenta a resistência à inativação por proteínas anômalas ao surfactante. Nos quadros de síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido ou do tipo adulto, são encontrados níveis reduzidos de SP-B (Henry et al., 1996; Greene et al., 1999). A ausência do SP-B é incompatível com a vida (Noguee et al., 1994; Noguee, 2004).

A SP-C tem como principal função, a melhora das atividades de superfície dos fosfolípides, reduzindo a tensão superficial e regulando a captação de vesículas do surfactante pelo pneumócito tipo II (Rice et al., 1989), também atua facilitando a adsorção dos fosfolípides na superfície alveolar. A sua estrutura molecular facilita o seu movimento entre as camadas do filme lipídico, sendo responsável pela solubilidade do

surfactante. A deficiência desta proteína ou a presença de sua forma anômala predispõe ao desenvolvimento de doenças pulmonares inflamatórias (Whitsett e Weaver, 2002; Noguee, 2004).

Juntos, a SP-B e a SP-C, atuam na bicamada de lípidos através de diferentes mecanismos e são as principais responsáveis pela transformação do surfactante na sua forma ativa. Ambas, principalmente a SP-B, facilitam a adsorção dos lípidos da hipofase até a superfície e aceleram a formação do filme de lípidos sobre a interface ar-líquido (Robertson et al, 2000). São responsáveis, também, por facilitarem o espraio, e pela estabilidade do filme lipídico na interface ar-líquido. A SP-B e a SP-C estão presentes nos compostos de surfactante derivados de pulmões de mamíferos (Whitsett e Weaver, 2002).

O papel da SP-D ainda não está claro, parecendo desempenhar alguma função na defesa anti-infecciosa do pulmão, por ter ligação a carboidratos e glicolípidos, interagindo com a superfície de bactérias e outros microorganismos (Crouch, 1998). São descritas como funções da SP-D: ligação e aglutinação de patógenos, melhorar a fagocitose, acelerar o clearance de endotoxinas bacterianas, modular a resposta inflamatória à infecções, modular a resposta inflamatória a processos alérgicos, propriedades antioxidantes, a modulação do número de células apoptóticas e a modulação da deposição de fibras elásticas. Desta forma, a SP-D tem como funções, além da defesa anti-infecciosa, o controle da resposta inflamatória pulmonar e a preservação da arquitetura pulmonar, tendo papel importante na evolução de quadros respiratórios agudos em doenças

pulmonares crônicas como enfisema, fibrose cística e displasia pulmonar (Clark e Reid, 2003; Collins et al., 2003).

1.1.4. Metabolismo

O surfactante é produzido pelo pneumócito tipo II, onde é a sede de todo o metabolismo deste composto, incluindo a síntese, o catabolismo e a reciclagem.

A síntese dos componentes lipídico e protéico ocorrem de maneira independente, são processos lentos e ainda mais demorados no pulmão prematuro. A síntese de fosfatidilcolina a partir de seus precursores plasmáticos até a sua liberação pode demorar de 12 a 25 horas nas espécies de animais adultos (Jobe, 1988) e até 35 a 40 horas em animais prematuros.

Os fosfolípidos e as proteínas SP-B e SP-C são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso sendo em seguida armazenados no complexo de Golgi e posteriormente em corpos lamelares no citoplasma. As proteínas A e D são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, sendo liberadas independentemente de outros componentes do surfactante.

Periodicamente os corpos lamelares são liberados do pneumócito tipo II para a luz alveolar por exocitose, organizando-se em forma de mielina tubular com a ajuda das proteínas, formando a monocamada fosfolipídica que tem atividade de superfície.

Com as sucessivas compressões e descompressões do filme de surfactante que ocorre entre os ciclos respiratórios, parte da mielina tubular

se desorganiza e se desprende na forma de pequenas vesículas que são recaptadas por endocitose para o interior do pneumócito tipo II, sendo uma pequena parte catabolizada e eliminada pelas vias aéreas (3 a 7%), 10 a 30 % é fagocitada pelos macrófagos e a maioria é reutilizada nos corpos lamelares para reciclagem e ressíntese do surfactante. Com este processo de reciclagem, a meia vida de fosfatidilcolina é bastante longa. Em relação ao pool alveolar de surfactante no pulmão de prematuros, cerca de 50 % apresenta boa atividade de superfície, sendo que o restante é constituído por vesículas a serem recicladas (Ito et al., 1997).

O processo da reciclagem minimiza a necessidade de síntese do surfactante através da reorganização estrutural dos lípides e proteínas, sendo este processo responsável também pela ativação do surfactante administrado por via exógena, através da adição de proteínas A e D endógenas, ausentes nos preparados comerciais. O processo de ativação depende da maturação das enzimas pulmonares do metabolismo do surfactante, sendo dependentes, portanto, da idade gestacional, podendo ser estimulado pelo uso antenatal do corticosteróide (Rebello et al., 1996a).

Em vigência de injúria pulmonar aguda, as proteínas anômalas presentes na luz alveolar inibem a função de redução da tensão superficial do surfactante, levando à sua inativação. Este fenômeno ocorre por interferência na formação da monocamada, através da competição com as proteínas do surfactante. A intensidade de inativação depende da quantidade do surfactante presente na luz alveolar (Ikegami, 1994), do tipo de proteína, sendo a fibrina uma das que tem maior capacidade de

inativação (Seeger et al., 1992), e da quantidade e do tipo de proteínas do surfactante (Yukitake et al., 1995, Herting et al., 2001).

Atualmente, são reconhecidas várias condições clínicas decorrentes da deficiência do surfactante, seja ela quantitativa ou qualitativa, gerando quadros de insuficiência respiratória aguda. A doença clássica causada por deficiência do surfactante decorrente da imaturidade pulmonar é a doença das membranas hialinas ou a síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido.

1.2. *Síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido*

1.2.1. Histórico

A existência de uma condição respiratória aguda fatal em recém-nascidos prematuros era reconhecida desde o século 18. A partir do reconhecimento das forças de tensão superficial (Neegard, 1929) gerando quadros de hipoaeração pulmonar (Gruenwald, 1947); em 1955, Pattle analisou o conteúdo do edema pulmonar e estudou a sua tensão superficial, especulando que a ausência de uma substância fina poderia ser relacionada à dificuldade respiratória do recém-nascido prematuro ao nascimento. Esta condição era tratada apenas com medidas de suporte até que, em 1957, Clements descreveu um estudo relacionando a tensão superficial de extratos pulmonares e, mais tarde, em 1959, Avery, propôs que a deficiência de uma substância no extrato pulmonar de recém-nascidos prematuros

determinava o colapamento alveolar, sendo fundamental para a patogênese do SDR. Esta substância foi denominada de surfactante.

Apesar da deficiência do surfactante ser a maior responsável pela patogênese da SDR, outros fatores inter relacionados também são responsáveis pelo quadro de insuficiência respiratória nas crianças com SDR, tais como, a imaturidade da micro-anatomia pulmonar, shunt direito-esquerdo ou esquerdo-direito através do canal arterial patente, alteração da resistência dos vasos do leito pulmonar, transudação de líquido para o espaço alveolar, dentre outros.

Nas últimas décadas, houve um avanço rápido nas pesquisas tanto nos aspectos da função, composição, biologia celular e molecular do surfactante, como em relação aos métodos de administração e a interação do surfactante com técnicas de ventilação mecânica.

1.2.2. Epidemiologia

A epidemiologia da síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido (SDR) ou doença das membranas hialinas (DMH) é difícil de se determinar, pois depende de condições pré e perinatais. A incidência desta doença é maior quanto menor a idade gestacional e o peso de nascimento. Nos Estados Unidos estima-se, que cerca de 1% dos recém-nascidos vivos desenvolvem a SDR (Verloove-Vanhorick et al., 1986), sendo cerca de 75% em RN menores de 1250g e idade gestacional menor de 30 semanas. Uma outra estatística americana, de 1989, cita que cerca de 8% dos RN vivos foram prematuros, ou seja, de idade gestacional menor que 37 semanas,

destes, um grande número tinha peso de nascimento maior do que 1750g, onde o risco de SDR foi menor do que 15%. Por outro lado, cerca de 1% dos recém-nascidos apresentavam peso de nascimento inferior a 1500g, sendo o risco de SDR da ordem de 50% (Walther e Taeusch, 1992). A SDR afeta 50% dos recém-nascidos com idade gestacional entre 26 e 28 semanas e 20 a 30% dos recém-nascidos entre 30 e 31 semanas de idade gestacional (Whitsett et al., 1994).

A ocorrência da SDR depende, não somente dos fatores de saúde materna, como também de suas condições sócio-econômicas, assim como das condições do sistema de saúde a que ela teria acesso. Depende, assim, de raça, idade materna, grau de escolaridade, uso de drogas, risco de infecção materna, doenças maternas mal-controladas como diabetes e hipertensão, crescimento intra-uterino restrito, hábitos da mãe como tabagismo, etilismo e uso de drogas, condições de nascimento, tipo de parto, condições de reanimação, ocorrência ou não de trabalho de parto, asfixia perinatal dentre outros.(James, 1975; Walther e Taeusch, 1992).

Especificamente, a SDR ocorre com maior freqüência nos recém-nascidos da raça branca (Richardson and Torday, 1994) e em meninos (Miller e Futrakul, 1968); é menos comum em negros (Hulsey et al., 1993); ocorre mais freqüentemente em cesáreas eletivas (Morrison et al., 1995); em filhos de mãe diabéticas mal controladas (Robert et al., 1976, Kjos et al., 1990); nos recém-nascidos grandes para a idade gestacional mesmo na ausência do diabetes materno (Naeye et al., 1974); em recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (Thompson et al., 1992 e Tyson et al.,

1995); na hipertensão materna (Tubman et al.,1991), na asfixia perinatal (James, 1975); além da baixa idade gestacional ao nascimento e o parto cesáreo (Stahlman, 1984).

No geral, nos Estados Unidos, 10% dos recém-nascidos prematuros (definido como nascimento com idade gestacional menor que 37 semanas completas) desenvolvem SDR, sendo que, antes da liberação do uso clínico rotineiro do surfactante pulmonar exógeno, 25% desses recém-nascidos evoluíam para óbito. Em virtude da gravidade desta doença, uma parcela significativa dos sobreviventes apresentava complicações graves, como displasia broncopulmonar ou hemorragia intracraniana (Walther e Taeusch, 1991). São esperadas como complicações da SDR: a displasia broncopulmonar, a hemorragia intracraniana, a abertura do canal arterial e o pneumotórax. Entre as crianças que desenvolvem SDR grave, 75% sobrevivem, sendo que um terço desenvolve DBP. Nos que sobrevivem com DBP é freqüente a ocorrência de HIC grau III ou IV, com aumento da morbimortalidade neonatal e comprometimento neurológico (Walther e Taeusch, 1992).

Quanto à mortalidade, situa-se ao redor de 25% da forma grave da SDR, ou seja, entre os recém-nascidos que necessitaram de suporte ventilatório com altas taxas de oxigênio por vários dias, sendo maior nos RNPT de menor idade gestacional e/ou de peso de nascimento ou que possuam fatores de instabilidade clínica relacionadas. Desta forma, recém-nascidos de 23 a 24 semanas de idade gestacional e peso de nascimento entre 500 a 600g têm menos de 10% de sobrevida, tendo como fatores

agravantes a associação de doenças como enfisema intersticial, pneumotórax e hipotensão (Hack et al., 1989). Uma revisão multicêntrica nos EUA, mostra uma taxa de sobrevivência de 34% em recém-nascidos com peso menor que 750 g (Hack, 1991). Com o advento da terapêutica de reposição com o surfactante exógeno, a mortalidade chega a ser reduzida em 30 a 40 % (Davis, 1998).

No nosso meio, a SDR ainda representa uma preocupação na neonatologia, sua incidência mantém-se elevada na última década, sendo ainda uma das principais causas de mortalidade neste período (Miyoshi et al., 1993, Leone et al., 2001). Um estudo nacional, onde oito unidades neonatais de centros universitários foram incluídos, envolvendo 1416 recém-nascidos de muito baixo peso, mostrou uma ocorrência média de 41% (31 a 59%) de SDR, sendo que, em média, 29% (9 a 52%) destes fizeram uso de surfactante exógeno; e com uma taxa de mortalidade de 37,5% (Leone et al., 2001).

1.2.3. Fisiopatologia

O desenvolvimento da SDR não é um fator isolado. A primeira respiração do recém-nascido depende do gradiente de pressão transpulmonar gerado pelos músculos respiratórios, das propriedades do líquido do pulmão fetal (tensão superficial, viscosidade), da estrutura da barreira ar-sangue e da perfusão dos capilares alveolares. A ineficácia desta respiração pode gerar uma série de eventos comprometendo as trocas gasosas. Mesmo sendo a deficiência do surfactante decorrente da

imaturidade pulmonar nos recém-nascidos prematuros o principal fator fisiopatológico da SDR, outros fatores contribuem: a imaturidade da microanatomia pulmonar, shunt direito-esquerdo e esquerdo-direito pelo ducto arterioso patente. Além da insuficiência quantitativa, o fenômeno da inativação do surfactante é um fator importante na fisiopatologia da SDR, assim como na sua gravidade. (Walther e Taeusch, 1992; Ikegami et al., 1992).

A produção do surfactante é um processo dinâmico que envolve a integridade do epitélio pulmonar, a manutenção da temperatura, do pH e da perfusão adequada. Sendo assim, a ocorrência de asfixia, com hipoxemia, hipovolemia e acidose, independente do nascimento prematuro, pode levar à deficiência da sua produção.

Na deficiência do surfactante a tensão superficial intra-alveolar é elevada, dificultando a entrada do ar na luz alveolar, gerando atelectasias e colapso pulmonar. A hipoaeração pulmonar resulta em redução da capacidade residual funcional e áreas não ventiladas mas perfundidas levam ao aumento do espaço morto. A resistência das vias aéreas terminais pode ser normal ou pouco elevada. Como consequência da hipoaeração, ocorre a redução da capacidade pulmonar total e volume pulmonar máximo (Walther e Taeusch, 1992, Hansen e Corbert, 1998), levando à redução da troca gasosa.

