LUCIANA BRANCO HADDAD

Avaliação dos efeitos do recrutamento pulmonar, do uso de volume-corrente fixo e do volume de lavagem na instalação do modelo de síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo em coelhos

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

Área de Concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Celso Moura Rebello

SÃO PAULO
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Haddad, Luciana Branco

Avaliação dos efeitos do recrutamento pulmonar, do uso de volume-corrente fixo e do volume de lavagem na instalação do modelo de síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo em coelhos / Luciana Branco Haddad. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Celso Moura Rebello.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório adulto 2.Lavagem broncoalveolar 3.Volume de ventilação pulmonar 4.Modelos animais

USP/FM/SBD-064/07

DEDICATÓRIA

A o meu filho **Daniel**, luz na minha vida!

O melhor presente que a vida poderia me dar.

A os meus pais **Angela** e **Didinho**,

a base da minha vida.

Muito obrigado por tudo!

Se estou aqui hoje... é por causa de vocês!

A o meu companheiro e meu amor **Marcus**,

que esteve ao meu lado em cada passo desta minha "jornada"

Às minhas irmãs **Mari** e **Juli**,

amigas incondicionais

A o meu irmão **Daniel**...

Saudades sempre!!

Amo muito todos vocês !!!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A o meu orientador e neonatologista Dr Celso Moura Rebello, que foi além do “orientar”, foi um mestre. Que contribuiu de forma fundamental na execução deste trabalho, do início ao fim. Amigo e incentivador, com o qual tenho aprendido não somente Neonatologia e Pediatria, mas também ensinamentos de vida como a determinação e dedicação e não a temer nenhum desafio, por mais difícil que possa parecer.

A o amigo Marcelo Santos, pela grande ajuda no cuidado com os animais, lavados, tubos de ensaio e aliquotas durante muitos meses dentro do laboratório.

Às amigas fisioterapeutas, Aline e Roberta, por estarem sempre dispostas para dias inteiros de pesquisa experimental, muitos cafés!!!!

A os amigos e neonatologistas Dr Norberto Antonio Freddi e Dr Felipe de Souza Rossi, pela contribuição com ideias e na execução deste trabalho.

A companheira e amiga neonatologista Dra Renata Suman Mascaretti pelo apoio e estímulo em todas as horas.

A os amigos do laboratório Alex, Paula, Ana Margarita e João, com quem convivi nestes anos de pesquisa e me acolheram com muito carinho.

Às amigas fisioterapeutas da equipe do Hospital Israelita Albert Einstein, pelo incentivo e apoio de todas.

À pediatra Dra Lucília S de Faria, por ter me mostrado o caminho em direção ao estudo experimental.

A o Nivaldo, pela impressão final da minha dissertação.

A o Departamento de Pediatria e ao Instituto da Criança, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às minhas crianças e recém-nascidos do Hospital Israelita Albert Einstein que são meu estímulo constante para que eu continue pesquisando e estudando em busca da “SAÚDE”.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	10
3. Métodos	12
3.1 Local do estudo	13
3.2 Obtenção e preparo dos animais	13
3.3 Instalação do modelo experimental de SDRA e formação dos grupos de estudo	15
3.4 Controles durante a instalação do modelo	17
3.5 Sacrifício dos animais	18
3.6 Determinações bioquímicas	18
3.7 Análise estatística	18
4. Resultados	20
5. Discussão	38
6. Conclusões	46
7. Considerações finais	48
8. Referências bibliográficas	50

LISTA DE ABREVIATURAS

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório do tipo agudo

IO – índice de oxigenação

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ – relação entre pressão parcial arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio

LPIV – lesão pulmonar induzida pelo ventilador

V_t – volume-corrente

Curva PV – curva pressão-volume

PEEP – pressão expiratória final positiva

MAP – pressão média de vias aéreas

FR – frequência respiratória

T_{insp} – tempo inspiratório

θ - fluxo

P_{insp} – pressão inspiratória

FiO_2 – fração inspirada de oxigênio

Pflex – ponto de inflexão inferior da curva PV

PaO_2 – pressão parcial de oxigênio

PaCO_2 – pressão parcial de gás carbônico

HCO_3^- - bicarbonato

BE – excesso de base

SatO_2 – saturação de oxigênio

Na^+ – sódio

K^+ - potássio

iCa^{++} – cálcio iônico

Ht – hematócrito

Hb – hemoglobina

RESUMO

Resumo

HADDAD, L. B. **Avaliação dos efeitos do recrutamento pulmonar, do uso de volume-corrente fixo e do volume de lavagem na instalação do modelo de síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo em coelhos.** São Paulo, 2007. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introdução - Vários modelos experimentais para o estudo da síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo (SDRA) foram desenvolvidos, sendo o modelo de lavagem pulmonar o mais utilizado. No entanto, a técnica originalmente descrita foi modificada por outros autores, tornando difícil a reprodutibilidade deste modelo experimental.

Objetivos - Avaliar os efeitos do recrutamento pulmonar, do uso de volume-corrente fixo e do uso de diferentes volumes de lavagem na instalação do modelo experimental de SDRA, em relação ao número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental, a mortalidade e a estabilidade hemodinâmica durante o procedimento.

Metodologia – Coelhos adultos da raça New-Zealand-White, foram divididos em 5 grupos de estudo, de acordo com a técnica utilizada para a lavagem pulmonar: 1- Volume-corrente (Vt) fixo de 10 ml/kg, volume de lavagem de 30 ml/kg, sem recrutamento pulmonar; 2- Pressão inspiratória (Pinsp) fixa, com um volume de lavagem de 30 ml/kg, sem recrutamento pulmonar; 3- Vt fixo, com um volume de lavagem de 25 ml/kg sem recrutamento pulmonar; 4- Pinsp fixa, com volume de lavagem de 25 ml/kg sem recrutamento pulmonar; 5- Vt fixo, com volume de lavagem de 30 ml/kg, com recrutamento pulmonar antes da primeira lavagem. Os animais foram submetidos a repetidas lavagens pulmonares com soro fisiológico aquecido em intervalos de 5 minutos, até se atingir o critério de definição de SDRA, estabelecido como uma relação $PaO_2/FiO_2 \leq 100$.

Resultados – Não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação ao número de lavagens necessárias para a instalação do modelo experimental. O uso de recrutamento alveolar prévio e a utilização de pressão inspiratória fixa com volume de lavagem de 25 ml/kg foi associado a uma tendência à maior mortalidade. Embora não se tenha observado diferenças na estabilidade hemodinâmica entre os grupos de estudo, os animais ventilados com P_{insp} fixa apresentaram uma pior ventilação alveolar com valores mais baixos de pH em relação aos animais ventilados com V_t fixo.

Conclusões - A utilização de manobra de recrutamento alveolar, a uso de um volume-corrente fixo ou pressão inspiratória fixa entre as lavagens, e a utilização de diferentes volumes de lavagem (25 e 30 ml/kg) não modificaram o número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental de SDRA, assim como não modificaram a estabilidade hemodinâmica dos animais durante a realização do procedimento.

Foi observada uma tendência à maior mortalidade com a realização da manobra de recrutamento alveolar e com o uso de pressão inspiratória fixa associado ao volume de lavagem de 25 ml/kg.

Descritores – Síndrome do desconforto respiratório adulto, Lavagem broncoalveolar, Volume de ventilação pulmonar, modelos animais.