Na SDR, há aumento da diferença alvéolo-arterial de oxigênio e shunt direito-esquerdo pelo foramen oval e ducto arterioso, além disso, a

irregularidade da aeração alveolar leva ao desbalanço da relação ventilação perfusão, agravando ainda mais a hipoxemia.

A hipoxemia grave gera vasoconstrição do leito pulmonar, diminuindo o fluxo pulmonar efetivo, gerando a hipertensão pulmonar, com piora da hipoxemia.

Ocorre também hipercarbia decorrente da hipoventilação alveolar. A acidose resultante piora ainda mais a perfusão pulmonar, com a manutenção do shunt direito-esquerdo e do canal arterial (Corbet, 1993).

A partir do advento do uso do surfactante exógeno na SDR, modelos experimentais demonstraram, quanto à mecânica respiratória dinâmica, a redução da complacência pulmonar, sendo necessários maiores pressões de insuflação para se manter o mesmo fluxo pulmonar nos animais que não receberam surfactante exógeno (Walther e Taeusch, 1992)

Na patologia, a descrição clássica de autópsia de pulmões com SDR é de órgãos sólidos, avermelhados, não aerados, traduzido por atelectasia pulmonar difusa com congestão e edema na microscopia (Finlay-Jones et al., 1974). Ao lado das atelectasias de unidades alveolares, encontram-se bronquíolos terminais ou ductos alveolares dilatados, com epitélio descamativo e necrótico e membranas eosinofílicas na sua luz, derivado de exsudação plasmática, células do processo inflamatório e de descamação e micro-hemorragias. (Fanaroff e Martin, 1992; Hansen e Corbert, 1998).

No interstício do parênquima pulmonar, nota-se o ingurgitamento linfático e extravasamento de fluido no espaço intersticial. Estudos experimentais demonstraram que lesões necróticas e descamação do

epitélio alveolar já ocorrem com 5 minutos de ventilação artificial (Nilsson et al., 1980). Com o uso do surfactante exógeno há redução da lesão epitelial e do influxo de proteínas para a luz alveolar, demonstrando que estes mecanismos poderiam ser decorrentes da atelectasia com a distorção do parênquima alveolar (Nilsson et al., 1978, Ikegami et al., 1992).

Condições que levam a algum grau de hipoplasia pulmonar, além da prematuridade, como oligoâmnio e a restrição do crescimento intra-uterino, levam à deficiência de produção do surfactante (Robertson, 1984). Recentemente, também foi demonstrado menor produção das proteínas do surfactante em nascimentos prematuros, sendo relacionados ao desenvolvimento da SDR (Khour et al., 1991; Stevens et al., 1992; Moya et al., 1994; Greene et al., 1999).

Além disso, a ventilação mecânica, aliada a altas concentrações de oxigênio do ar inspirado, retarda ainda mais a alveolização do pulmão imaturo, levando à desorganização na deposição de colágeno e de elastina no interstício alveolar. Como consequência, ocorre distorção da arquitetura do parênquima pulmonar, com bloqueio da alveolização (Hislop e Haworth, 1990; Reidel, 1987; Mataluon, 2003).

1.2.4. Quadro clínico

O quadro clínico da SDR caracteriza-se pela presença de taquidispnéia, tiragem intercostal, retração esternal, batimento de asa nasal e gemido expiratório logo ao nascimento. A cianose é decorrente de

hipoxemia, que geralmente só é melhorada com concentrações de oxigênio acima de 40%.

São critérios de diagnóstico para SDR a presença de fatores como: prematuridade, evidência de imaturidade pulmonar, evidência de redução da complacência pulmonar, aumento do trabalho respiratório, alteração na troca gasosa com hipoxemia, hipercarbia e acidose; necessidade de suporte ventilatório com elevadas concentrações de oxigênio; achado radiológico de infiltrado pulmonar retículo-granular fino difuso, com presença de broncograma aéreo e redução do volume pulmonar; tendo sido excluídos outras causas para a falência respiratória.

Na evolução, o quadro respiratório pode apresentar uma melhora inicial, resultado da melhora da hipotermia e da acidose precoce ao nascimento e do clareamento do líquido pulmonar; após o qual, há a acentuação do desconforto respiratório. Se o grau de deficiência do surfactante é leve, geralmente ocorre um pico de piora entre 24 e 48 horas de vida, após o qual inicia-se a melhora, possibilitando o desmame do suporte ventilatório a partir de 72 horas de vida.

Estudos de dosagens em aspirados traqueais mostraram que a recuperação dos níveis de proteínas do surfactante ocorre em 3 a 4 dias (Stevens et al., 1992) e de fosfatidilcolina saturada em 4 a 7 dias (Hansen e Corbert, 1998).

A disfunção qualitativa do surfactante está presente em outras condições clínicas que cursam com desconforto respiratório no período neonatal, como a síndrome de aspiração meconial (Clark et al., 1987; Brown

e Pattishal, 1993; Findlay et al.; 1996 Kattwinkel, 1998); pneumonias graves (van Daal et al., 1992; Herting et al., 2000); síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo (Royal e Levin, 1988; Faix et al., 1989; Lewis et al., 1994), as hipoplasias pulmonares, por exemplo, hérnia diafragmática (Tannuri et al., 1998) e bronquiolites graves (Keer e Paton, 1999).

1.2.5. Prevenção e tratamento

A prevenção da SDR consiste primariamente na redução do parto prematuro, evitando nascimento de recém-nascidos com imaturidade pulmonar. Além disso, deve-se controlar as condições de morbidade materna tais como, diabetes, hipertensão, infecções e fatores que podem levar a restrição do crescimento intra-uterino. Na iminência do parto prematuro, a única medida comprovadamente eficaz na indução da maturidade pulmonar fetal é a utilização do corticosteróide antenatal (Ikegami et al., 1987; Rebello et al., 1996a; Rebello, 2000)

O tratamento da SDR inclui o controle de situações que podem comprometer a produção e a secreção do surfactante, tais como, asfixia perinatal, expansão pulmonar inadequada, hipotermia, acidose, hipoxemia, hiper ou hipovolemia e infecção. O tratamento específico consiste na reposição do surfactante através da instilação exógena por via endotraqueal, com a redução significativa da mortalidade (Horbar et al., 1990; Mercier e Soll, 1997; Soll, 2001).

1.2.6. Evolução

O prognóstico da SDR está diretamente relacionado à idade gestacional e ao peso de nascimento. Sofre também interferência das condições de prevenção e de tratamento. São reconhecidas como complicações da SDR, a abertura do canal arterial, a hemorragia intracraniana, síndrome do extravasamento do ar pulmonar e o desenvolvimento da displasia broncopulmonar (Walther e Taeusch, 1992, Hansen e Corbert, 1998). A resposta inadequada à administração do surfactante exógeno, decorrente da sua inativação na luz alveolar, aumenta a morbidade da SDR, levando a maior tempo de ventilação artificial, prolongamento da internação e maior risco de complicações e de mortalidade.

1.3. *Terapêutica de reposição com o surfactante exógeno*

1.3.1. Histórico

O primeiro estudo com a administração do surfactante exógeno foi realizado em modelo animal de coelhos prematuros demonstrando efeito sobre a oxigenação (Enhorning e Robertson, 1972). Outras publicações foram surgindo, à seguir, confirmando a utilidade deste modelo (Nilsson et al., 1981; Metcalfe et al., 1982).

A possibilidade de se administrar o surfactante exógeno pela via intratraqueal em recém-nascidos com SDR foi descrito inicialmente por Fujiwara em um estudo não controlado, demonstrando melhora na oxigenação, atestando a eficácia desta terapêutica (Fujiwara et al., 1980).

Inúmeros estudos a seguir foram realizados com o uso de surfactantes de distintas origens (humano, porcino, bovino e sintéticos), culminando com a disponibilização do surfactante exógeno para o uso clínico rotineiro na década seguinte (Fujiwara et al., 1990).

Desde então, inúmeros estudos têm sido realizados para se determinar a melhor composição do surfactante, assim como o melhor esquema terapêutico. Trabalhos iniciais mostraram que o impacto imediato sobre a oxigenação somente era alcançado com a administração de surfactantes naturais, sendo que os surfactantes sintéticos apresentaram bioatividade satisfatória somente após a adição de álcoois à preparação de fosfolípidos; com o objetivo de melhorar a dispersão em fase aquosa e facilitar a adsorção, melhorando a atividade de superfície (Durand et al., 1985).

Mais tarde, demonstrou-se que, na SDR, a mortalidade e a ocorrência de síndrome de extravasamento de ar podem ser reduzidas em até 40%, com o uso do surfactante exógeno (Soll e McQueen, 1992).

Nos últimos anos, as pesquisas têm centrado em dois pontos principais: o uso do surfactante em outras patologias além da SDR (Brown e Pattishall, 1993) e o desenvolvimento de novos surfactantes, visando melhorar a sua eficácia, reduzir os efeitos colaterais, aumentar a sua resistência à inativação por proteínas (Holm e Waring, 1993) e, ainda, minimizar os custos de produção (Arcas et al., 2000), levando ao desenvolvimento de novos produtos comerciais, novos esquemas de aplicação e métodos de obtenção (Kattwinkel, 1998).

De um modo geral, as propriedades ideais de um surfactante exógeno são: segurança, facilidade de administração (homogeneidade, viscosidade), imunogenicidade mínima, resistência à biodegradação e baixo custo.

1.3.2. Tipos de surfactantes

Os surfactantes exógenos são classificados como naturais e sintéticos.

Os surfactantes naturais são obtidos a partir de pulmões de animais, sendo extratos lipídicos de lavado ou de macerado de pulmão de mamíferos ou extraído do líquido amniótico. Os surfactantes naturais modificados são suplementados com fosfolípidos ou outros componentes (Goetner, 1992); devido ao método de extração que utiliza solventes orgânicos, não contêm as proteínas hidrossolúveis SP-A e SP-D (Metcalf et al., 1980). O surfactante de origem humana é isolado do líquido amniótico de fetos de termo, contendo as proteínas A, B, C e D. É pouco utilizado devido à dificuldade de produção e risco de propagação de doenças infecciosas.

Os surfactantes sintéticos são inteiramente produzidos em laboratório, sendo compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina, podendo ser adicionados a outras substâncias facilitadoras de dispersão e da adsorção.

Os novos surfactantes sintéticos tentam incluir peptídeos na sua composição, com o objetivo de mimetizar as funções das proteínas lipossolúveis SP-B, SP-C, além da SP-D. Isto resultaria em um menor risco teórico em relação à imunogenicidade e risco de infecções. Como a SP-C

natural tem grande dificuldade de ser purificada e um alto grau de agregação (Beers e Fisher, 1992), foi desenvolvida uma SP-C recombinante (rSP-C, Venticute[®], BYK Gulden Kenstanz, Alemanha), através da substituição das moléculas de cistina nas posições 4 e 5 por fenilalanina. Esta mudança não afetou a função do surfactante em estudos *in vivo* (Spragg et al., 1999). Estudos experimentais mostraram que a rSP-C foi efetiva no tratamento da SDR em modelos animais (cordeiros e coelhos) (Davis et al., 1998), sem aumento da imunogenicidade (German et al., 1999).

Nesta linha de pesquisa também foi desenvolvido o KL-4 (Surfaxin[®], Discovery Laboratories, Daylestown, Estados Unidos) que consiste num polipeptídeo de 21 unidades de seqüência fixa de lisina e leucina que mimetiza as propriedades da SP-B, adicionado de fosfolípides. O produto comercial possui na sua composição, além do KL-4, dipalmitoilfosfatidilcolina, ácido palmítico e palmitoiloleoilfosfatidilglicerol. Vários estudos têm demonstrado eficácia do KL-4, tanto no tratamento da SDR (Cochrane et al., 1996a; Robertson et al., 2000), como da síndrome de aspiração meconial, semelhante à obtida com surfactantes de origem animal (Cochrane et al., 1996b).

A SP-D recombinante é um fragmento da SP-D truncado, que mantém a atividade biológica *in vivo* e *in vitro*, sendo mais resistente à denaturação sob a forma de nebulização que a SP-D natural, podendo ser útil em pacientes não intubados. Estudos experimentais demonstraram a sua efetividade em reduzir o número excessivo de macrófagos na luz

alveolar, além de promover a homeostase de lípidos e facilitar o clareamento de células apoptóticas, diminuindo os efeitos do processo inflamatório (Clark e Reid, 2003).

1.3.3. Extração e produção

A produção do surfactante para o uso clínico, seja natural ou sintético, passa por processos que encarecem o produto final.

O surfactante natural homólogo é obtido através da coleta de líquido amniótico de partos cesáreos seguida de extração e purificação através da centrifugação pelo gradiente de densidade com sucrose e filtração com malha de nylon (Hallman et al., 1983). O produto final é liofilizado e contém cerca de 34 % de PC saturada e 51% de outros fosfolípidos, 19 % de lípidos neutros (colesterol e ácidos graxos) e 6% de proteínas. Depois de ressuspenso em salina a 0,6%, tem concentração final de fosfolípidos de 20mg/ml, sendo estocado a 20 °C negativos. É o único surfactante que contém todas as proteínas específicas. Tem como desvantagens a dificuldade de produção em grandes quantidades e o risco de transmissão de agentes microbianos, especialmente os virais.

Os surfactantes naturais heterólogos são obtidos a partir de extratos de lavados ou macerados pulmonares de suínos ou bovinos, utilizando diferentes técnicas de extração com solventes orgânicos (Quadro 1). Estes surfactantes contêm SP-B e SP-C (Whitsett et al, 1986), sendo que os processos de produção e de extração são complexos e dependem de

equipamentos sofisticados e caros. (Fujiwara e Robertson, 1992; Mercier e Soll, 1993).

Os surfactantes sintéticos são constituídos por fosfolípidos produzidos em laboratório com adição de substâncias facilitadoras de dispersão e adsorção na superfície alveolar, não contém as proteínas específicas do surfactante (De Angelis e Findlay, 1993) (Quadro 1).

Os novos surfactantes sintéticos são baseados em lípidos sintéticos e proteínas recombinantes obtidas através de técnicas de engenharia genética (Holm e Waring, 1993; Clark e Reid, 2003).