SUMMARY

Summary

HADDAD, L. B. **Effects of pulmonary recruitment, use of fixed tidal-volume and different lavage volumes in the installation of the acute respiratory distress syndrome model in rabbits.** São Paulo, 2007. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Background - Many experimental models were developed for the study of the acute respiratory distress syndrome (ARDS), and the lung lavage model is the more frequently used. The original technique was modified by many authors, resulting in difficulties for this experimental model reproducibility.

Objectives - To evaluate the effects of the pulmonary recruitment, the use of fixed tidal-volume and different lavage volumes at the experimental ARDS model installation, regarding to the number of lung lavages necessary to obtain the experimental model, the mortality and the hemodynamic stability during the procedure.

Methods - New-Zealand-White adult rabbits were divided into 5 study groups, according to the technique used: 1- Fixed tidal-volume (V_t) of 10 ml/kg, lavage volume of 30 ml/kg, no pulmonary recruitment; 2- Fixed inspiratory pressure (IP), lavage volume of 30 ml/kg, no pulmonary recruitment; 3- Fixed V_t , lavage volume of 25 ml/kg, no pulmonary recruitment; 4- Fixed IP, lavage volume of 25 ml/kg, no pulmonary recruitment; 5- Fixed V_t , lavage volume of 30 ml/kg, using pulmonary recruitment. The animals were submitted to repeated lung lavages with warm saline at 5 min interval until the ARDS definition ($PaO_2/FiO_2 \leq 100$) be reached.

Results - There was no differences among the study groups regarding the number of lung lavages necessary to obtain the experimental model. The use of alveolar recruitment before the first lavage and the use of fixed ventilatory pressure with 25 ml/kg lavage volume were associated with trend to a higher

mortality rate. Although there were no differences regarding the hemodynamic stability among the study groups, animals ventilated with fixed inspiratory pressure had worse alveolar ventilation with higher levels of PaCO₂ and lower pH.

Conclusions – The use of alveolar recruitment maneuvers, the use of a fixed tidal-volume or inspiratory pressure between the lung lavages and the utilization of different lavage volumes did not change the number of lung lavages necessary to obtain the experimental model of ARDS or the hemodynamic stability of the animals during the procedure.

It was observed a trend to an increased mortality rate with the recruitment maneuver and with the use of a fixed inspiratory pressure associated to the lavage volume of 25 ml/kg.

Key words – Adult respiratory distress syndrome, bronchoalveolar lavage, animal models.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo (SDRA) é uma doença respiratória de causa multifatorial, caracterizada pela primeira vez por Ashbaugh em 1967 (1), acometendo indivíduos de todas as faixas etárias, desde o recém-nascido até o adulto (2,3). Ela é descrita como um quadro de lesão pulmonar aguda, associada a um edema pulmonar não cardiogênico, caracterizado pelo aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, com extravasamento de células e proteínas tanto para o interstício pulmonar como para a luz alveolar, acompanhado de hipoxemia severa, com conseqüente diminuição da complacência pulmonar (4,5,6,7,8). Em recém-nascidos esta síndrome caracteriza-se por insuficiência respiratória grave secundária a processos infecciosos ou inflamatórios do pulmão prematuro, com padrão retículo granular e presença de atelectasias ao Raio X de tórax, resultando em diminuição da complacência pulmonar e modificação na função do surfactante pulmonar endógeno, levando a atelectasias no final da expiração (9).

A SDRA tem sido objeto de estudos por se tratar de uma doença de significativa prevalência nas Unidades de Terapia Intensiva adulto e pediátrica, apresentando uma elevada taxa de mortalidade e um alto custo

hospitalar (10,11). A mortalidade na SDRA varia de acordo com o fator etiológico associado, situando-se entre 30 a 60% na maioria dos estudos (6,8,12,13) . Entre os principais fatores de risco são descritos a sepse (44%), o choque (44%), o trauma (11%), a aspiração gástrica (10%) e outros fatores (34%) (14).

Em pediatria a taxa de mortalidade situa-se ao redor de 50%, sendo que a SDRA é responsável por cerca de 0,8 a 4,4% de todas as admissões em unidades de terapia intensiva pediátricas (15).

No nosso meio, um estudo retrospectivo realizado no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, abrangendo o período de 2000 a 2002, revelou que das 1407 crianças internadas na unidade de terapia intensiva pediátrica, 2,4% tinham diagnóstico de SDRA, com uma mortalidade de 51,8% (16).

Em 1994 foi realizado um primeiro consenso de especialistas com o objetivo de se padronizar o diagnóstico da SDRA, utilizando critérios gasométricos (índice de oxigenação), radiológicos, e alterações da complacência pulmonar para a sua definição (6). Em 2000 foi publicado um novo consenso em que foi sugerido, como critérios diagnósticos da SDRA, a ocorrência de início agudo da doença, o valor da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 200$ mmHg, o achado radiológico com infiltrado difuso bilateral e uma pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg (ou sem evidências clínicas de hipertensão atrial esquerda) (13).

Embora a ventilação mecânica seja necessária para manter a vida dos pacientes com SDRA, o específico método ou padrão ideal de ventilação

ainda permanece a ser definido (17). Isto se deve principalmente ao fato do comprometimento pulmonar não ocorrer de forma homogênea, havendo áreas com complacência muito reduzida em oposição a outras com complacência próxima ao normal, resultando em uma elevada incidência de lesão pulmonar induzida pelo ventilador (LPIV), que pode agravar o quadro inicial de SDRA (7,8,19,20). De fato, vários estudos demonstram que a utilização da ventilação mecânica em modelos animais de SDRA, resulta em hiperdistensão alveolar, assim como em áreas de atelectasia (21,22,23,24,25,26).

Devido ao seu grande impacto na sobrevida dos pacientes com SDRA, novas estratégias ventilatórias estão sendo desenvolvidas com o objetivo de diminuir a incidência de LPIV, reduzindo também a mortalidade e morbidade desta síndrome (21,27,28).

Neste sentido, os modelos de experimentação animal têm desempenhado um papel de fundamental importância. Através desta ferramenta de estudo, vários autores têm pesquisado o desenvolvimento de estratégias de ventilação que minimizem a LPIV (8,24,27,29,30). Desta forma, utilizando o modelo de SDRA no coelho adulto induzido por lavagem pulmonar com soro fisiológico aquecido, Rotta (2001) demonstrou que as estratégias protetoras melhoram a oxigenação e atenuam a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (20).

Através do uso de modelos experimentais também foi possível estudar outras modalidades ventilatórias para o tratamento da SDRA estabelecida, como a ventilação de alta frequência, particularmente a sua comparação

com o uso de técnicas de ventilação mecânica convencional (15). Por exemplo, em estudo experimental publicado em 2004, coelhos adultos foram induzidos à lesão pulmonar por infusão intravenosa de lipossacarídeo de *Escherichia coli* associada a repetidas lavagens com solução salina, sendo observado que os animais submetidos à ventilação mecânica convencional apresentaram escores de lesão pulmonar mais elevados e maior dano oxidativo, quando comparados à ventilação oscilatória de alta frequência (26).

A utilização de modelos experimentais com animais para o estudo da SDRA mostrou que a ventilação oscilatória de alta frequência associada ao uso de pequenos volumes-correntes (V_t) permite realizar adequadamente as trocas gasosas, evitando a lesão pulmonar causada por pressões elevadas associadas à ventilação mecânica convencional, minimizando os efeitos negativos desta modalidade ventilatória não apenas sobre o parênquima pulmonar já comprometido, mas também sobre o aparelho cardiocirculatório (15,18,22,25,26,31). Através da experimentação animal também foi demonstrado que, na SDRA, a ventilação de alta frequência está associada a uma maior estabilidade hemodinâmica, quando comparada com a ventilação mecânica convencional (32).