1.3.4. Indicações

A terapêutica de reposição com o surfactante exógeno está indicada nas doenças decorrentes de deficiência quantitativa (redução do pool) e nas deficiências qualitativas (por inativação) do surfactante. Classicamente, está indicada na doença das membranas hialinas ou síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido, com o objetivo de repor o pool de surfactante que está diminuído nos pulmões imaturos. Atualmente, sabe-se também que o surfactante protege contra o influxo de proteínas para a luz alveolar em pulmões com SDR (Jobe et al., 1983; Robertson, 1985; Ikegami, 1994; Yukitake et al., 1995; Seidner et al., 1995).

Estudos do pool de surfactante levaram à conclusão de que a concentração de lípidos na superfície alveolar ao nascimento deve se situar ao redor de 30 mg/Kg (Ikegami et al., 1980; Stevens et al., 1989; Rebello et al., 1996b). Baseado tanto nesta prerrogativa como no conhecimento da

inativação do surfactante por proteínas, postulou-se que a dose do surfactante exógeno pode variar de 50 a 200 mg/kg (Adams et al., 1970 e Fujiwara, 1984).

A administração em bolo tem se mostrado eficaz em estudos experimentais, principalmente se realizada antes da primeira respiração (Jobe et al., 1984), não sendo necessárias manobras de mudanças de posicionamento (Broadbent et al., 1995).

Outras indicações para o uso do surfactante exógeno são as doenças decorrentes de sua deficiência qualitativa (Robertson, 1996). Nestes casos, os resultados são controversos, sendo ressaltado o aspecto da dose dependência na eficácia do tratamento. O surfactante exógeno tem sido utilizado na síndrome de aspiração meconial (Halliday et al., 1996); nas pneumonias graves do período neonatal (Herting et al., 2000) e na síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo (Royal et al., 1988; Lewis et al., 1994) e na hemorragia pulmonar (Raju e Langenberg, 1993; Garland et al., 1994).

1.3.5. Efeitos do uso do surfactante exógeno

Baseados em estudos animais e clínicos, os principais efeitos da terapêutica de reposição do surfactante sobre o pulmão imaturo com SDR foram determinados. Inicialmente ocorre um rápido e intenso aumento na oxigenação, minutos após a administração do surfactante, refletindo no aumento da arterial de oxigênio. A seguir, ocorre uma melhora na complacência dinâmica com maior recrutamento alveolar, levando a

aumento da capacidade residual funcional. Este efeito reflete na menor necessidade de pico de pressão inspiratória, permitindo uma redução da MAP para se atingir uma ventilação e oxigenação adequada (Fujiwara et al., 1990; Rebello et al., 1996).

O padrão de avaliação de mecânica estática é a curva pressão-volume, que permite a avaliação dos volumes pulmonares em modelos experimentais. Quando comparados com animais prematuros não tratados com o surfactante, observa-se que esta terapêutica leva a uma menor pressão de abertura pulmonar na fase inspiratória, que é a pressão a qual o volume pulmonar vence o espaço morto e inicia a expansão (Shardonofsky et al., 1990); resulta em maiores volumes pulmonares, o que reflete no maior recrutamento alveolar, e determina uma maior estabilização dos volumes pulmonares na deflação devido a maior estabilidade alveolar na expiração (Rider et al, 1992) resultando em uma melhora mais acentuada da oxigenação. (Goldsmith, 1991; Goerke, 1992; Jobe e Ikegami, 2000).

O uso do surfactante também reduz a ocorrência do edema alveolar decorrente da imaturidade pulmonar e da lesão causada pela ventilação artificial após o nascimento (Adams et al., 1978; Jobe et al., 1981; Dunn et al., 1991; Jobe e Ikegami, 1994), assim como reduz a incidência do pneumotórax e a mortalidade (Morley, 1991).

Do ponto de vista histopatológico, os pulmões que receberam surfactante exógeno demonstraram maior uniformidade na expansão alveolar (Goldsmith, 1991) com menos áreas de atelectasias ou de hiperinsuflação (Arcas et al., 2000).

Quadro 1.- Métodos de produção dos surfactantes disponíveis para o uso clínico

Nome genérico	Nome comercial	Preparação	Laboratório
Beractanto	Survanta [®]	Macerado de pulmão bovino, adição de ácido palmítico, DPPC e tripalmitina.	Abbott Laboratories (Estados Unidos)
Surfactant - TA	Surfacten [®]	Macerado de pulmão bovino, adição de DPPC, tripalmitoil-glicerol e ácido palmítico	Tokoyo Tanabe, Japão
Surfactante Porcino	Curosurf [®]	Macerado de pulmão porcino, extraído com clorofórmio-metanol, cromatografia em gel líquido	Chiesi Pharma., Itália
Extrato de pulmão de bezerro	Infasurf [®]	Lavado de pulmão bovino, extraído com clorofórmio-metanol	Forrest Lab, Estados Unidos
SF-RI 1	Alveofact [®]	Lavado de pulmão bovino, extraído com clorofórmio-metanol	Boehringer, Alemanha
ALEC*	Pneumactant [®]	DPPC e fosfatidilglicerol na razão 7 : 3	Britannia Pharmaceuticals, Reino Unido
CPHT**	Exosurf [®]	DPPC com 9% hexadecanol e 6% tyloxapol	Burroughs Wellcome Co., Estados Unidos

*ALEC artificial lung expanding compound

**CPHT colfosceril palmitato, hexadecanol, tyloxapol

FONTE: Holm e Waring, 1993

1.3.6. Custos da terapêutica de reposição com o surfactante exógeno.

A escolha do melhor surfactante para cada caso clínico depende de alguns fatores onde são confrontados os aspectos físico-químicos da

preparação e etiopatogênicos em questão. Mas muitas vezes, a decisão final é limitada pela disponibilidade do produto no determinado serviço de saúde. No geral, os surfactantes naturais são os mais indicados por conter SP-B e SP-C na sua composição, tendo assim maior resistência à inativação, além de apresentar uma resposta mais imediata. Infelizmente, este tratamento é oneroso.

A produção do surfactante natural é feita a partir de um grande volume de material pulmonar, necessitando de equipamentos e matéria-prima sofisticados para a sua extração e purificação. Por ser produto de origem animal, são necessários processos de controle animal e de esterilização. Finalmente, o produto final recebe ainda adição de substâncias químicas a fim de melhorar o seu desempenho na aplicação. Desta forma, o surfactante obtido ao final de todo o processo é de pequeno volume e caro, em relação à matéria-prima pulmonar inicial.

Não obstante, os produtos disponíveis no mercado brasileiro, são obtidos via importação, o que aumenta ainda mais os custos do tratamento. Estima-se um custo aproximado de US\$ 500 para cada dose (Robertson e Halliday, 1998; Kubrusly et al., 2000).

1.3.7 O surfactante Butantan

Em vista desta realidade, o Instituto Butantan desenvolveu, em associação com o Instituto de Química da USP, a SADIA S.A. e com verba

da FAPESP (processos nº 97/11650-1 e 96/1405-7), uma nova metodologia de extração e purificação de surfactante a partir da extração orgânica de macerado de pulmão suíno, acoplada à adsorção em DEAE-celulose. Esta tecnologia é inédita e de baixo custo, decorrente do desenvolvimento de uma técnica que dispensa o uso de equipamentos complexos e caros visando, no futuro, ampliar a disponibilização deste produto para os serviços de saúde. O custo estimado deste novo surfactante é de cerca de um terço do custo estimado atual (Kubrusly et al., 2000).

1.4. Modelos experimentais de disfunção do surfactante e de terapêutica de reposição do surfactante exógeno.

O uso de modelos experimentais para o estudo da SDR foi amplamente revisado por Robertson e Lachmann (1988) e Robertson (1992).

O modelo pioneiro de depleção do surfactante pulmonar foi obtido a partir da remoção do pool alveolar em ratos adultos em 1967, sendo útil para o estudo da mecânica pulmonar estática (Rüfer, 1967). Este modelo foi mais tarde adotado em diversos estudos de deficiência do surfactante (Bermel et al, 1984). Já nessa época, era conhecido que o pulmão depletado de surfactante apresentava alta pressão de abertura, sendo necessárias maiores pressões para se atingir o volume pulmonar máximo.

Os modelos experimentais mais utilizados de SDR são com o uso do coelho ou do cordeiro prematuro, e são baseados na imaturidade

pulmonar, com baixo pool endógeno de surfactante, resultando em evidências morfológicas de DMH. Estudos utilizando primatas são os que mais se aproximam de recém-nascidos humanos, porém este modelo é de alto custo, não apresentando vantagem em relação ao coelho ou ao cordeiro no estudo do metabolismo ou de repercussões fisiológicas agudas do tratamento com surfactante exógeno.

Outros modelos freqüentemente utilizados são baseados na remoção do surfactante através de lavados brônquio-alveolares, utilizando coelhos, porcos e ratos adultos. A grande desvantagem deste modelo no estudo da SDR é a ausência da imaturidade estrutural pulmonar, além de lesão causada pela manipulação.

O modelo do coelho prematuro de 26 a 27 dias de gestação, sendo termo aos 31 dias, é universalmente aceito para estudo de SDR. Foi utilizado inicialmente por Enhorning e Robertson em 1972, demonstrando melhora da expansão pulmonar após instilação traqueal do surfactante natural. Aos 26 dias de gestação o pulmão do coelho é praticamente destituído de surfactante, e a quantidade de mRNA da proteína A é quase nula no epitélio alveolar, estando ausente a SP-A no parênquima pulmonar. (Kikkawa et al., 1968; Snyder e Mendelson, 1987).

Neste modelo animal, o estágio de maturação pulmonar aos 27 dias de gestação corresponde ao final da fase sacular, iniciando a transição para a fase alveolar, com septos interalveolares finos e um início do aumento do número de capilares (Karnak et al., 1999). A diferença essencial do coelho de 27 dias e de 31 dias é a maturação do sistema surfactante.

Quanto à morfologia pulmonar, necrose e descamação do epitélio bronquiolar estão presentes em coelhos prematuros logo após o nascimento, mesmo sem apresentar respiração espontânea (Nilsson e Robertson, 1985), sendo agravados e acelerados pela ventilação mecânica (Nilsson et al., 1978; Grossman et al., 1986).

Quanto à mecânica pulmonar, estes animais não conseguem gerar pressão transpulmonar suficiente para abrir as vias aéreas, tornando os condutos aéreos virtualmente não aerados, com uma eliminação quase que completa do ar inspirado na expiração, levando a uma redução acentuada na capacidade residual funcional. (Lachman et al., 1979).

Em relação à mecânica pulmonar, neste modelo há uma melhora significativa na complacência com a adição de surfactante logo no início da respiração (Nilsson, 1982; Lachman et al., 1981). A administração de dose apropriada de surfactante prolonga a constante de tempo expiratório (Noack et al., 1990), melhora a complacência pulmonar e aumenta o volume de gás residual ao final da expiração. Com doses maiores de surfactante pode-se atingir valores de complacência semelhantes aos encontrados em animais de termo, aumentando significativamente a quantidade de ar ao final da expiração (Sun et al., 1991).

A administração do surfactante também reduz o influxo de proteínas para o interior dos alvéolos (Robertson et al., 1985), com menor formação de membranas hialinas (Cutz et al., 1978), resultado de uma inflação alveolar mais homogênea.

Devido a grande número de animais por ninhada (6 a 12 filhotes por fêmea), este modelo permite o estudo de vários animais em série, diminuindo o tempo do experimento e minimizando os eventuais efeitos da demora do nascimento sobre a qualidade do pulmão estudado. O coelho prematuro permite ainda ao estudo de gases sanguíneos ao final do período de ventilação por punção cardíaca e, através da utilização de albumina marcada com isótopos radioativos, permite o estudo do influxo de proteínas do soro para o interstício pulmonar e o espaço alveolar (Robertson et al., 1985).

Em virtude do tamanho reduzido do animal, curto período de gestação e grande número de animais por ninhada, o modelo de imaturidade pulmonar utilizando o coelho prematuro apresenta custo reduzido em relação aos animais de maior porte (cordeiro e primatas).

O modelo do cordeiro prematuro tem como principal vantagem o tamanho do animal prematuro (1,8 a 2,5 kg), que permite o acesso vascular com monitorização gasométrica e hemodinâmica, além da infusão de fluidos por via intravenosa, sendo possível a realização de estudos sobre permeabilidade proteica intersticial e alveolar e, principalmente, o desenho de estudos com prolongado tempo de ventilação (Jobe et al., 1983).

Por outro lado, a utilização de modelos de animais de grande porte como cordeiros e macacos, têm como desvantagens o tempo prolongado de gestação, o pequeno número de animais por ninhada e, principalmente, a dificuldade de obtenção destes animais assim como o seu custo elevado.

1.5. Hipótese

Tendo em vista a importância que o surfactante exógeno representa na medicina, particularmente na neonatologia, como um recurso terapêutico de impacto, não somente na síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido, mas também em outras doenças; e, devido ao desenvolvimento de uma nova técnica de extração e purificação, foi realizado este estudo a fim de testar o novo surfactante produzido pelo Instituto Butantan.

A nossa hipótese é a de que o Surfactante Butantan apresenta uma eficácia semelhante à de outro surfactante de origem animal, disponível no país para uso clínico.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar, utilizando o modelo experimental de coelhos prematuros, a eficácia do surfactante Butantan, quanto às propriedades mecânicas e características histopatológicas pulmonares, comparando esta eficácia em relação à de um surfactante já disponível para o uso clínico rotineiro.

Objetivos específicos:

- Determinar, utilizando o modelo experimental de coelhos prematuros, os efeitos da administração do surfactante Butantan sobre a complacência torácica dinâmica, a pressão ventilatória e a histerese da curva pressão-volume, comparando estes efeitos aos produzidos por um surfactante de uso clínico rotineiro.
- Estimar os efeitos da administração do surfactante Butantan sobre a ocorrência de aeração normal, de áreas de atelectasia e de hiperinsuflação, através da determinação do tamanho alveolar médio e cálculo do índice de distorção do parênquima pulmonar, comparando estes efeitos aos obtidos com um surfactante de uso clínico rotineiro.

3. Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, sendo cego nos grupos tratados, tendo sido realizado no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP e na Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto da Criança – HC-FMUSP (Departamento de Pediatria - FMUSP).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 426/02), e obteve o apoio financeiro da FAPESP (processo 98/14482-5).

3.1. *Surfactantes*

3.1.1. *Survanta*[®]

Survanta[®] (*Ross Products Division, Abbott Laboratories*, Estados Unidos), de nome genérico Beractanto, é um surfactante aprovado para o uso clínico, obtido por extrato de solvente orgânico de macerado de pulmão bovino adicionado de colfosceril palmitato (dipalmitoilfosfatidilcolina), ácido palmítico e tripalmitina, contém menos de 1% (por massa) de proteínas hidrofóbicas do surfactante SP-B e SP-C, 88 a 90% de fosfolípidos do surfactante (sendo 50% DPPC saturada), 3% de triglicérides, 0,2% colesterol e 6% de ácidos graxos livres, suspensos em solução de cloreto de

sódio a 0,9%, sendo fornecido na concentração de 25 mg/ml de lípidos. A solução final é apresentada como um líquido opaco, de esbranquiçado à marrom claro. Deve ser armazenado sob refrigeração de 2 a 8 °C e protegido da luz.

3.1.2. Surfactante Butantan

O Surfactante Butantan foi desenvolvido pelo Instituto Butantan, sendo fornecido em uma concentração de 25 mg/ml. Este surfactante se caracteriza por conter as proteínas lipossolúveis SP-B e SP-C, e composição fosfolipídica semelhante à do surfactante natural dos mamíferos. Trata-se de um surfactante derivado de pulmão de suínos, obtido através de extração orgânica de macerado pulmonar, acoplada a adsorção em um derivado de celulose (dietilaminoetil - DEAE), evitando assim, a formação de grandes volumes e a necessidade de centrifugação em altas velocidades, reduzindo os custos de produção.

Após a extração, o material foi testado sendo fixado pelo método de floculação tricomplexa com $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, revelando a fase lamelar do fosfolípide, comprovado através de microscopia eletrônica; sendo, a fase lamelar a que tem melhor atividade de superfície (Cianciarullo et al., 2001). Como resultante, obtém-se uma suspensão amarelo-opaco com pH entre 6 e 7, contendo os lípidos que compõem um surfactante natural e as duas proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C. A tensão superficial do produto final é semelhante ao descrito para outros surfactantes exógenos extraído de mamíferos. A composição lipídica é de 76% de fosfatidilcolina, 6 a 8 % de

fosfatidiletanolamina, 6% de fosfatidilglicerol, 6% de fosfatidil-inositol e fosfatidilserina e 4 a 6 % esfingomielina. Cerca de 30 a 35 % dos fosfolípides é representada por dipalmitoilfosfatidilcolina saturada. Concentração de proteínas é de 5,6% (por massa) do total da composição. O surfactante Butantan foi fornecido na concentração de 25 mg/ml de lípides.

A dose de surfactante administrada aos animais após o nascimento foi de 50 mg/kg, para os dois tipos de surfactantes testados.

3.2. Animais de experimentação

3.2.1. Nascimento

Foram utilizadas coelhas grávidas da raça New-Zealand-White (Benjamin Fleder[®] Ltda., Moji das Cruzes, S.P.), com idade gestacional conhecida por cruzamento realizado em datas programadas. Após a confirmação da gravidez, foi considerado dia zero da gestação, a data do cruzamento. No 27º dia de gestação os animais foram sedados com injeção intramuscular de quetamina (10 mg/kg) e acepromazina (0,1 mg/Kg), seguida de raquianestesia com 2 ml de solução de marcaína-xylocaína a 2% (1:1;vol.:vol.) e submetidos ao parto cesareano. Durante a cesárea a fêmea permaneceu em decúbito dorsal, com cabeça elevada, recebendo oxigênio por máscara. Seguindo-se a abertura da parede abdominal e do útero, os fetos foram removidos, um por vez, a partir da extremidade distal de cada

cornio uterino, sendo retiradas membranas, secados e pesados individualmente.

Após o nascimento cada animal foi colocado sobre o colchão térmico, seguindo-se de sedação com 10 mg/kg de quetamina e 0,1 mg/kg de acepromazina por via intraperitoneal e anestesia local na região anterior do pescoço com xylocaína a 2%. Os animais foram então traqueostomizados com cânula de metal inoxidável (18 GA) fixada em fio de algodão para a administração de surfactante e ventilação mecânica.

3.2.2. Grupos de estudo

Após a realização da traqueostomia os recém-nascidos foram randomicamente tratados com uma das duas soluções de surfactante estudadas; sendo que, o primeiro animal de cada ninhada foi classificado diretamente para grupo controle, não sendo administrado surfactante ou outra substância via intratraqueal, a fim de testar a maturidade pulmonar da ninhada em questão. Esta seqüência foi mantida de modo contínuo entre as várias ninhadas, a fim de se evitar que a administração de um determinado tipo de surfactante se associasse a uma determinada posição no útero ou a uma particular ordem de nascimento. Caso o animal controle apresentasse uma excessiva maturidade pulmonar (isto é, baixas pressões no ventilador para a obtenção de um volume-corrente alvo de 8 ml/kg), era repetido um segundo controle da ninhada. Se a maturidade pulmonar fosse confirmada neste segundo controle, todo o grupo de fetos daquela ninhada era descartado, evitando-se que a maturidade pulmonar espontânea interferisse

nos resultados. Após a instilação intratraqueal de surfactante (ajustada de acordo com o peso de nascimento) realizada com auxílio de um fino cateter passado pelo interior da cânula traqueal, cada animal foi ventilado manualmente por 5 vezes, utilizando-se balão auto-inflável a uma FiO_2 a 100%.

3.2.3. Ventilação mecânica

Imediatamente após o tratamento, cada animal foi removido para um sistema de ventilação mecânica (Rodent-Harvard® 683, Harvard Apparatus CO.; South Natick, MA) acoplada a um pletismógrafo de acrílico transparente (Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP), sendo então iniciada ventilação mecânica com fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 21%; pressão inspiratória (PIP) necessária para se obter um volume-corrente alvo de 8 ml/kg; pressão expiratória (PEEP), 0 cmH₂O; frequência respiratória (FR), 60 ciclos/min; tempo inspiratório (T_i), 0,5 seg; tempo expiratório (T_e), 0,5 seg; fluxo, 10 l/min, e duração da ventilação de 20 minutos.

A pressão ventilatória foi avaliada a partir da medida da pressão traqueal, obtida através de um transdutor de pressão (Validyne DP 45-28-2114) conectado a um tubo em “T”, ligado em série à cânula traqueal, sendo a diferença entre a pressão inspiratória e a pressão expiratória final positiva. Em outra saída, na extremidade oposta do pletismógrafo, foi conectado o transdutor para as medidas de volume (Validyne DP 45-16-2114). Os sinais de pressão traqueal e volume foram registrados num pletismógrafo Gould

RS 3400 e armazenados em um microcomputador (IBM-PC 286) através de um conversor analógico digital de 12 bites (DT 2801^A, Data Translation) a uma frequência de 200 Hz. Os valores de volume foram obtidos através da derivação do sinal de fluxo através do programa ANADAT 4,0 (ANADAT-RHT-INFO-DATA INC. Montreal, Canadá). Os sinais de volume e pressão foram registrados continuamente em papel milimetrado do polígrafo, permitindo a detecção de qualquer interferência na ventilação dos animais. Durante todo o período de ventilação o volume-corrente foi ajustado individualmente, de modo a se obter, para cada animal, um volume-corrente alvo de 8 ml/kg. Este valor foi escolhido por permitir uma ventilação alveolar adequada neste modelo animal (Sun, 1991). A cada 5 minutos de ventilação, a pressão ventilatória e o volume-corrente de cada animal foram registrados, sendo calculada a complacência dinâmica (CD) pela fórmula: $CD = \{ \text{volume-corrente (ml)} \div \text{Peso de nascimento (kg)} \} / \text{Pressão ventilatória (cmH}_2\text{O)}$; sendo a pressão ventilatória: $PV = \text{pressão inspiratória (cmH}_2\text{O)} - \text{pressão expiratória positiva final (cmH}_2\text{O)}$.

3.2.4. Curva pressão-volume pulmonar

Após o término da ventilação os animais foram sedados com quetamina-acepromazina intraperitoneal nas mesmas doses, ocluindo-se as cânulas traqueais a fim de se obter reabsorção do ar com colapso pulmonar. Após 5 minutos de clampeamento da traquéia, os animais foram sacrificados por injeção intratecal de 0.5 ml de xylocaína a 2%. Através de uma coluna de água em "U", onde uma das extremidades é aberta para o

ambiente, foi realizada a curva pressão-volume. Os pulmões foram gradualmente insuflados em intervalos de pressão de 5 cmH₂O, até a pressão máxima de 30 cmH₂O, sendo medido o volume pulmonar após a estabilização, 30 segundos depois de alcançado cada intervalo de pressão. O mesmo procedimento foi realizado a intervalos decrescentes de 5 cmH₂O, até a pressão final de 0 cmH₂O. Os volumes pulmonares foram corrigidos para a complacência do sistema, sendo expressos em ml/kg de peso corpóreo.

3.2.5. Critérios de exclusão

Foi determinado, como critério de exclusão, a ocorrência de peso de nascimento inferior a 20g ou superior a 40 g; maturidade pulmonar excessiva comprovada para este modelo experimental (através do controle de cada ninhada); presença de pneumotórax (na ventilação mecânica ou na curva PV), morte de causa indeterminada durante o experimento, vitalidade materna comprometida (choque, taquicardia, bradicardia, taqui ou bradipnéia, febre, cianose), vitalidade do recém-nascido comprometida.

Na ocorrência de pneumotórax, foram excluídos apenas os dados posteriores ao evento, sendo incluídos os dados adquiridos anteriormente.

3.2.6. Manipulação e processamento dos pulmões

Ao término da ventilação, em um subgrupo de animais dentro de cada um dos três grupos de estudo, os pulmões foram insuflados até 30 cm de água seguido de clampeamento da traquéia e exsangüinados através da

secção da aorta abdominal. Estes pulmões foram, então, dissecados e congelados em nitrogênio líquido, seguindo-se de fixação em solução de Carnoy (etanol: clorofórmio: ácido acético 60:30:10 por volume) e mantidos congelados a -70°C . Após 24 horas, a concentração de etanol foi progressivamente aumentada, a uma temperatura de -20°C , sendo modificados as proporções anteriores para 70:22,5:7,5, depois para 80:15:5 e finalmente para 90:7,5:2,5 ; permanecendo os pulmões imersos por 1 hora em cada solução, e, por fim, em 100% de etanol. Finalmente, após 24 horas os pulmões foram transferidos para etanol a 4°C e, a seguir, deixados em temperatura ambiente em formol a 10%.

Após a fixação, cortes sagitais de 1,0 cm proximal (próximo ao hilo) e 0,3 cm distal (área oposta ao hilo pulmonar) foram obtidos e embebidos em parafina; destes blocos foram realizados cortes de 4 micrômetros e corados em hematoxilina-eosina (Dolhnikoff, M; *et al*, 1997).

3.3. Histopatologia

A análise morfométrica foi feita através de microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse E 600, Japão) com aumento de 200 vezes. O tamanho alveolar foi estimado pela média das medidas do intercepto linear (Lm) (método modificado de Thurlbeck) (Thurlbeck, 1967a; Thurlbeck, 1967b), onde 20 campos microscópicos não sobrepostos foram examinados através de uma grade de 50 retas e 100 pontos, adaptada na lente ocular. Para cada pulmão preparado, foram analisados 10 campos do corte

proximal e 10 campos do corte distal. A medida do Lm foi calculada pela relação do tamanho da reta (μm) x 1000 sobre o número de interceptos, sendo que para o aumento utilizado, a reta mediu 2500 μm . Para analisar a heterogeneidade de aeração do parênquima, foi calculado o índice de distorção (ID) (Eidelman, 1993), determinado pelo desvio padrão das médias do Lm de cada grupo, sendo um índice de variação campo a campo do número de interceptos. A leitura foi cega, realizadas por 2 examinadores.

3.4. Análise estatística

O tamanho de amostra calculado para se encontrar uma diferença entre os valores de complacência dinâmica entre os grupos de estudo da ordem de 0,05 ml/kg.cmH₂O (Ikegami et al., 1987), considerando-se um desvio-padrão de 0,03, um poder de teste de 0,8 e um nível de significância de 0,05, foi de 8 animais para cada um dos 3 grupos de estudo. As comparações entre as variáveis contínuas foram realizadas utilizando-se análise de variância ANOVA ONE-WAY, sendo utilizado Student-Newman-Keuls como pós-teste discriminatório.

Para a análise estatística foi utilizado o software SigmaStat® (SigmaStat Statistical Software™, 1997), e a confecção dos gráficos, através do programa SigmaPlot® (SigmaPlot Scientific Graphing Software for Windows™, 1994).

3.5. Desenho do estudo

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Descrição e caracterização dos grupos de estudo

Os pesos médios dos animais estão representados na Tabela 1. Houve diferença significativa entre o peso médio do grupo Butantan em relação aos grupos Controle e Survanta ($p < 0,05$). No total foram estudados 74 coelhos prematuros, sendo: 28 do grupo controle, 24 do grupo Survanta e 22 do grupo Butantan. Foram excluídos aqueles que tiveram complicações durante o experimento, no caso, pneumotórax ou óbito de causa não definida. A distribuição dos animais por grupo de estudo e em cada fase do experimento está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Peso de nascimento (média $\pm$ dp), distribuição dos animais por grupo de estudo em cada fase do experimento e número de complicações por grupo

	PESO (g)	n (TOTAL)	VM	PNTX	ÓBITO	CURVA P-V	MORF.
CONTROLE	27,7 $\pm$ 3,9	30	28	3	2	15	8
BUTANTAN	23,2 $\pm$ 2,0*	22	22	0	0	12	10
SURVANTA	26,4 $\pm$ 3,2	24	24	3	0	11	10

NOTA: VM, ventilação mecânica; PNTX, pneumotórax; MORF, morfometria pulmonar

* $p < 0,05$ vs Controle e Survanta

4.2. Volume-corrente

Os animais foram ventilados objetivando volume-corrente alvo de 8 ml/kg (Tabela 2; Gráfico 1); não houve variação significativa quanto ao volume-corrente entre os grupos estudados.