O uso de modelos experimentais de SDRA permitiu também avaliar a contribuição da ventilação com relação inversa (IRV), uma abordagem ventilatória na qual se prolonga a inspiração e encurta-se o tempo expiratório, resultando em relação inspiração/expiração (I/E) superior a 1. Utilizando-se coelhos com lesão pulmonar induzida por ácido oléico

comparou-se à ventilação mecânica convencional com a ventilação com relação inversa, sendo foi observado que essa modalidade ventilatória pode ocasionar o fenômeno de auto PEEP (pressão expiratória final positiva), com queda do débito cardíaco (33).

Os modelos experimentais com animais foram e continuam sendo de fundamental importância para se estabelecer o papel da terapêutica com surfactante exógeno para o tratamento da SDRA estabelecida. Através deles foi possível determinar que, na SDRA, há uma disfunção tanto quantitativa como qualitativa do surfactante pulmonar, o que determina uma maior instabilidade das unidades alveolares, favorecendo ao seu colapso (24,34,35,36,37,38,39,40,41). A disfunção qualitativa, caracterizada por uma composição anormal do surfactante causada pela lesão direta dos pneumócitos tipo II pela doença de base, associa-se à chamada “inativação” do surfactante, situação onde ocorre a inibição da função do mesmo pela presença de grande quantidade de proteínas na interface ar-líquido da luz alveolar. Como resultado, a tensão superficial no final da expiração torna-se mais elevada (em torno de 40 Nm/m) resultando no colapso das unidades alveolares no final da expiração (42,43,44,45).

O modelo experimental ainda tem um importante papel a desempenhar no estudo da utilização do surfactante exógeno (24,46,47) para o tratamento da SDRA, uma vez que existem controvérsias em vários aspectos deste tratamento, como o tipo do surfactante utilizado; o modo ideal de administração; a dose e a fase da doença em que o surfactante deve ser administrado, entre outras (48,49).

O uso dos modelos experimentais também tem grande importância para o estudo da LPIV na SDRA, assim como para o desenvolvimento de técnicas que minimizem a sua ocorrência em seus vários aspectos, como o barotrauma (21,46); o volutrauma (relacionado com o uso de Vt excessivo) (20,32,26); o atelectrauma, relacionado com a abertura e o colapamento de unidades alveolares ao final da expiração (32); e o biotrauma, que ocorre quando a ventilação mecânica causa dano celular com liberação de mediadores inflamatórios locais (citoquinas e radicais livres) (7,50,52,53).

Em vista de sua fundamental importância para o estudo da SDRA, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos, com o objetivo de estudar a SDRA, sob seus vários aspectos, incluindo fisiopatologia (42), tratamento (54), técnicas protetoras de ventilação (20,24), estudo do metabolismo e função do surfactante pulmonar endógeno e exógeno (34,35,36,37,43,55), utilização da curva pressão volume (curva PV) para a escolha da PEEP ou da pressão média de vias aéreas (MAP) (15); determinação da curva PV ou otimização da ventilação mecânica por tomografia de impedância elétrica (56,57); comparação da eficiência da ventilação mecânica convencional e ventilação oscilatória de alta frequência (18,22,25), alteração na permeabilidade da membrana alvéolo-capilar (21), entre outros. Entre os modelos experimentais mais frequentemente utilizados para o estudo da SDRA destacam-se: a) a indução da doença através da administração de N-nitroso N-metiluretano (NNMU) subcutâneo (22,35,36,37,42); b) a administração de bleomicina intratraqueal (58) ; c) o modelo induzido através da administração intratraqueal do ácido-oléico (23,33,46); d) o modelo

induzido por aspiração de leite (55); e) o modelo induzido pela administração intratraqueal de ácido clorídrico (5); f) o modelo induzido por lavagem pulmonar com soro fisiológico (2,20,23,25,59); g) o modelo induzido por lavagem pulmonar associado à administração intratraqueal de *Escherichia coli* (23,26). Os animais utilizados nos diversos modelos experimentais acima citados incluem o cordeiro, o porco da índia (59), o cão (23) e o coelho adulto, sendo este último o mais utilizado (18,20,21,24,27,34,42,46,55).

A técnica mais freqüentemente utilizada na literatura especializada é a da lavagem pulmonar com soro fisiológico (SF), descrita por Lachmann (1980). A técnica original utilizava soro fisiológico aquecido a 37°C, com a realização de sucessivas lavagens do pulmão, em alíquotas de 35 ml/kg, correspondendo a 80-90% da capacidade vital (definida como o volume de ar que entra nos pulmões a uma pressão de 35 cmH₂O), infundido a uma pressão máxima de 40 cmH₂O. Na descrição inicial, as lavagens eram realizadas em aproximadamente 20 segundos sendo repetidas por 10 vezes com intervalos de 5 minutos (59).

Após a sua introdução, esta técnica foi modificada por vários autores; Hickling (1996) utilizou alíquotas de 25 ml/kg de SF e realizou 4 lavagens com intervalos de 5 minutos cada (27); Barsotti (1996) utilizou 10 ml/kg de SF e realizou 6 lavagens com um intervalo de 2 a 5 minutos cada (34); Rotta (2001) utilizou 30 ml/kg de SF e realizou 3 lavagens com 2 minutos de intervalo (20); já Piva (2000) utilizou alíquotas de 25 ml/kg de SF e realizou de 4 a 6 lavagens (18).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Avaliar os efeitos do recrutamento pulmonar, do uso de V_t fixo e do volume de lavagem na instalação do modelo experimental de SDRA, utilizando o coelho adulto.

Objetivo secundário

- Avaliar a influência do recrutamento alveolar, do uso de V_t fixo e do volume de lavagem, no número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo, na mortalidade dos animais e na estabilidade hemodinâmica, em um modelo experimental de SDRA, utilizando o coelho adulto.

Sendo assim, não há na literatura internacional, uma uniformização da técnica de lavagem pulmonar para a instalação do modelo experimental de SDRA, o que pode interferir nos resultados encontrados e conseqüentemente na sua reprodutibilidade.

Em vista da diversidade de técnicas encontradas na literatura especializada que modificaram substancialmente o modelo inicial proposto por Lachmann (1980), optamos por realizar um estudo para verificar os efeitos do uso do recrutamento pulmonar, do uso de volume-corrente fixo e de diferentes volumes de lavagem (25 e 30 ml/kg), a fim de aperfeiçoar a instalação do modelo de SDRA por lavagem pulmonar, resultando em maior confiabilidade e melhor reprodutibilidade. Foi feita a hipótese de que o uso do recrutamento pulmonar prévio à lavagem, o uso de maior volume de lavagem e o uso de volume-corrente fixo na ventilação dos animais durante o procedimento resultaria em maior eficiência e segurança na instalação deste modelo experimental.

3. MÉTODOS

3.MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto da Criança – Hospital das Clínicas da FMUSP, após a aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – Protocolo de Pesquisa nº 748/03).