Tabela 2 - Valores de volume-corrente por grupo de estudo (ml/kg), a cada intervalo de 5 minutos de ventilação e no total do período de ventilação (valores em média $\pm$ dp)

TEMPO (min)	VOLUME-CORRENTE (ml/kg)		
	CONTROLE	BUTANTAN	SURVANTA
5	7,96 $\pm$ 0,46	8,00 $\pm$ 0,34	7,83 $\pm$ 0,59
10	8,02 $\pm$ 0,36	7,92 $\pm$ 0,50	7,87 $\pm$ 0,44
15	8,02 $\pm$ 0,42	7,89 $\pm$ 0,42	7,82 $\pm$ 0,62
20	7,97 $\pm$ 0,28	7,82 $\pm$ 0,53	7,70 $\pm$ 0,83

Gráfico 1 - Volume corrente (ml/kg) a cada 5 minutos de ventilação por grupo de estudo (média $\pm$ dp)

4.3. Pressão ventilatória

Foi determinada a pressão ventilatória a cada 5 minutos de ventilação (Tabela 3; Gráfico 2). Os animais que receberam o surfactante Butantan ou Survanta necessitaram de menor pressão ventilatória do que o grupo controle durante todo o procedimento. Não foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos tratados.

Tabela 3 - Valores de pressão ventilatória (cmH₂O) por grupo de estudo, a cada 5 minutos de ventilação (média $\pm$ dp)

TEMPO (min)	PRESSÃO VENTILATÓRIA (cmH ₂ O)		
	CONTROLE	BUTANTAN	SURVANTA
5	34,35 $\pm$ 4,60*	24,68 $\pm$ 3,22	25,95 $\pm$ 2,07
10	33,24 $\pm$ 4,17*	24,14 $\pm$ 3,53	25,75 $\pm$ 1,77
15	32,69 $\pm$ 4,16*	24,30 $\pm$ 3,70	25,18 $\pm$ 1,58
20	31,76 $\pm$ 4,10*	24,23 $\pm$ 3,60	24,98 $\pm$ 1,55

* p < 0,05 vs Butantan e Survanta.

Gráfico 2 - Pressão ventilatória (cmH₂O) a cada 5 minutos de ventilação por

grupo de estudo (média $\pm$ dp)

4.4 Complacência dinâmica

Quanto à complacência dinâmica, foi menor entre os animais do grupo controle em relação aos dos grupos tratados. Foram observados melhores resultados com o surfactante Butantan em relação ao Survanta no 5º e no 10º minutos, sendo que não houve diferença significativa entre estes grupos no restante do período de ventilação (Tabela 4; Gráfico 3).

Tabela 4 - Valores de complacência dinâmica (ml/kg.cmH₂O) por grupo de estudo, a cada 5 minutos de ventilação (média ± dp)

TEMPO (min)	COMPLACÊNCIA DINÂMICA (ml/kg.cmH ₂ O)		
	CONTROLE	BUTANTAN	SURVANTA
5	0,236 ± 0,034 [*]	0,328 ± 0,035 ^f	0,303 ± 0,031
10	0,245 ± 0,030 [*]	0,333 ± 0,034 ^f	0,307 ± 0,027
15	0,249 ± 0,029 [*]	0,329 ± 0,035	0,312 ± 0,032
20	0,255 ± 0,032 [*]	0,327 ± 0,037	0,309 ± 0,037

- ^{*} p < 0,05 vs Butantan e Survanta,
- ^f p < 0,05 vs Survanta.

Gráfico 3 - Complacência dinâmica (ml/kg.cmH₂O) por grupo de estudo
(média $\pm$ dp)

4.5. Curva pressão-volume pulmonar

Em relação à curva pressão-volume, foram observados volumes pulmonares maiores nos grupos Butantan e Survanta comparados aos do grupo Controle. Entretanto, diferenças pontuais foram observadas nas pressões de 15, 20 e 25 minutos na fase inspiratória entre os grupos Butantan e Survanta. Observa-se, também, melhor estabilização dos volumes pulmonares na fase expiratória entre os animais dos grupos tratados em relação aos do grupo Controle (Tabela 5, Gráfico 4).

Tabela 5 - Volume pulmonar (ml/kg) para cada intervalo de 5 cmH₂O de pressão, na insuflação e na deflação, por grupo de estudo
(valores em média $\pm$ erro padrão)

PRESSÃO (cmH ₂ O)	VOLUME PULMONAR (ml/kg)		
	CONTROLE	BUTANTAN	SURVANTA
INSUFLAÇÃO 0	0	0	0
INSUFLAÇÃO 5	0,22 $\pm$ 1,22	0,00 $\pm$ 0,85	0,00 $\pm$ 1,24
INSUFLAÇÃO 10	1,23 $\pm$ 1,02	3,70 $\pm$ 0,85	0,00 $\pm$ 0,98
INSUFLAÇÃO 15	4,68 $\pm$ 1,49	4,81 $\pm$ 1,96 [§]	0,00 $\pm$ 1,49
INSUFLAÇÃO 20	3,48 $\pm$ 1,06	13,32 $\pm$ 2,94 [#]	2,25 $\pm$ 0,80
INSUFLAÇÃO 25	9,46 $\pm$ 1,61	30,25 $\pm$ 5,61 [#]	13,01 $\pm$ 2,75
INSUFLAÇÃO 30	19,42 $\pm$ 3,31 [*]	42,86 $\pm$ 7,60	24,97 $\pm$ 4,67
DEFLAÇÃO 25	19,28 $\pm$ 3,12 [*]	43,88 $\pm$ 8,81	29,08 $\pm$ 5,06
DEFLAÇÃO 20	14,32 $\pm$ 4,44 [*]	41,24 $\pm$ 8,77	26,93 $\pm$ 6,01
DEFLAÇÃO 15	16,67 $\pm$ 3,15 [*]	40,51 $\pm$ 9,30	25,31 $\pm$ 5,28
DEFLAÇÃO 10	10,29 $\pm$ 2,78	23,86 $\pm$ 6,03	14,17 $\pm$ 4,45
DEFLAÇÃO 5	7,34 $\pm$ 2,27	1,79 $\pm$ 4,40	9,95 $\pm$ 2,29
DEFLAÇÃO 0	3,65 $\pm$ 1,94	0,33 $\pm$ 2,73	0,71 $\pm$ 1,03

* p<0,05 vs. todos os outros grupos

p<0,05 vs. Controle e Survanta

§ p<0,05 vs. Survanta

Gráfico 4 - Curva pressão-volume dos grupos de estudo (média $\pm$ ep)

4.6. Histopatologia

A análise histopatológica mostrou maiores valores de diâmetro alveolar médio (Lm) e menor índice de distorção entre os animais tanto do grupo Survanta como do grupo que recebeu o novo surfactante (Butantan), comparados ao grupo não tratado. Não houve diferença significativa entre os grupos Survanta e Butantan (Tabela 6; Gráfico 5). Foi observado, também, maior ocorrência de áreas com edema alveolar e derrame de material hialino na luz alveolar no grupo Controle. Imagens representativas de cada grupo de estudo estão reproduzidas nas Figuras 1 a 3.

Tabela 6 - Diâmetro alveolar médio (Lm) expresso em μm e índice de distorção por grupo de estudo (média $\pm$ dp)

	CONTROLE	BUTANTAN	SURVANTA
Lm (μm)	94,3 $\pm$ 16,7*	111,7 $\pm$ 12,5	118, 0 $\pm$ 11,9
ID	4,6 $\pm$ 1,2*	2,8 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,8

* $p < 0,05$ vs. Butantan e Survanta.

Gráfico 5 - Diâmetro alveolar médio (μm) e índice de distorção entre os grupos de estudo (média $\pm$ dp)

Figura 1 -. Parênquima pulmonar de um animal do grupo controle evidenciando áreas de atelectasia e áreas de hiperdistensão, caracterizando o padrão heterogêneo da aeração.

A: aumento 100x; B: aumento 200x

Figura 1 A

Figura 1 B

Figura 2 - Parênquima pulmonar de um animal do grupo Butantan evidenciando predomínio de áreas de aeração normal.

A: aumento 100x; B: aumento 200x

Figura 2 A

Figura 2 B

Figura 3 - Parênquima pulmonar de um animal do grupo Survanta

evidenciando predomínio de áreas de aeração normal.

A: aumento 100x; B: aumento 200x

Figura 2 A

Figura 2 B

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O uso do surfactante pulmonar exógeno tem sido uma indicação crescente na neonatologia, em parte devido à melhoria da medicina perinatal com a redução do limite da viabilidade fetal, que resulta em nascimentos de crianças cada vez mais prematuras com maior deficiência de surfactante, tanto na sua quantidade como em relação à qualidade de seus componentes. No nosso meio a morbi-mortalidade decorrente da SDR ainda é elevada, com de cerca de 37,5% de óbitos por SDR, com uma taxa de uso do surfactante de 29% (Leone et al., 2001).

A eficácia desta terapêutica na síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido foi descrita pela primeira vez por Fujiwara e colaboradores em 1980. Desde então, inúmeras investigações experimentais e clínicas foram realizadas com o objetivo de descrever o metabolismo do surfactante endógeno e exógeno, os efeitos da reposição exógena, a eficácia das diferentes composições, as técnicas de administração, a resistência à inativação por proteínas e os custos de produção. Em adição, são reconhecidas doenças onde há deficiência qualitativa do surfactante, basicamente decorrente da inativação do mesmo, a partir da presença de proteínas anômalas no interior dos alvéolos. Não obstante, o surfactante tem sido aventado como possibilidade terapêutica para outras doenças respiratórias que não a SDR, inclusive em pacientes de outras faixas etárias que não a do recém-nascido.

Desta forma, a importância da SDR na neonatologia justifica, por si só, o desenvolvimento de uma linha de pesquisa para seu estudo em nosso meio. Este estudo representou o início de uma linha de pesquisa no campo do metabolismo e função do surfactante pulmonar no Departamento de Pediatria da FMUSP, tendo sido possível, por meio dele, a alocação de recursos junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), para o desenvolvimento de um laboratório de pesquisa equipado para este fim (Processo 98/14482-5).

Infelizmente, o surfactante é um produto cuja obtenção não é fácil. Ao longo dos últimos 30 anos, têm sido desenvolvidas melhorias tanto nas técnicas de isolamento e purificação do surfactante, quanto de sua produção em forma sintética, a fim de aperfeiçoar o produto final. Até o presente momento, o surfactante natural, extraído de animais, ainda é o mais eficaz e o mais resistente à inativação (Ikegami et al., 1981; Ikegami et al., 1977; Soll e Blanco, 2001; Halliday, 1996b; Fijumukai et al., 1987). No entanto, a sua produção ainda é bastante onerosa devido à necessidade de processos e equipamentos complexos e de alto custo para extração e purificação a partir de matéria-prima animal. Em nosso meio, o custo final do surfactante é encarecido também pela adição de taxas de importação.

Um levantamento recente do Ministério da Saúde, baseado no número de nascimentos prematuros no país, com indicação teórica do uso do surfactante exógeno, levou a uma estimativa da necessidade de 150 a 200 mil doses ao ano (dados não publicados do MS, 2004). O custo estimado atual do surfactante exógeno é de cerca de U\$ 400 a 500 para

cada 100 mg de fosfolípidos. Ainda em processo, o custo estimado do surfactante Butantan, deve girar em torno de 150 a 200 reais (cerca de U\$130) para cada 100mg do produto. Desta forma, caso seja adotado o surfactante Butantan como de escolha no nível nacional, representaria uma economia de cerca de 54 milhões de reais ao ano para o país.

Diante desta realidade, o Instituto Butantan desenvolveu, em associação com o Instituto de Química da USP, a SADIA S.A. e com verba da FAPESP (processo nº 97/11650-1 e 96/1405-7), uma nova metodologia de extração e purificação de surfactante a partir de extração orgânica de macerado de pulmão suíno, acoplada à adsorção em DEAE-celulose. Esta tecnologia é inédita e de baixo custo, em vista do fornecimento dos pulmões diretamente pela SADIA S.A. e, principalmente, pelo desenvolvimento de uma técnica que dispensa o uso de equipamentos complexos e caros (Kubrusly et al., 2000).

O presente estudo se justificou pela necessidade de se testar este novo surfactante produzido com tecnologia nacional.

Foi escolhido o Survanta para comparação com o surfactante Butantan por se tratar de um produto de uso clínico rotineiro e eficácia já reconhecida e, principalmente, devido à sua concentração de 25 mg/ml, semelhante à do surfactante Butantan. Desta forma, o volume do material administrado por via intratraqueal não seria um fator de distorção dos resultados. Além disso, sabe-se que a composição do surfactante entre os animais de diferentes classes de mamíferos é semelhante quanto à quantidade de proteínas e fosfolípidos (Shelley et al., 1984), apesar do

produto comercial apresentar variações na sua composição, decorrente da adição de substâncias, principalmente fosfolípidos, realizados com o objetivo de melhorar seu desempenho.

Vários modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo da síndrome de desconforto respiratório do recém-nascido. O primeiro estudo com a descrição dos efeitos da reposição do surfactante em pulmão com sua deficiência foi publicado em 1967 por Rüfer, utilizando ratos adultos submetidos a inúmeras lavagens para remoção do surfactante. Este mesmo modelo foi utilizado posteriormente também para comparação dos efeitos do tratamento com preparados naturais (Bermel et al., 1984) e sintéticos (Ikegami et al., 1979). Nós optamos por não utilizar este modelo porque ele tem, como grande desvantagem, a ausência de imaturidade estrutural pulmonar, necessária para a reprodução mais adequada das condições reais de função do surfactante em prematuros extremos.

A utilização de animais prematuros de grande porte, destacando-se os modelos com cordeiros e macacos, têm como desvantagem períodos longos de gestação e o elevado custo, além da dificuldade de obtenção dos animais. Desta forma, optamos por não utilizá-los apesar da grande vantagem do estudo dos gases sanguíneos e da monitorização hemodinâmica durante a ventilação, com a possibilidade de realização de pesquisas com maior tempo de ventilação.

Neste estudo, nós optamos pela utilização do modelo experimental do coelho prematuro de 27 dias de gestação, tendo por base suas características de baixo custo, fácil manipulação, e, principalmente, larga

experiência na literatura internacional. Neste modelo, o desenvolvimento pulmonar encontra-se no final da fase sacular, quando a produção do surfactante é mínima (Kikkawa et al., 1968, Snyder e Mendelson, 1987), evitando-se assim que a presença do surfactante natural em quantidades significativas pudesse interferir na resposta ao tratamento e, com isso, influenciar nos resultados.

O peso médio dos animais foi semelhante ao encontrado na literatura para coelhos de 27 dias de idade gestacional utilizados no estudo da mecânica pulmonar (Davis et al., 1998; Kotas e Avery, 1971; Rider et al., 1990; Gladstone et al., 1989). Apesar do encontro de menor peso de nascimento entre os animais do grupo Butantan, não houve influência nos resultados finais, uma vez que todos os animais apresentavam a mesma idade gestacional e foram excluídas as ninhadas com maior maturidade pulmonar espontânea.

A incidência de pneumotórax encontrada neste estudo foi menor que a encontrada na literatura (0,91% e 0,38% respectivamente) para o grupo controle; provavelmente devido ao fato de que a maioria dos trabalhos onde há descrição da ocorrência do pneumotórax, o volume-corrente utilizado na ventilação foi maior, cerca de 10 a 12 ml/kg (Tabor et al., 1991).

Diversas publicações se sucederam com o objetivo de estabelecer as condições ótimas de administração para o estudo da resposta ao surfactante no modelo de coelhos prematuros. Desta forma, alguns autores recomendam a ventilação durante um minuto utilizando uma pressão inicial

de 35 cmH₂O para facilitar a distribuição do surfactante antes da ventilação mecânica (Berggren et al., 1985). Com o objetivo de se obter uma distribuição homogênea do surfactante no momento da administração, foi tomado o cuidado de comprimir o tórax para a retirada do excesso de líquido nas vias aéreas, sem permitir que o animal respirasse, sendo liberada gradativamente a pressão na medida em que a droga foi sendo injetada, fazendo um efeito de pressão negativa, auxiliando a dispersão do material profundamente nas vias aéreas. Após a administração foi realizada, visando uma boa distribuição do medicamento, ventilação manual com ambú por 5 vezes, antes da conexão do animal ao ventilador.

Por outro lado, devido à estimulação tátil do processo de secagem, imediatamente após a remoção das membranas, os animais apresentavam movimentos respiratórios tipo “*gasping*”, resultando em alguma entrada de ar nas vias aéreas, o que poderia prejudicar a homogeneidade da administração do surfactante (Jobe et al., 1981). No entanto, em vista da elevada pressão necessária para ocorrer a expansão alveolar e, pelo aspecto macroscópico homogêneo dos pulmões após a remoção do tórax, podemos afirmar que não houve interferência destes movimentos respiratórios iniciais na distribuição do surfactante.

A dose escolhida para este estudo foi de 50 mg/kg, pois esta foi a dose mínima necessária para se produzir algum efeito na mecânica pulmonar em relação aos coelhos prematuros que não receberam surfactante, baseado em estudos de pool e em estudos experimentais com a comparação de diferentes doses (Stevens et al., 1989; Ikegami et al.,

1980; Fujiwara, 1984). Além disso, utilizando-se a dose mínima para teste, a menor diferença nos resultados seria significativa, representando certamente resposta ao tratamento, maximizando as diferenças obtidas entre os grupos.

O modelo da ventilação e obtenção de dados da mecânica respiratória utilizado neste estudo foi inicialmente testado por Arcas, mostrando ser adequado para o estudo de imaturidade pulmonar (Arcas, 1997). O equipamento utilizado para a ventilação mecânica, o Rodent-Harvard, não possui dispositivo para se manter uma pressão expiratória final positiva. O uso de PEEP igual a 0 cm H₂O representa uma vantagem, uma vez que foi demonstrado que a ausência de PEEP piora a função pulmonar e a resposta ao surfactante, maximizando assim as possíveis diferenças entre os dois produtos testados (Ogawa et al., 1994; Davis et al., 1998; Michna et al., 1999). O encontro de diferença significativa nos parâmetros estudados em relação ao grupo controle nestas condições salienta a boa resposta de ambos os surfactantes testados no pulmão prematuro.

De modo geral, a literatura cita, como parâmetros iniciais de regulação do ventilador neste modelo animal, uma frequência de 30 a 40 ciclos/minuto; tempo inspiratório de 0,5 seg e pressão inspiratória necessária para se obter um volume-corrente alvo de acordo com o determinado pelo pesquisador (Lachmann, 1986a; Lachmann, 1986b).

O volume-corrente de 8 ml/kg adotado neste estudo é igual ao utilizado por outros autores, resultando em uma ventilação adequada neste modelo animal (Sun et al., 1991; Davis et al. 1998; Chen et al., 1995). Os 3 grupos foram ventilados com volumes-correntes semelhantes, próximos ao

valor-alvo desejado, permitindo que os resultados de pressão ventilatória e complacência pulmonar possam ser comparados entre os grupos.

Em relação à pressão ventilatória, o encontro de valores da ordem de 26 a 30 cm H₂O entre os animais do grupo controle está compatível com o encontrado por outros autores para a ventilação de animais desta idade gestacional sem o uso de surfactante exógeno (Davis et al., 1998). A exclusão das ninhadas cujos animais não demonstraram esta resposta garante que não houve maturidade pulmonar espontânea, seja por fatores agravantes maternos ou qualquer outra causa, que pudesse modificar os resultados com ambos surfactantes estudados. A redução da pressão ventilatória observada entre os animais tratados com surfactante foi da ordem de 33%, comparável aos resultados encontrados na literatura (Gladstone, 1989; Ikegami, 1987), mostrando que ambos surfactantes produziram resultados semelhantes nos pulmões, sem diferenças entre os tratamentos.

Os valores de complacência dinâmica encontrados para o grupo controle foram semelhantes aos encontrados na literatura (Chen et al., 1995), porém com tendência a resultados um pouco inferiores para uma ventilação com volume-corrente de 8 ml/kg, confirmando a imaturidade dos animais estudados. Por outro lado, evidenciaram-se os efeitos da recuperação da complacência dinâmica nos grupos tratados, como era esperado, sendo de 33% deste estudo e 17,5% citado na literatura (Davis et al., 1998).

Segundo Fujiwara (Fujiwara et al., 1984) é considerado resposta ótima, quando se obtém volumes superiores a 40 ml/kg com pressões de 5 cmH₂O na fase de deflação da curva pressão-volume pulmonar, correspondendo ao resultado obtido em animais de termo, nas mesmas condições do experimento (Nohara et al., 1986; Kotas e Avery, 1971).

Quanto à mecânica estática deste estudo, os dados foram obtidos após um tempo considerável de ventilação, provavelmente já com presença de lesão pulmonar às custas de edema e com influxo de proteínas para a luz alveolar. Desta forma, o encontro de resultados um pouco melhores na pressão de abertura pulmonar, volume pulmonar máximo (semelhante aos animais de termo) e maior estabilidade na deflação com o Butantan em relação ao Survanta, embora sem diferença estatística, podem ser em decorrência de uma maior quantidade de proteínas específicas (SP-B e SP-C) em sua composição (5,6% contra 1% existente no Survanta). Por outro lado, os valores encontrados são um pouco inferiores aos citados na literatura, onde os experimentos foram realizados utilizando um período mais curto de ventilação (Davis et al., 1998; Chen et al., 1995).

Pulmões com o sistema surfactante intacto possuem um padrão homogêneo de expansão aérea alveolar durante o ciclo ventilatório. No caso de deficiência do surfactante, a expansibilidade pulmonar é heterogênea, com áreas de hiperdistensão durante a insuflação e colapso alveolar difuso no final da expiração (Robertson, 1984; Robertson, 1992).

Descreve-se como condições ideais de preparo dos pulmões para estudos histopatológicos, a fixação dos pulmões após a inflação a uma

pressão de cerca de 30 cm H₂O, seguido da redução para 10 cm H₂O. Recomenda-se a fixação através da perfusão da artéria pulmonar com uma solução de formaldeído a 3,5% e glutaraldeído a 1% (Robertson e Lachmann, 1988), como sendo o método ideal para preservar a expansão alveolar no extremo da insuflação.

Por outro lado, há uma grande dificuldade técnica em animais de pequeno porte, como o utilizado neste estudo, no seu manuseio, incluindo a cateterização de artéria pulmonar. Desta forma, o método de processamento através de exsangüinação, evitando rompimento vascular com extravasamento de material sanguíneo para a luz alveolar, e posterior fixação com método de Carnoy tem se mostrado adequado para o estudo histopatológico em que se baseia não só no estudo morfológico mas também de uma análise quantitativa. (Kubrusly et al., 2000).

O método de fixação com Carnoy geralmente é utilizado para estudos que necessitam de análise trimendimensional das estruturas pulmonares, mas pode ser utilizado com precisão para a histopatologia onde necessita de análise do parênquima pulmonar, com ou sem contagem dos septos. Neste estudo, foi realizado um teste piloto inicial, onde foi impossível a realização do método de perfusão pela dificuldade de cateterização do vaso, levando à perda de vários animais. Assim sendo, o método de fixação com Carnoy, mostrou-se o mais adequado.

Para a avaliação do grau de aeração alveolar normal ou anormal (atelectasia ou hiperinsuflação) determinado por cada tipo de tratamento,

nós optamos pela utilização do *Lm*, que representa uma medida indireta do tamanho alveolar médio.

Os animais tratados com surfactante apresentaram valores de *Lm* superiores aos encontrados nos não tratados, mostrando que, no grupo controle, predominaram áreas de atelectasia em relação aos grupos tratados com surfactante.

O achado de valores semelhantes entre ambos os grupos tratados demonstra, novamente, que ambos surfactantes apresentaram a mesma eficácia quanto ao grau de aeração do parênquima pulmonar.

Os valores absolutos encontrados nos grupos tratados ($111,7 \pm 12,5$ e $118,0 \pm 11,9$ μm) foram maiores do que os publicados por Lyra em 2003, no nosso meio. Utilizando coelhos de termo submetidos a uma pressão transpulmonar de 10 cmH_2O para o preparo dos pulmões para a fixação, este autor valores médios de *Lm* da ordem de 58,7 μm . De modo semelhante, Mascaretti encontrou valores de *Lm* da ordem de 60 μm em coelhos prematuros de 28 dias de gestação mantidos em ar ambiente durante 11 dias. A diferença entre os resultados pode ser explicada não apenas pelo diferente estágio de desenvolvimento pulmonar dos animais, mas também pelo fato de que, neste estudo, optamos pela utilização de uma maior pressão transpulmonar no preparo dos pulmões para a fixação (30 cmH_2O).

Na deficiência qualitativa ou quantitativa do surfactante, o parênquima pulmonar é caracterizado por elevados valores do índice de distorsão (Nohara et al., 1986; Robertson, 1984). Este índice representa, em

última análise, uma medida indireta do grau de variabilidade de aeração das unidades alveolares. Desta forma, o encontro de um menor ID nos grupos tratados era esperado, representando uma maior uniformidade da aeração pulmonar, decorrente da ação direta do surfactante na estabilidade alveolar. Os encontro de valores 50% maiores no grupo Controle mostra a magnitude do efeito estabilizador das unidades alveolares distais de ambas as soluções utilizadas. Novamente, a ausência de diferenças entre as duas soluções demonstra que os efeitos sobre a estabilização alveolar foram semelhantes com a utilização de Survanta ou do surfactante Butantan.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Utilizando o modelo do coelho prematuro, a administração exógena do surfactante Butantan, produzido a partir da extração orgânica acoplada à adsorção em derivado de celulose; uma tecnologia de menor custo desenvolvida no Brasil, resultou em:

- Melhora significativa das propriedades mecânicas pulmonares, com redução da pressão ventilatória necessária para se obter um volume-corrente de 8 ml/kg, aumentou a complacência dinâmica e melhorou a histerese na curva pressão-volume pulmonar, com resultados semelhantes aos obtidos com um surfactante de uso clínico rotineiro.
- Melhora significativa do tamanho alveolar médio com redução da variabilidade da expansão alveolar, refletindo a existência de mais áreas expansão alveolar normal, com redução das áreas de atelectasia e de hiperinsuflação, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com um surfactante de uso clínico rotineiro.

7. Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos surfactantes não podem ser liberados para a fase de estudos clínicos, sem antes ter sido comprovado e documentado os seus efeitos *in vivo* e *in vitro* em estudos experimentais padronizados; tanto em modelos de animais prematuros como em animais adultos com depleção de surfactante, incluindo análises de propriedades de superfície, estudos morfométricos e fisiológicos. Desta forma, a segurança de um novo medicamento deve ser confirmada através não só da análise da eficácia de seu uso em outras situações, como a síndrome de aspiração meconial, a síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo, mas também em relação à sua possível imunogenicidade, a estabilidade quanto ao estoque e conservação, e estudos *in vitro* sobre as propriedades de superfície em condições adversas que resultem na inativação do surfactante.

A avaliação clínica em estudos multicêntricos deverá ser realizada como etapa final da análise da segurança e eficácia de um novo surfactante pulmonar exógeno.

8. Anexos

FICHA DE COLETA DE DADOS

8. Referências

De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina.

Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suelly C. Cardoso, Valéria Vilhena.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

8. REFERÊNCIAS

Adams FH, Fujiwara T, Emmanouilides GCI. Lung phospholipids of human fetuses and infants with and without hyaline membrane disease. *J Pediatr*. 1970;77:833-41.

Adams FH, Towers B, Osher AB, Ikegami M, Fujiwara T, Nozaki M. Effect of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs. Clinical and autopsy findings. *Pediatr Res*. 1978;8:41-8.

Arcas R M. *Estudo das propriedades mecanicas do sistema respiratorio, com analise morfometrica e histopatologica num modelo experimental em coelhos recém-nascidos de termo e pre-termo, submetidos a ventilacao mecanica* [dissertacao]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.