3.2 Obtenção e preparo dos animais

Foram utilizados coelhos adultos da raça *New-Zealand-White*, fornecidos pela RG Produtos Agropecuários S.A. (Suzano – São Paulo). Após pesagem, os animais foram sedados com solução de quetamina-acepromazina (10 mg/kg e 0.1 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular) e anestesiados com solução de xylocaína a 2%, na região anterior do pescoço. Cada animal foi imobilizado em uma calha cirúrgica

para pequenos animais, seguindo-se da dissecação da carótida, com inserção de cateter de PVC de 2,5 Fr para a monitorização contínua da pressão arterial sistêmica (PA) e coleta de amostras de sangue para gasometria, assim como o isolamento e passagem de cateter de PVC de 2,5 Fr em veia jugular, para infusão de solução glicofisiológica acrescida de quetamina, a uma velocidade de 4 ml/kg.hora (96 ml/kg.dia), sendo associado o uso de noradrenalina (0,1 a 2,0 μ g/kg.min) se a pressão arterial média sistêmica caísse a níveis inferiores a 50 mmHg. Após a fixação dos cateteres vasculares procedeu-se à traqueostomia com passagem de cânula traqueal do maior calibre possível (diâmetro interno 3,5 ou 4,0), sendo iniciada a ventilação mecânica (Inter 3[®], Intermed, São Paulo, Brasil) com parâmetros iniciais de: frequência respiratória (FR), 50 ciclos por minuto; tempo inspiratório (T_{insp}), 0,5 segundo; fluxo, 8 litros por minuto; pressão inspiratória (P_{insp}) suficiente para manter um V_t alvo de 10 ml/kg; PEEP, 5 cm H₂O; FiO₂, 1,0.

A leitura da pressão ventilatória foi realizada através de um sensor de pressão (Validyne[®], modelo DP45 – 24) conectado a um software de aquisição e leitura de dados (LabVIEW 5.1[®], National Instruments) desenvolvido especificamente para este fim (R. A. Eletro Sistemas LTDA, Campinas, Brasil). O volume-corrente foi obtido através da integração dos dados de fluxo e tempo obtidos através de um pneumotacógrafo (Hans Rudolph[®] Inc., Kansas City, Estados Unidos) também conectado a um sensor de pressão (Validyne[®], modelo DP45 – 14), utilizando-se o mesmo software de aquisição de dados.

Imediatamente após o início da ventilação os animais receberam pancurônio por via intravenosa na dose de 0,1 mg/kg, sendo esta dose repetida sempre que fosse observado esforço respiratório espontâneo.

3.3 Instalação do modelo experimental de SDRA e formação dos grupos de estudo

Imediatamente após o preparo inicial do animal, foram anotadas a temperatura, a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial sistêmica (PA), obtida através de uma coluna de mercúrio em forma de “U” com um reservatório proximal (cachimbo) conectado ao cateter arterial, e colhida uma amostra de sangue para gasometria, com os parâmetros do ventilador regulados como descritos anteriormente. Em seguida foi instalado o modelo experimental de SDRA, baseado em 5 variações da técnica descrita por Lachmann (1980), através do uso de volume-corrente fixo ou pressão inspiratória fixa durante as sucessivas lavagens; de dois diferentes volumes de lavagem; e do uso ou não de recrutamento pulmonar antes da primeira lavagem (59). Desta forma os animais foram divididos em cinco grupos de estudo, de acordo com a técnica de lavagem pulmonar utilizada.

Assim, os animais do GRUPO 1 foram ventilados durante a instalação do modelo experimental utilizando-se um V_t fixo de 10 ml/kg, com volume de lavagem de 30 ml/kg, sem recrutamento pulmonar prévio. Os animais do GRUPO 2 foram ventilados com uma P_{insp} fixa (definida como sendo o valor

de pressão inspiratória necessária para se atingir um V_t de 10 ml/kg antes da primeira lavagem), com um volume de lavagem de 30 ml/kg, sem recrutamento pulmonar prévio. Os animais do GRUPO 3 foram ventilados com um V_t fixo de 10 ml/kg, porém com um volume de lavagem de 25 ml/kg sem recrutamento pulmonar prévio. Os animais do GRUPO 4 foram ventilados utilizando-se uma P_{insp} fixa (definida como sendo o valor de pressão inspiratória necessária para se atingir um V_t de 10 ml/kg antes da primeira lavagem), com volume de lavagem de 25 ml/kg sem recrutamento pulmonar prévio. Os animais do GRUPO 5 foram ventilados utilizando-se um V_t fixo de 10 ml/kg, com volume de lavagem de 30 ml/kg, porém sendo realizada técnica de recrutamento pulmonar, antes da primeira lavagem.

Para a realização do recrutamento pulmonar foi realizado um estudo piloto, com o objetivo de se determinar o ponto de inflexão inferior da Curva PV (P_{flex}) no pulmão sadio (isto é, antes de ser submetido à primeira lavagem), o qual foi igual a 8 cmH₂O.

O recrutamento pulmonar foi realizado submetendo-se os animais do GRUPO 5 durante 5 minutos a uma PEEP igual a $P_{flex} + 2$ cmH₂O (10 cmH₂O), $V_t=6$ ml/kg e $FiO_2=100\%$. Em seguida os parâmetros do ventilador dos animais do GRUPO 5 foram reajustados para: P_{insp} , a necessária para se obter um V_t de 10 ml/kg e PEEP de 5 cmH₂O, iniciando-se a lavagem pulmonar utilizando-se o V_t de 10 ml/kg, com volume de lavagem de 30 ml/kg.

As lavagens foram realizadas utilizando-se soro fisiológico aquecido a 37°C, em alíquotas de 25 a 30 ml/kg, de acordo com o grupo de estudo, infundido

a uma pressão máxima de 40 cmH₂O, durante um tempo total de 60 segundos (20 seg para a infusão e 40 seg para a retirada). O procedimento foi repetido por quantas lavagens fossem necessárias, sempre com intervalos de 5 minutos, até se atingir o critério de definição de SDRA ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 = 100$).

Após atingido o critério de definição (5 minutos após a última lavagem), o animal era mantido em repouso por mais 5 minutos, sendo colhida uma nova gasometria era após este intervalo, a fim de confirmar a falência respiratória. A instalação do modelo experimental só era confirmada após esta gasometria de confirmação (colhida 10 minutos após a última lavagem) mostrar uma relação $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 = 100$. Caso contrário, o procedimento de lavagem pulmonar era reiniciado.

3.5 Controles durante a instalação do modelo

A frequência cardíaca e a pressão arterial sistêmica foram monitoradas continuamente, sendo anotadas antes do início de cada lavagem. Amostras de sangue para a realização de gasometrias arteriais foram colhidas, imediatamente antes da primeira e após cada lavagem, sendo analisadas através do I-Stat (I-Stat Corporation®, Windsor, Estados Unidos). Foi utilizado o cartucho EG7+, que fornece os valores de pH, PaO_2 , PaCO_2 , bicarbonato (HCO_3^-), excesso de base (BE), saturação de oxigênio (SatO_2), sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio iônico (iCa^{++}), hematócrito (Ht) e

hemoglobina (Hb). O volume de líquido retirado após cada lavagem foi mensurado, sendo colhidas amostras em triplicata para a determinação de proteínas do lavado broncoalveolar.

3.5 *Sacrifício dos animais*

Após instalação do modelo experimental, os animais foram sedados profundamente com pentobarbital sódico (25 mg/kg, por via endovenosa) e sacrificados através da secção da aorta abdominal.

3.6 *Determinações bioquímicas*

A determinação da proteína total nos lavados alveolares foi realizada pelo método de Bradford (VERSA MAX – TUNABLE, Molecular Devices, Estados Unidos) (60,61).

3.7 *Análise estatística*

As comparações entre os grupos de estudo foram realizadas por análise de variância (ANOVA ONE-WAY), sendo utilizado Student-Newman-Keuls como pós-teste discriminatório, quando necessário. O nível de significância

adotado foi de 0,05. As variáveis qualitativas foram analisados pelo teste Exato de Fischer ou teste do Qui-Quadrado, conforme o mais adequado.