Arcas RM, Chang YC, Proença RSM, Reyes AMA, Lyra JC, Gibelli MAC, Vaz FAC, Okay Y, Rebello CM. In vivo testing of a new low cost surfactant compared to Surfactant using the preterm rabbit model: lung mechanics and morphometrics analysis. *Pediatr Res*. 2000;47:386A.

Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child*. 1959;97:517-23.

Beers MF, Fisher AB. Surfactant protein C: a review of its unique properties and metabolism. *Am J Physiol*. 1992;263:151-60.

Berggren P, Curstedt T, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Physiological activity of pulmonary surfactant with low protein content: Effect of enrichment with synthetic phospholipids. *Exp Lung Res*. 1985;8:29-51.

Bermel MS, McBride JT, Notter RH. Lavage excised rat lungs as a model of surfactant deficiency. *Lung*. 1984;162:99-113.

Broadbent R, Fok TF, Dolovich M. Chest position and pulmonary deposition of surfactant in surfactant depleted rabbits. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Med*. 1995;72:F84-F9.

Brown DL, Pattishall E. Other uses of surfactant. *Clin Perinatol*. 1993;20:761-90.

Cardoso WV. Relações volume-pressão no sistema respiratório. *J Pneumol*. 1987;13(Supl 1):27-37.

Chen CM, Ikegami M, Ueda T, Polk D, Jobe A. Exogenous surfactant function in very preterm lambs with and without fetal corticosteroid treatment. *J. Appl. Physiol*. 1995;v78(3):955-960.

Chida S, Phelps DS, Cordle C, Soll R, Floros J, Taeusch HW. Surfactant associated proteins in tracheal aspirates of infants with respiratory distress syndrome after surfactant therapy. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:943-7.

Cianciarullo AM, Leme E, Beçak W, Raw I, Kubrusly FS. Ultraestrutural chemical reaction to detect saturated phospholipids of a natural surfactant from pig lungs. *Biotechnol Letters*. 2001;23:1293-6.

Clark DA, Nieman GF, Thompson JE. Surfactant displacement by meconium free fat acids: an alternative explanation for atelectasis in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr*. 1987; 110:765-70.

Clark H, Reid K. The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema. *Arch Dis Child*. 2003;88:981-4.

Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;95:170-7.

Cochrane CG, Revak SD, Merritt TA, Heldt GP, Hallman M, Cunningham MD. The efficacy and safety of KL4-surfactant in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996a;153:404-10.

Cochane CG, Revak SD, Merritt TA, Schraufstatter IU, Hoch RC, Henderson C, Andersson S, Takamori H, Oades ZG. Bronchoalveolar lavage with KL-4 surfactant in models of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res*. 1996b;44:705-15.

Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins *in vitro*. *Biochemistry*. 1990;29:8424-9.

Collins RA, Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Sly PD. *In vivo* measurements of changes in respiratory mechanics with age in mice deficient in surfactant protein D. *Pediatr Res*. 2003;53:463-7.

Corbet A. Clinical trials of synthetic surfactant in the respiratory distress syndrome of premature infants. *Clin Perinatol*. 1993;20:737-60.

Crouch EC. Structure, biologic properties and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408:278-89.

Cutz E, Enhorning G, Robertson B, Sherwood WG, Hill DE. Hyaline membrane disease. Effect of surfactant prophylaxis on lung morphology in premature primates. *Am J Pathol*. 1978;92:581-94.

Davis AJ, Jobe AH, Häfner D, Ikegami M. Lung function in premature lambs and rabbits with a recombinant SP-C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:553-9.

De Angelis RL, Findlay JWA. Metabolism of synthetic surfactants. *Clin Perinatol*. 1993;20:697-710.

Dolhnikoff M, Sakae RS, Saldiva PHN, Martins MA. Morphological determinants of peripheral lung mechanical changes induced by capsaicin. *Respir Physiol*. 1997;108:63-72.

Dunn M, Shennan A, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis versus treatment. *Pediatrics*. 1991;87:377-86.

Durand DJ, Clyman RI, Heymann MA, Clements JA, Mauray F, Kitterman J, Ballard P. Effects of protein free synthetic surfactant on survival and pulmonary function of preterm lambs. *J Pediatr*. 1985;107:775-80.

Eidelman DH, Lei M, Ghezzi RH. Morphometry of methacholine-induced bronchoconstriction in the rat. *J Appl Physiol*. 1993;75:1702-10.

Enhörning G, Robertson B. Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics*. 1972;50:58-66.

Faix RG, Viscardi RM, Dipietro MA, Nicks JJ. Adult respiratory distress syndrome in full-term newborns. *Pediatrics*. 1989;83:971-6.

Fanaroff AA, Martin RJ. *Neonatal perinatal medicine: diseases of the fetus and infant*. 5th ed. St Louis: Mosby;1992. p.793-882: The respiratory system.

Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ. Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 1996;97:48-52.

Finlay-Jones JM, Papadimitriou JM, Barter RA. Pulmonary hyaline membrane: light and electron microscopic study of the early stage. *J Pathol*. 1974;112:117.

Fujimukai T, Fujiwara T, Takahashi A, Enhorning G. Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins. *J Appl Physiol*. 1987;62:429-37.

Fujiwara T. Surfactant replacement in neonatal RDS. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant*. Amsterdam: Elsevier; 1984. p.480-503.

Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet*. 1980;1:55-9.

Fujiwara T, Konishi M, Chida S, Okuyama K, Ogawa T, Takeuchi Y, Nishida H, Kito H, Fujimura M, Nakamura H, Hashimoto T. (For the Surfactant T.A. Group). Surfactant replacement therapy with a single postventilatory dose of a reconstituted bovine surfactant in preterm neonates with respiratory distress syndrome: final analysis of a multicenter, double-blind randomized trial and comparison with similar trials. *Pediatrics*. 1990;86:753-64.

Fujiwara T, Robertson B. Pharmacology of exogenous surfactant. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p.561-92.

Garland J, Buck R, Weinberg M. Pulmonary hemorrhage risk in infants with a clinically diagnosed patent ductus arteriosus: a retrospective cohort study. *Pediatrics*. 1994;94:719-23.

- Gail DB, Steinkamp H, Massaro D. Interspecies variation in lung lavage and tissue saturated phosphatidylcholine. *Respir Physiol.* 1978;33:289-97.
- Gericke CR. Structure and orientation of lung surfactant SP-C and L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine in aqueous monolayers. *Biophys J.* 1997;73:492-9.
- Germann PG, Kemkowski J, Hauschke D, Steinhilber W, Hafner D. Intratracheally applied rSP-C surfactant exhibits no anaphylactic shock reactions in a guinea pig model of acute lung hypersensitivity. *Exp Toxicol Pathol.* 1999;51:495-505.
- Gladstone IM, Mercurio MR, Devenny SG, Jacobs HC. Antenatal steroids, postnatal surfactant, and pulmonary function in premature rabbits. *Appl Physiol.* 1989;67:1377-82.
- Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408:79-89.
- Goerke J. Surfactant and Lung Mechanics. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice.* Elsevier;1992. p.166-92.
- Goldsmith LS. Immediate improvement in lung volume after exogenous surfactant: alveolar recruitment versus increased distention. *J Pediatr.* 1991;119:424.
- Gortner L. Natural surfactant for neonatal respiratory distress syndrome in very premature infants: a 1992 update. *J Perinatol Med.* 1992;20:409.
- Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Hull W, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and

serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160:1843-50.

Grossmann G, Nilson R, Robertson B. Scanning electron microscopy of epithelial lesions induced by artificial ventilation of the immature neonatal lung; the prophylactic effect of surfactant replacement. *Eur J Pediatr*. 1986;145:361-7.

Gruenwald P. Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol*. 1947;53:996-1001.

Hack M, Fanaroff AA. How small is too small? Considerations in evaluating the outcome of the tiny infant. *Clin Perinatol*. 1989;15:773-88.

Halliday HL. Natural vs synthetic surfactants in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs* 1996a;51:226-237.

Halliday HL, Speer CP, Robertson B. Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant. *Eur J Pediatr*. 1996b;155:1047.

Hallman M, Merrit TA, Schneider H. Isolation of human surfactant from amniotic fluid and a pilot study of its efficacy in respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1983;71:473-82.

Hallman M, Merrit TA, Pohjavuori M, Gluck L. Effect of surfactant substitution on lung effluent phospholipids turnover, pool size and relationship to severity of respiratory failure. *Pediatr Res*. 1986;20:1228-35.

Hansen T, Corbet A. Disorders of the transition. In: Taeusch HW, Ballard RA. *Avery's diseases of the newborn*. 7th ed. 1998. p.602.

Harwood JL. Lung surfactant. *Prog Lip Res.* 1987;26:211.

Hawgood S. The hydrophilic surfactant protein SP-A: molecular biology, structure and function. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice.* Amsterdam: Elsevier; 1992. p.33-54.

Henry MD, Ikegami M, Ueda T, Jobe A. Surfactant protein B metabolism in newborn rabbits. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1300:97-102.

Herting E, Gefeller O, Land M, van Sonderen L, Harms K, Robertson B. Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. *Pediatrics.* 2000;106:957.

Herting E, Rauprich P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson Jan, Robertson B. Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium. *Pediatr Res.* 2001;50:44-9.

Hislop AA, Haworth SG. Airway size and structure in the normal fetal and infant lung and the effect of premature delivery and artificial respiration. *Am Rev Respir Dis.* 1990;140:1717-26.

Hobar JD, Soll RF, Schachinger J, Kewtz G. A European multicenter controlled trial of single dose surfactant therapy for idiopathic respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr.* 1990;149:416-23.

Holm BA, Waring AJ. Designer surfactants: The next generation in surfactant replacement. *Clin Perinatol.* 1993;20:813-29.

Hulse TC, Alexander GR, Robbilar PY, Annibale DJ, Keenan A. Hyaline membrane disease: the role of ethnicity and maternal risk factors. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:572.

Ikegami M. Surfactant inactivation. In: Boyton BR, Carlo WA, Jobe AH. *New therapies for neonatal respiratory failure*. Cambridge University Press: 1994. p.36-48.

Ikegami M. Surfactant metabolism. *Semin Perinatol*. 1993;17:233-40.

Ikegami M, Adams FH, Towers B, Osher AB. The quantity of natural surfactant necessary to prevent the respiratory distress syndrome in premature lambs. *Pediatr Res*. 1980;14:1082-5.

Ikegami M, Berry D, Elkady T, Pettenazzo A, Seidner A, Jobe A. Corticosteroids and surfactant change lung function and protein leaks in the lung of ventilated premature rabbits. *J Clin Invest*. 1987;79:1371-8.

Ikegami M, Hesterberg T, Nozaki M, Adams FM. Restoration of lung pressure-volume characteristics with surfactant: comparison of nebulization versus instillation and natural versus synthetic surfactant. *Pediatr Res*. 1977;11:178-82.

Ikegami M, Jobe AH, Berry D. A protein that inhibits surfactant in respiratory distress syndrome. *Biol. Neonate*. 1986;50:121-9.

Ikegami M, Jobe AH, Glatz T. Surface activity following natural surfactant treatment in premature lambs. *J Appl Physiol*. 1981;51:306-12.

Ikegami M, Jobe AH, Tabor BL, Rider ED, Lewis JF. Lung albumin recovery in surfactant treated preterm ventilated lambs. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:1005.

Ikegami M, Kallapur S, Michna J, Jobe AH. Lung injury and surfactant metabolism after hyperventilation of premature lambs. *Pediatr Res*. 2000;47:398-404.

Ikegami M, Silverman J, Adams FM. Restoration of lung pressure-volume characteristics with various phospholipids. *Pediatr Res*. 1979;13:777-80.

Ito Y, Ruud AWW, Yao LJ, MacCaig LA, Bartlett AJ, Lewis JF. Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155:493-99.

James LS. Perinatal events and respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1975;292: 1291-2.

Jobe AH, Ikegami M, Glatz T, Yoshida Y, Diakomanolis E, Padbury J. Duration and characteristics of treatment of premature lambs with natural surfactant. *J Clin Invest*. 1981;67:370-5.

Jobe AH. Metabolism of endogenous surfactant and exogenous surfactants for replacement therapy. *Semin Perinatol*. 1988;12:231-44.

Jobe AH, Ikegami M. Protein permeability abnormalities in the preterm. In: Effros RM, Chang HK. Lung biology in health and disease. *Fluid and solute transport in the airspaces of the lung*. New York: Marcel Dekker; 1994. p.335-55.

Jobe AH, Ikegami M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:825-46.

Jobe AH, Ikegami M, Jacobs H, Jones S, Conaway D. Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability. *J Appl Physiol*. 1983;55:169-76.

Jobe AH, Ikegami M, Jacobs H, Jones S. Surfactant and pulmonary blood flow distributions following treatment of premature lambs with natural surfactant. *J Clin Invest*. 1984;73:848-56.

Karnak I, Müftüoğlu S, Çakar N, Cahit Tanyel F. Organ growth and lung maturation in rabbit fetuses. *Resp Exp Med*. 1999;198:277-87.

Kattwinkel J. Surfactant: evolving issues. *Clin Perinatol*. 1998;25:17-32.

Keer MH, Paton JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1115.

Khoor A, Gray ME, Benn S, Stahman MT. Expression of surfactant protein A (SP-A) gene in the development human respiratory system as detected by in situ hybridization. *Pediatr Res*. 1991;19:322A.

Kikkawa Y, Motoyama EK, Gluck L. Study of the lungs fetal and newborn rabbits: morphologic, biochemical, and surface physical development. *Am J Pathol*. 1968;52:177-92.

King RJ, Clements JA. Surface active materials from dog lungs. II Composition and physiological correlations. *J Appl Physiol*. 1972;223:715-9.

Kjos SL, Walther FJ, Montoro M, Paul RH, Diaz F, Stabler M. Prevalence and etiology of respiratory distress syndrome in infants of diabetic mothers. Predictive values of fetal lung maturation tests. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163:898.

Kotas RV, Avery ME. Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. *J Appl Physiol*. 1971;30:358-61.