O número de animais necessários para a realização do estudo, considerando-se a média de lavagens necessárias para a instalação do modelo de SDRA obtido na literatura (18), com $\alpha = 0.05$ e um poder de teste de 0,80 foi de 9 animais por grupo; com o objetivo de se detectar uma diferença entre os grupos de estudo da ordem de uma lavagem.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram estudados 50 animais distribuídos nos 5 grupos de estudo. Os dados referentes ao número de animais em cada grupo de estudo, o peso, a relação PaO_2/FiO_2 obtida após a última lavagem, o número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental proposto e a mortalidade cada grupo de estudo são apresentados no **Quadro 1**. Não foram observadas diferenças entre os grupos, porém houve uma tendência a menor número de lavagens nos Grupos 2 e 5 e a uma maior porcentagem de óbitos nos Grupos 4 e 5.

Quadro 1 - Número de animais, peso, relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ após a última lavagem, número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental e a mortalidade em cada grupo de estudo. Valores em média $\pm$ desvio padrão, exceto para óbitos (onde os valores são apresentados em porcentagem).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
n	12	9	9	9	10
Peso (g)	2779 $\pm$ 217	2616 $\pm$ 283	2546 $\pm$ 334	2661 $\pm$ 292	2580 $\pm$ 225
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	63 $\pm$ 21	75 $\pm$ 16	73 $\pm$ 19	75 $\pm$ 20	70 $\pm$ 13
Nº de lavagens	4,6 $\pm$ 1,6	3,6 $\pm$ 2,1	4,3 $\pm$ 0,9	4,0 $\pm$ 1,8	3,3 $\pm$ 1,3
Óbitos (%)	8,3	0,0	0,0	22,2	10,0

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ = Relação entre pressão parcial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio, Nº de lavagens = Número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental proposto.

A comparação entre os valores de pH, PaO_2 , PaCO_2 , bicarbonato, excesso de base, saturação da hemoglobina, concentrações séricas de sódio, potássio, cálcio iônico, hemoglobina e hematócrito, além dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca obtidos após a última lavagem (quando foi atingido o valor de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$) e a confirmação após 10 minutos (para se certificar que os valores da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ continuavam inferiores a 100, confirmando a instalação do modelo) são apresentados no **Quadro 2**. Observou-se um ligeiro aumento dos valores da PaO_2 na

gasometria de confirmação do Grupo 2 (10 min) e queda dos valores de pressão arterial sistêmica entre os animais do Grupo 5. No entanto, em relação a este último, é importante salientar que os valores de pressão arterial após a última lavagem (instalação) estavam elevados, tendo retornado ao normal após o intervalo de 10 minutos (10 min).

A relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ inicial e após cada lavagem está representada no **Gráfico 1**. Não foram encontradas diferenças entre os grupos, sendo observada uma progressiva queda da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ com as sucessivas lavagens, como esperado.

Os valores de PaCO_2 são mostrados no **Gráfico 2**. No momento pré lavagem encontramos valores mais elevados de PaCO_2 no Grupo 5 em decorrência da técnica de recrutamento utilizada. Com as sucessivas lavagens observou-se valores mais elevados de PaCO_2 entre os animais do Grupo 4, sendo encontrada diferença após a 2ª lavagem em relação ao Grupo 1 e após a 3ª lavagem em relação aos Grupos 1 e 3, sugerindo que a utilização de uma Pinsp fixa durante as lavagens leva a uma hipoventilação alveolar durante a instalação do modelo experimental. Apesar de não existir diferença entre os demais grupos e os grupos 2 e 4, nota-se uma tendência de valores mais elevados de PaCO_2 nestes últimos.

Quadro 2 - Comparação dos dados da última lavagem (instalação) com a confirmação após 10 minutos (10 min).

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
	Instalação	10 min	Instalação	10 min	Instalação	10 min	Instalação	10 min	Instalação	10 min
pH	7,14±0,07	7,10±0,11	7,07±0,09	7,01±0,09	7,12±0,06	7,11±0,08	6,98±0,09	6,93±0,08	7,13±0,07	7,16±0,05
PaO₂	54±16	63±21	53±18	75±16*	83±11	73±19	58±15	105±79	86±34	70±13
PaCO₂	70±23	71±23	91±26	104±27	72±20	69±22	110±21	105±33	72±14	67±10
HCO₃⁻	21,5±3,6	20,6±2,8	25,4±4,1	25,3±3,5	21,9±3,8	22±3,5	25,1±3,8	22,3±6,4	23,1±2,3	23,4±2,3
BE	-7,3±3,6	-8,5±2,7	-4,0±4,0	-5,4±3,3	-6,7±3,5	-6,2±3,2	-6,0±4,4	-9,3±6,9	-5,4±2,7	-3,8±4,4
Sat O₂	67±18	71±16	55±17	75±15	87±4	82±13	56±13	74±23	87±8	81±9
Na⁺	142±7	141±6	141±5	141±5	138±5	139±4	140±3	140±2	140±2	139±2
K⁺	3,5±1,1	3,4±0,6	3,5±0,5	2,7±0,4	3,5±0,4	3,2±0,7	3,6±0,5	3,5±0,8	2,9±0,5	2,8±0,2
iCa⁺⁺	1,4±0,3	1,5±0,3	1,5±0,3	1,5±0,3	1,6±0,1	1,5±0,1	1,6±0,2	1,6±0,2	1,7±0,1	1,7±0,1
Ht	27,8±3,2	27,5±3	27,8±2,7	28,9±2,2	28,4±3,1	27,3±4	28±2,7	26,2±4,3	29,2±2,7	28,6±3,7
Hb	9,6±1,2	9,4±1,2	9,4±1	10±0,8	9,8±1,2	9,4±1,5	9,9±0,8	8,9±1,4	10,2±1,1	9,7±1,3
PA	93±31	77±30	95±32	95±28	85±33	73±22	75±26	83±30	114±30	77±19*
FC	215±42	229±42	202±32	202±26	231±36	244±30	205±54	189±58	243±21	236±22

PaO₂ = pressão parcial de O₂ (mmHg); PaCO₂ = pressão parcial de CO₂ (mmHg); HCO₃⁻ = bicarbonato (mmol/l); BE = excesso de base (mmol/l); Sat O₂ = saturação da hemoglobina (%), Na⁺ = sódio (mmol/l); K⁺ = potássio (mmol/l); iCa⁺⁺ = cálcio iônico (mmol/l), Ht = hematócrito (%); Hb = hemoglobina (g/dl), PA = pressão arterial sistêmica (mmHg); FC = frequência cardíaca (bat./min). Os valores são apresentados em média ± desvio padrão.

* = p < 0,05 vs Instalação

Gráfico 1 – Valores da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ inicial e após cada lavagem nos grupos de estudo. Valores em média $\pm$ desvio padrão.

Gráfico 2 – Valores da PaCO₂ inicial e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio padrão.

No **Gráfico 3** observamos os valores do pH antes da primeira lavagem (Pré) e após cada lavagem, tendo sido encontrado valores menores de pH no Grupo 5 em relação aos Grupos 3 e 4 no momento pré lavagem ($p < 0,05$). Em todos os grupos observamos uma tendência à queda do pH ocasionado pelas sucessivas lavagens pulmonares, com a excessão dos animais do Grupo 5.

Os resultados em relação à complacência pulmonar dinâmica estão representados no **Gráfico 4**. No momento pré lavagem podemos observar uma menor complacência no Grupo 5 em relação a todos os outros grupos, exceto em relação ao Grupo 3. Com o decorrer das sucessivas lavagens pulmonares foi observada uma menor complacência pulmonar dinâmica entre os animais dos Grupos 2 e 4 em relação aos animais dos Grupos 1 e 5 ($p < 0,05$).

No **Gráfico 5** observamos os valores de pressão ventilatória. No momento pré lavagem não foram encontradas diferenças entre os grupos. Durante as lavagens podemos observar nos Grupos 2 e 4 menores valores de pressão ventilatória ($p < 0,05$), como era esperado em função do desenho de estudo adotado.

De maneira semelhante, também influenciado pelo protocolo proposto, em relação ao volume-corrente foram encontrados, no momento pré lavagem, menores valores no Grupo 5 em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$) (**Gráfico 6**). A partir da 1ª lavagem um menor volume-corrente foi encontrado nos Grupos 2 e 4 em relação aos Grupos 1, 3 e 5 ($p < 0,05$), também de acordo com o protocolo proposto.

Gráfico 3 - Valores do pH inicial (Pré) e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Gráfico 4 - Valores da complacência pulmonar dinâmica inicial (Pré) e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio padrão.

Gráfico 5 - Valores da pressão ventilatória inicial (Pré) e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio padrão.

Gráfico 6 - Valores do volume-corrente inicial e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio padrão.

Durante todo o período do estudo os animais apresentaram boa estabilidade hemodinâmica. Os valores de pressão arterial média sistêmica inicial (Pré) e após cada lavagem estão representados no **Gráfico 7**. Observamos que houve um aumento relativo da pressão arterial após a 1ª lavagem, mantendo-se estável durante todo o procedimento. Não foram encontradas diferenças entre os grupos de estudo.

Os valores referentes à frequência cardíaca são mostrados no **Gráfico 8**. Os animais mantiveram-se estáveis do início ao fim do experimento, não apresentando diferenças entre os grupos, exceto após a 1ª lavagem onde os Grupos 4 e 5 apresentaram uma maior frequência cardíaca em relação ao Grupo 2 ($p < 0,05$).

A remoção do líquido infundido em cada lavagem foi semelhante entre os grupos (**Gráfico 9**). Na 1ª lavagem foi retirado em média 80% do volume de líquido infundido, um menor volume foi retirado no Grupo 4 em relação aos Grupos 1 e 2 e no Grupo 3 em relação aos Grupos 1, 2 e 4. Nas sucessivas lavagens foi retirado em média 100% do volume de líquido infundido, não se observando diferenças entre os grupos.

No balanço final dos lavados (**Gráfico 10**) podemos observar que em média 90% do volume infundido foi retirado, não existindo diferenças entre os grupos.

Também não foram encontradas diferenças entre os grupos de estudo em relação aos valores de proteína total nos lavados broncoalveolares (**Gráfico 11**).

Gráfico 7 - Valores da pressão arterial sistêmica inicial e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio-padrão.

Gráfico 8 - Valores da frequência cardíaca inicial e após cada lavagem nos grupos de estudo. Resultados em média $\pm$ desvio-padrão.

Gráfico 9 - Porcentagem de líquido removido dos pulmões em cada lavagem nos grupos de estudo. Valores em média $\pm$ desvio-padrão.

Gráfico 10 - Balanço final de líquido removido dos pulmões de acordo com os grupos de estudo. Valores em média $\pm$ desvio-padrão.

Gráfico 11 - Concentração total de proteínas nos lavados broncoalveolares, por grupo de estudo. Valores em média $\pm$ desvio-padrão.

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O interesse para a realização de um estudo visando o aperfeiçoamento da instalação do modelo experimental da Síndrome do Desconforto Respiratório do tipo Agudo, surgiu através da constatação das inúmeras variações de técnica encontradas na literatura especializada, para a instalação deste modelo animal. Uma das linhas de pesquisa propostas pelo Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, é a do estudo do surfactante e técnicas de ventilação mecânica aplicados ao tratamento da SDRA. Portanto consideramos necessário uma melhor definição da técnica de instalação deste modelo experimental, uma vez que este será utilizado inúmeras vezes em diversos projetos de pesquisa.

O modelo animal escolhido foi o da lavagem pulmonar com soro fisiológico aquecido, por ser o mais utilizado pelos pesquisadores nesta área.

Optamos pelo coelho para a instalação deste modelo experimental levando em consideração aspectos práticos, tais como a facilidade de obtenção, o grau de dificuldade técnica da sua manipulação e o custo. Além disto, grande parte dos estudos com modelo experimental de SDRA publicados na literatura especializada utilizam o coelho como animal de experimentação, (2,18,21,22,25,33,35,36,37). A escolha do animal adulto foi baseada no fato

de que, para o estudo da SDRA, não era de utilidade a avaliação do pulmão imaturo ou em desenvolvimento.

A técnica inicialmente descrita por Lachmann (1980) foi modificada por vários autores, resultando em variações de manejo do animal durante a instalação do modelo experimental, como a escolha do volume de soro fisiológico utilizado na lavagem, o número de lavagens pulmonares realizadas para a instalação do modelo, o tempo de intervalo entre as lavagens, a forma de infusão e de retirada do líquido nos pulmões e o modo de ventilação mecânica utilizado entre as lavagens, dificultando a sua reprodutibilidade (18,20,27,34,59). Tornou-se então clara a necessidade de um aperfeiçoamento da técnica para sua execução com maior eficiência, confiabilidade e reprodutibilidade.

Sempre que possível optamos por utilizar os valores estabelecidos no modelo original, tal como o uso de uma temperatura do lavado a 37 °C para evitar o resfriamento do animal durante o procedimento, e o uso de uma pressão máxima de infusão de 40 cmH₂O, para evitar o rompimento das estruturas pulmonares com perda da arquitetura normal do pulmão, que poderia ocorrer com pressões de infusão superiores a este valor (59). De modo semelhante, adotamos o critério original de retirada do líquido do pulmão por gravidade por ser o método originalmente descrito e utilizado por Lachmann (1980) e repetido na maioria dos estudos. Por outro lado, adotamos o uso de movimentos externos de compressão torácica durante toda a lavagem pulmonar, para aumentar a eficiência da retirada do líquido de lavagem dos pulmões. Apenas dois outros autores descrevem esta

técnica, um para a infusão e outro para a retirada do líquido de lavagem (18,20).

Em relação ao intervalo de tempo estabelecido entre os procedimentos de lavagem pulmonar, o período fixo de 5 minutos, contados após a saída completa do líquido, foi escolhido a fim de garantir um intervalo de tempo suficiente para permitir a estabilização do animal após cada procedimento. A literatura mostra grande variabilidade neste intervalo, situando-se entre 2 a 5 minutos (20,27,34), sendo que na maioria das vezes os autores não justificam a adoção de determinado intervalo de tempo entre as lavagens.

Em relação ao critério de definição de SDRA, nós optamos por utilizar um valor mais baixo (relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$) do que o consenso internacional que adotou, como definição de SDRA uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ (6,13). Isto foi feito com o objetivo de se trabalhar com animais de uma maior gravidade, sendo que esta estratégia é utilizada pela maioria dos autores que utilizam este modelo animal (18,20,24,27).