Kubrusly FS, Netto SL, Lourtov D, Raw I, Araujo P S. A natural surfactant from pig lungs. *Biotechnol Letters*. 2000;1251-3.

Kukori Y. Surfactant protein SP-D. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p.77-87.

Kukori Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 1991;266:3068-73.

Lachmann B, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir Physiol*. 1979;38:283-302.

Lachmann B, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Effect of supplementary surfactant on in vivo lung mechanics in the premature rabbit neonate. *Eur J Pediatr*. 1981;136:173-9.

Lachmann B. New aspects in pathophysiology and therapy of respiratory distress syndrome: criteria for characterization of exogenous surfactant in surfactant deficient animal models. In: Cosmi EV, Di Renzo GC. *Selected topics in perinatal medicine*. Rome: CIC Edizioni Internazionali; 1986. p.177-98a.

Lachmann B. Some criteria for in vivo testing of surfactant preparations. In: Vignali M, Cosmi EV, Luerti M. *Diagnosis and treatment of fetal lung immaturity*. Milano: Masson; 1986. p.182-92b.

Leone CR, Sadeck LDR, Vaz FAC, Almeida FBF, Guinsburg R, Marba S. Brazilian neonatal network: very low birth weight (VLBW) infant morbidity and mortality. *Pediatr Res*. 2001;49:405A.

Lewis J, Dhillon J, Frewer T. Exogenous surfactant therapy in pediatric patients with ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:A125.

Lyra JC. *Estudo dos efeitos de diferentes doses de surfactante exógeno no tratamento da síndrome de aspiração de mecônio em coelhos recém-*

nascidos. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Mataloun MMGB. *Respostas pulmonares à restrição nutricional e hiperoxia em coelhos pré-termo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Mead J. Mechanical properties of the lungs. *Physiol Rev*. 1961;41:281-330.

Mercier CE, Soll RF. Clinical trials of natural surfactant extract in respiratory distress syndrome. *Clin Perinatol*. 1993;20:711-35.

Metcalf IL, Enhörning G, Possmayer F. Surfactant associated protein: their role in the expression of surface activity. *J Appl Physiol*. 1980;49:34-41.

Metcalf IL, Pototschnik R, Burgoyne R, Enhörning G. Lung expansion and survival in rabbit neonates treated with surfactant extract. *J Appl Physiol*. 1982;53:838-43.

Michna J, Jobe AH, Ikegami M. Positive end expiratory pressure preserves surfactant function in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:634-9.

Miller HC, Futrakul P. Birth weight, gestational age, and sex as determining factors in the incidence of respiratory distress syndrome of prematurely born infants. *J Pediatr*. 1968; 72:628.

Miyoshi MH, Guinsburg R, Kopelman BI, Kantorowitz J, Rodrigues SA. Terapêutica de reposição com surfactante exógeno em recém-nascidos prematuros com síndrome do desconforto respiratório. *J Pediatr*. 1993;69:235-43.

Morley CJ. Surfactant treatment for premature babies: a review of clinical trials. *Arch Dis Child*. 1991;66:445-50.

Morrison JJ, Rennie JM, Milton PJ. Neonatal respiratory morbidity and mode of delivery at term: Influence of timing of elective cesarian section. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102:101.

Moya RM, Montes HF, Thomas VL, Mouzinho AM, Smith JF, Rosenfeld CR. Surfactant protein A and saturated phosphatidylcholine in respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150:1672.

Naeye RL, Freeman RK, Blanc WA. Nutrition, sex, and fetal lung maturation. *Pediatr Res*. 1974;8:200.

Neegard KV. Neue Auffassungen uber einen Grundbegriff der Atmenmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhangig von der Oberflachenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med*. 1929;66:373.

Nilsson R. The artificially ventilated preterm rabbit neonate as experimental model of hyaline membrane disease. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1982;26:89-103.

Nilsson R, Berggren P, Robertson B. Surfactant treatment in experimental hyaline membrane disease. *Eur J Respir Dis*. 1981;62:441-9.

Nilsson R, Grossman G, Robertson B. Lung surfactant and the pathogenesis of neonatal bronchiolar lesions induced by artificial ventilation. *Pediatr Res*. 1978;12:249.

Nilsson R, Grossman G, Robertson B. Bronchiolar ephitelial lesions induced in the premature rabbit neonate by short periods of artificial ventilation. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1980;88:359-67.

- Nilsson R, Robertson B. Bronchiolar epithelial lesions in spontaneously breathing premature newborn rabbit. *Biol Neonate*. 1985;48:357-61.
- Noack G, Curstedt T, Grossman G, Nilsson R, Robertson B. Passive expiratory flow-volume recordings in immature newborn rabbits. Effect of surfactant replacement on the time constant of the respiratory system. *Respiration*. 1990;57:1-5.
- Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994;93:1860-3.
- Nogee LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:601-23.
- Nohara K, Berggren P, Curstedt T, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Correlations between physical and physiological properties of various preparations of lung surfactant. *Eur J Respir Dis*. 1986;69:321-35.
- Ogawa A, Brown CL, Schlueter MA, Benson BJ, Clements JA, Hawgood S. Lung function, surfactant apoprotein content, and level of PEEP in prematurely delivered rabbits. *J Appl Physiol*. 1994;77:1840-1849.
- Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 175:1125-6.
- Possmayer F. The role surfactant associated proteins. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:749.
- Pre J, Perret G, Bladier D. Lecithin content estimative of human alveolar lining layer: comparison with mouse, rat and rabbit. *Comp Biochem Physiol*. 1983;76A:393-5, 1983.

Raju TNK, Langenberg P. Pulmonary hemorrhage and exogenous surfactant therapy: a metaanalysis. *J Pediatr*. 1993;123:603.

Reidel F. Long term effects of artificial ventilation in neonates. *Acta Paediatr Scand*. 1987; 76:24-9.

Rebello CM. Repercussões do uso pré-natal de corticosteróide na maturidade pulmonar do recém-nascido. *Pediatr Mod*. 2000;36:30-4.

Rebello CM, Ikegami M, Polk DH, Jobe AH. Postnatal lung responses and surfactant function after fetal or maternal corticosteroid treatment of preterm lambs. *J Appl Physiol*. 1996a.;80:1674-80.

Rebello CM, Jobe AH, Eisele JW, Ikegami M. Alveolar and tissue surfactant pool size in humans. *Am J Crit Care Med*. 1996b;154:625-8.

Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baats J, Wert S, Whitsett JA. Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1006:237-45.

Richardson DK, Torday JS. Racial differences in predictive values of the lecithin/sphingomyelin ratio. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:1273.

Rider ED, Ikegami M, Whitsett JA, Hull W, Absolom D, Jobe AH. Treatment responses to surfactant containing natural surfactant protein in preterm rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:669-76.

Rider ED, Jobe AH, Ikegami M, Sun B. Different ventilation strategies alter surfactant responses in preterm rabbits. *J Appl Physiol*. 1992;73:2089-96.

- Rider ED, Jobe AH, Ikegami M, Yamada T, Seidner S. Antenatal betamethasone dose effects in preterm rabbits studied at 27 days gestation. *J. Appl Physiol.* 1990;68:1134-41.
- Robert MF, Neff RK, Hubbell JP. Association between maternal diabetes and the respiratory distress syndrome in the newborn. *N Engl J Med.* 1976;294:357.
- Robertson B. New targets for surfactant therapy: experimental and clinical aspects. *Arch Dis Child.* 1996;75:F1-3.
- Robertson B. Pathology and pathophysiology of neonatal surfactant deficiency. In: Robertson B, Van Golde LMG, Batenbrug JJ. *Pulmonary surfactant*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p.383-418.
- Robertson B. Animal models of neonatal surfactant dysfunction. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier;1992. p.459-84.
- Robertson B, Berry D, Curstedt T, Grossmann G, Ikegami M, Jacobs H, Jobe A, Jones S. Leakage of protein in the immature rabbit lung; effect of surfactant replacement. *Respir Physiol.* 1985;61:265-76.
- Robertson B, Halliday HL. Principles of surfactant replacement. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408:346-61.
- Robertson B, Johansson J, Curstedt T. Synthetic surfactants to treat neonatal lung disease. *Mol Med Today.* 2000;6:119-24.
- Robertson B, Lachmann B. Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung Res.* 1988;14:279-310.

Robertson B. Pathology and pathophysiology of neonatal surfactant deficiency ("respiratory distress syndrome", "hyaline membrane disease"). In: Robertson LMG, van Golde, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant*. Amsterdam: Elsevier; 1984;383-418.

Royal JA, Levin DL. Adult respiratory distress syndrome in pediatrics patients. I. Clinical aspects, pathophysiology, pathology, and mechanics of lung injury. *J Pediatr*. 1988;112:169-80.

Royal JA, Levin DL. Adult respiratory distress syndrome in pediatrics patients. II. Management. *J Pediatr*. 1988;112:335-47.

Rüfer R. Der Einfluss oberflächenanaktiver Substanzen auf Entfaltung und retraction isolierter lungen. *Pfluegers Arch*. 1967;298:170-184.

Seeger W, Gunther A, Thede C. Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C vs SP-B based surfactants. *Am J Physiol*. 1992;261:L286-91.

Seidner SR, Ikegami M, Yamada T, Rider ED, Castro R, Jobe AH. Decreased surfactant dose-response after delayed administration to preterm rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:113-20.

Shardonofsky FR, Sato J, Bates JHT. Quasi-static pressure-volume hysteresis in the canine respiratory system in vitro. *J Appl Physiol*. 1990;68:2230-6.

Shelley SA, Paciga JE, Balis JU. Lung surfactant phospholipids in different animal species. *Lipids*. 1984;19:857-62.

Snyder JM, Mendelson CR. Induction and characterization of the major surfactant apoprotein during rabbit fetal lung development. *Biochim Biophys Acta*. 1987;920:226-36.

Soll RF, Blanco F. *Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome (review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews (computer file) CD000144, 2001.

Soll RF, McQueen MC. Respiratory distress syndrome. In: Synclair JC, Braken MD. *Effective care of the newborn infant*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p.323-58.

Soll RF, Morley CJ. *Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants (review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews (computer file) CD000511, 2001.

Spragg RG, Smith RM, Harris K, Lewis J, Hafner D, German P. Effect of recombinant SP-C surfactant in a porcine lavage model of acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1999;88:674-81.

Stahlman MT. Distúrbios respiratórios agudos no recém-nascido. In: Avery GB. *Neonatologia: fisiopatologia e tratamento do recém-nascido*. 2ª.ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1984. p.377-404.

Stevens PA, Schadow B, Bartholain S, Segerer H, Obladen M. Surfactant protein A in the course of respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr*. 1992;151:596.

Stevens PA, Wright JR, Clements JA. Surfactant secretion and clearance in the newborn. *J Appl Physiol*. 1989;67:1597-605.

Sun B, Kobayashi T, Curstedt T, Grossmann G, Robertson B. Application of a new ventilator-multi-plethysmograph system for testing efficacy of surfactant replacement in newborn rabbits. *Eur Respir J*. 1991;4:364-70.

Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myeline from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:75-81.

Tabor BL, Rider ED, Ikegami M, Jobe AH, Lewis JF. Dose effects of antenatal corticosteroids for induction of lung maturation in preterm rabbits. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;v.164:675-81.

Tanaka Y, Takei T, Kanazawa L. Lung surfactants. II. Effects of fatty acids, triacylglycerols and protein on the activity of lung surfactant. *Chem Pharm Bull*. 1983;31:4100-9.

Tannuri U, Diniz EMA, Santos MM, Maksoud FJG, Tannuri ACA, Rodrigues CJ, Rodrigues JRAJ. Intraamniotics infused surfactant is aspirated by fetus and improves lung biochemical parameters in animal model of Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH). *Pediatr Res*. 1998;43:299a.

Thompson PJ, Greenough A, Gamsu HR, Nicolaides KH. Ventilatory requirements for respiratory distress syndrome in small for gestational age infants. *Eur J Pediatr*. 1992;151:528.

Thurlbeck WM. The internal surface area of non-emphysematous lung. *Am Rev Respir Dis*. 1967;95:765-73.

Thurlbeck WM. Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax*. 1967;22:483-96.

Tubman TRJ, Rollins MD, Petterson C, Halliday HL. Increased incidence of respiratory distress syndrome in babies of hypertensive mothers. *Arch Dis Child*. 1991;66:52.

Tyson JE, Kennedy K, Broyles S, Rosenfeld CA. The small for gestational age infant: Accelerated or delayed pulmonary maturation? Increased or decreased survival? *Pediatrics*. 1995;95:534.

Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde, LMG. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;2:91-8.

Veldhuizen R, Kaushik N, Orgeig S, Possmayer F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408:90-108.

Verloove-Vanhorick SP, Verwey RA, Brand R, Bennebroek Gravenhorst J, Keirse MJNC. Neonatal mortality risk in relation to gestacional age and birth weight. *Lancet*. 1986;1:55-7.

Walther FJ, Taeusch HW Jr. Approach to surfactant therapy. In: Frantz ID. Tufts University School of Medicine and Floating Hospital for Children Reportson: neonatal respiratory disease. *Ross Laboratories*.1991;1:1-12.

Walther FJ, Taeusch HW. Pathophysiology of neonatal surfactant insufficiency: clinical aspects. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p.485-523.

Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric methods. In: Crystal RG, West JB. *The lung: Scientific Foundations*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.

Whitsett JA, Baatz JE. Hydrophobic surfactant protein SP-B e SP-C: molecular biology, structure and function. In: Robertson B, Golde LMG, Batenburg JJ. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p.55-77.

Whitsett JA, Ohning BL, Ross G, Meuth J, Weaver T, Holm BA, Shapiro DL, Notter RH. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for bilphysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr Res*. 1986;20:460-7.

Whitsett JA, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, West SE. Acute respiratory disorders. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1994. p.436.

Whitsett JA, Weaver TE. Mechanisms of disease: hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*. 2002;347:2141-8.

Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;5:41-50.

Wilson JL, Farber S. Pathogenesis of atelectasis of the newborn. *Am J Dis Child*. 1933;46:590-603.

Yukitake KCL, Brown MA, Schlueter JA, Clements JA, Hawgood S. Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vivo. *Pediatr Res*. 1995;37:21-5.