Nós consideramos necessário realizar uma gasometria arterial 5 minutos após atingido o critério gasométrico de SDRA (portanto 10 minutos após a última lavagem pulmonar), com o objetivo de confirmar a instalação do modelo experimental. A adoção deste cuidado permitiu aos pesquisadores assegurar que o achado de uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ não foi o resultado de uma piora ocasional e momentânea da função respiratória, mas sim o resultado de uma lesão pulmonar estabelecida. Se esta gasometria não confirmasse a instalação do modelo, caracterizando apenas uma piora momentânea, o procedimento de lavagem era reiniciado. Durante nosso

estudo pudemos observar que alguns animais apresentaram falha na gasometria de confirmação, com valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 100$, sendo necessário repetir o procedimento de lavagem pulmonar, para a instalação do modelo proposto. Em alguns estudos citados anteriormente a lavagem pulmonar foi repetida por um número de vezes pré-estabelecidas, sem uma gasometria de confirmação após a instalação do modelo, o que pode determinar um importante fator de erro. Assim, Lackmann (1980) realizava 10 lavagens consecutivas, Hickling (1996) repetia a lavagem por 4 vezes, Barsotti (1996) por 6 vezes independente dos valores gasométricos (27,34,59). De maneira semelhante ao nosso estudo, Rotta (2001) repetia o procedimento por 3 vezes e após 15 minutos realizava uma gasometria para a confirmação da obtenção do modelo, porém o autor não comenta se algum animal apresentou falha na instalação do modelo (20).

As variáveis de manipulação do animal para a instalação da SDRA que foram escolhidas para este estudo obedeceram a premissas teóricas que justificariam uma maior estabilidade e confiabilidade na instalação do modelo experimental.

Desta forma, a decisão de se estudar os efeitos de diferentes volumes de lavagem foi baseada no fato de que, quanto maior fosse o volume utilizado, maior seria a retirada de surfactante do pulmão. De maneira semelhante, a retirada do surfactante pulmonar é proporcional ao número de lavagens realizadas, sendo que após a primeira lavagem aproximadamente 30% da fosfatidilcolina saturada é removida (62). Desta forma, a utilização de um maior volume de soro fisiológico aquecido poderia reduzir o número de

lavagens necessário para a instalação do modelo experimental. Utilizamos volumes de 25 e 30 ml/kg para a realização das lavagens por serem os mais utilizados na literatura, e pudemos concluir que ambos os volumes se comportaram de maneira semelhante em relação à estabilidade hemodinâmica dos animais e em relação no número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo. Da mesma forma, não observamos diferenças em relação à mortalidade dos animais que pudessem estar relacionadas ao volume de soro fisiológico utilizado na lavagem.

Por outro lado, a decisão de se estudar os efeitos da adoção ou não de um volume-corrente fixo durante as sucessivas lavagens se baseou na possibilidade de se obter uma melhor ventilação alveolar durante todo o procedimento (através da adoção de um volume-corrente fixo), melhorando a estabilidade do animal durante o procedimento e reduzindo a possibilidade de grandes variações hemodinâmicas ou até de morte.

De fato, neste estudo pudemos notar que, quando foi utilizada uma pressão inspiratória fixa, as sucessivas lavagens pulmonares resultaram em uma diminuição da complacência pulmonar com uma gradativa redução do volume-corrente, levando a uma pior ventilação alveolar com acúmulo de CO_2 . Essa diferença resultou em uma tendência ao aumento da PaCO_2 a partir da 3ª lavagem. Isso se refletiu também nos valores do pH, com gradativa tendência para a acidemia, durante as sucessivas lavagens nos grupos ventilados com uma pressão inspiratória fixa.

De maneira semelhante, inicialmente observou-se uma tendência de pressões arteriais sistêmicas mais elevadas entre os animais ventilados com

pressão inspiratória fixa, porém essa diferença desapareceu no decorrer das lavagens pulmonares, mostrando que as diferenças em relação aos valores gasométricos e de pH estavam mais relacionados à uma situação respiratória desfavorável do que a uma instabilidade hemodinâmica.

Embora não tenham sido observadas diferenças em relação ao número de lavagens necessárias para a instalação do modelo experimental com a utilização de pressão inspiratória ou de volume-corrente fixo, observamos uma tendência a uma maior mortalidade entre os animais ventilados com pressão inspiratória fixa, embora sem significância estatística.

A análise global destes resultados sugere que, durante a instalação do modelo experimental de SDRA, é preferível trabalhar com o volume-corrente fixo durante as sucessivas lavagens pulmonares.

De modo semelhante, a decisão de se estudar os efeitos do recrutamento pulmonar como variável para a instalação deste modelo experimental se baseou na premissa de que a hiperdistensão do pulmão resulta em uma maior liberação de surfactante para o interior dos alvéolos, permitindo uma maior eficiência de sua retirada com as lavagens posteriores, resultando em maior agressão aos pulmões com o procedimento de lavagem (71).

Inicialmente encontramos uma dificuldade para realizar a manobra de recrutamento por não haver, na literatura especializada, estudos de recrutamento pulmonar em pulmão sadio. Desta forma, optamos por realizar um estudo piloto utilizando 3 animais, para determinar o ponto de inflexão inferior da curva PV (Pflex) no pulmão sadio do coelho, encontrando um valor de 8 cmH₂O, sem evidência de repercussões hemodinâmicas. Assim

sendo, optamos por utilizar uma PEEP 2 cmH₂O acima deste valor durante 5 minutos, como manobra de sobredistensão do pulmão. Esta manobra se mostrou eficaz uma vez que os valores da complacência pulmonar dinâmica anterior à primeira lavagem foram mais baixos nos animais submetidos à manobra de recrutamento, mostrando que os mesmos apresentavam sobredistensão pulmonar. No decorrer das lavagens posteriores a complacência dinâmica se igualou aos demais grupos que utilizaram volume-corrente fixo. Os animais submetidos ao recrutamento apresentaram, além de valores mais elevados de PaCO₂ e valores menores de pH, a menor média do número de lavagens necessária para a obtenção do modelo experimental (3,3 lavagens), embora sem significância estatística. Também não foram observadas diferenças em relação à estabilidade hemodinâmica e à mortalidade. Assim sendo, em vista da maior dificuldade técnica para a realização do procedimento de recrutamento pulmonar, associado à falta de benefícios evidentes para a instalação do modelo experimental, pudemos então concluir que a manobra de recrutamento não contribuiu de maneira significativa para a instalação do modelo de SDRA.

A análise das perdas de proteínas no lavado broncoalveolar não mostrou diferenças entre os grupos de estudo, porém os maiores valores de perda proteica foram encontrados entre os animais submetidos a lavagem utilizando volume-corrente fixo de 10 ml/kg e volume de lavagem de 25 ml/kg, sugerindo que a agressão ao pulmão utilizando este procedimento foi maior.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A utilização de manobra de recrutamento alveolar, a adoção de um volume-corrente fixo ou pressão inspiratória fixa entre as lavagens, e a utilização de diferentes volumes de lavagem (25 e 30 ml/kg) não modificaram o número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental de SDRA, assim como não modificaram a estabilidade hemodinâmica dos animais durante a realização do procedimento.

Foi observada uma tendência a uma maior mortalidade com a realização da manobra de recrutamento alveolar e com o uso de pressão inspiratória fixa e volume de lavagem de 25 ml/kg.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise global dos resultados encontrados sugere que, para a obtenção do modelo experimental de SDRA através do modelo inicialmente descrito por Lachman (1980), utilizando coelho adulto submetido a sucessivas lavagens com soro fisiológico aquecido, entre as diversas modificações encontradas na literatura consideramos como mais adequado o uso de volume-corrente fixo entre as lavagens, utilizando um volume de de soro fisiológico de 30 ml/kg, sem recrutamento pulmonar.

A adoção desta técnica permitiu uma maior estabilidade dos animais durante o procedimento, sem aumento da mortalidade, apesar de não reduzir o número de lavagens necessárias para a obtenção do modelo experimental.

Baseado neste estudo, a equipe da Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP passou a utilizar esta técnica nos estudos de SDRA que utilizam o modelo do coelho adulto submetido a lavagens pulmonares com soro fisiológico aquecido.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967; 2: 319-23.
2. Rice TW, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: challenges in clinical trial design. *Clin Chest Med*. 2006; 27: 33-54.
3. Perez-Benavides F, Riff E, Franks C. Adult respiratory distress syndrome and artificial surfactant replacement the pediatric patient. *Pediatr Emerg Care*. 1995; 11: 153-5.
4. Antoniazzi P, Pereira Jr GA, Marson F, Abeid M, Baldisserotto S, Basile AF. Síndrome da angústia respiratória (SARA). *Med Rib Preto*. 1998; 31: 493-506.
5. Brackenbury AM, Puligandla PS, McCaig LA, Nikore V, Yao LJ, Veldhuizen RAW, Lewis JF. Evaluation of exogenous surfactant in HCL-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1135-42.
6. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American european consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care*. 1994; 9: 72-81.
7. Parsons PE. Mediators and mechanisms of acute lung injury. *Clin Chest Med*. 2000; 21: 467-76.
8. Paret G, Ziv T, Augarten A, Barzilai A, Ben-Abraham R, Vardi A, Manisterski Y, Barzilay Z. Acute respiratory distress syndrome in children: a 10 year experience. *Isr Med Assoc J*. 1999; 1: 149-53.

9. Kumar A, Bhatnagar V. Respiratory distress in neonates. *Indian J Pediatr.* 2005; 72: 425-8.
10. Casado-Flores J, Azagra AM, Ruiz-López MJ, Ruiz M, Serrano A. Pediatric ARDS: effect of supine-prone postural changes oxygenation. *Intensive Care Med.* 2002; 28: 1792-6.
11. Curley MAQ, Thompson JE, Arnold JH. The effects of early prone position in pediatric patients with acute lung injury. *Chest.* 2000; 118: 156-63.
12. Flori HR, Glidden DV, Rutheford GW, Matthay MA. Pediatric acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 995-1001.
13. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, Glauser M, Parsons P, Fisher CJ, Repine JE. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. *Crit Care Med.* 2000; 28: 232-5.
14. Moss M, Manino DM. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: An analysis of multiple-cause mortality data. *Crit Care Med.* 2002; 30: 1679-85.
15. Rossi FS. Comparação entre ventilação oscilatória de alta frequência e ventilação convencional protetora em modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
16. Bastos IVP, Sá FRN, Faria LS, Troster EJ, Vaz FAC. Epidemiologia da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em UTI pediátrica

- de hospital universitário. In: IX Congresso Brasileiro de Terapia Intensiva Pediátrica, 2004. Porto Alegre, 2004.
17. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome. A randomized controlled trial. *JAMA*. 1999; 282: 54-61.
18. Piva J, Chatrkaw P, Choong K, Frndova H, Cox P. Ventilação de alta frequência por oscilação comparada à ventilação convencional associado à reposição de surfactante em coelhos. *J Pediatr*. 2000; 76: 349-56.
19. Shutzky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999; 116: 95-155.
20. Rotta AT, Guannarsson B, Furman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. Comparasion of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2001; 29: 2176-84.
21. Plötz FB, Mook PH, Jansen NJG, Oetomo SB, Wildeveuer CRH. Reduction in adverse effects of mechanical ventilation in rabbits with acute respiratory failure by treatment with extracorporeal CO₂ removal and a large fluid volume of diluted surfactant. *Asaio Journal*. 1997; 43: 916-21.
22. Kerr CL, Veldhuizen RAW, Lewis JF. Effects of high frequency oscilattion on endogenous surfactant in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 237-42.

-
23. Van der Kloot TE, Blanch L, Youngblood AM, Weinert C, Adams AB, Marini JJ, Shapiro RS, Nahum A. Recruitment maneuvers in three experimental models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1485-94.
24. Ito Y, Manwell SEE, Kerr CL, Veldhuizen RAW, Yao LJ, Bjarneson D, McCaig LA, Barlett AJ, Lewis JF. Effects of ventilation strategies on the efficacy of exogenous surfactant therapy in a rabbit model of acute respiratory injury. *Am J Respir Care Med*. 1998; 157: 149-55.
25. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Slutsky A, Miyasaka K. Comparasion of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 1836-44.
26. Viana MEG, Sargentelli GA, Arruda ALM, Wiryawan B, Rotta AT. O impacto de estratégias de ventilação mecânica que minimizam o atelectrauma em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda. *J Pediatr*. 2004; 80: 184-96.
27. Hickling KG, Town IG, Epton M, Neill A, Tie A, Whitehead M, Graham P, Everest E, A'Court G, Darlow B, Laubscher K. Pressure limited ventilation with permissive hypercapnia and minimum PEEP in saline-lavaged rabbits allows progressive improvement oxygenation, but does not avoid ventilator lung injury. *Int Care Med*. 1996; 22: 1445-52.
28. Kornecki A, Tsuchida S, Ondiveeran HK, Engelberts D, Frndova H, Tanswell AK, Post M, McKerlie C, Belik J, Fox-Robichaud A, Kavanagh B. Lung development and susceptibility to ventilator-induced lung injury. *Am Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 743-52.

-
29. Levy MM. PEEP in ARDS – How much is enough? *N Engl J Med.* 2004; 351: 389-91.
 30. Doctor A, Arnold J. Mechanical support of acute lung injury: Options for strategic ventilation. *New Horiz.* 1999; 7: 359-73.
 31. Anton N, Joffe KM, Joffe AR. Inability to predict outcome of acute respiratory distress syndrome in children when using high frequency oscillation. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 1763-69.
 32. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 294-323.
 33. Ludwings U, Philip A. A comparasion of inverse ratio ventilation and conventional mechanical ventilation in oleic acid-induced lung injury. *Chest.* 1998; 113: 459-66.
 34. Barsotti M, Chundu V, Silvka S, Sephus J, Hallman M. Hemodynamics of respiratory failure in rabbit model. Effect of surfactant supplementation. *Lung.* 1996; 174: 255-68.
 35. Higuchi R, Lewis J, Ikegami M. In vitro conversion of surfactant subtypes is altered in alveolar surfactant isolated from injured lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145: 1416-20.
 36. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Altered surfactant function metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol.* 1990; 69: 2303-10.
 37. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Metabolism of exogenously administred surfactant in acutely injured lungs of adult rabbits. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145: 19-23.

-
38. Hudson LD. Progress in understanding ventilator-induced lung injury. *JAMA*. 1999; 282: 77-8.
39. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 218-33.
40. Taskar V, John J, Evander E, Robertson B, Jonson B. Surfactant dysfunction makes lung vulnerable to repetitive collapse and reexpansion. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 313-20.
41. Pison U, Gono E, Joka T. Phospholipid lung profile in adult respiratory distress syndrome – Evidence for surfactant abnormality. *Prog Clin Biol Res*. 1987; 236A: 517-23.
42. Fok TF, Gu GJS, To KF, Xu F, Ng PC, Yin J. Oxygen consumption by lungs with acute and chronic injury in a rabbit model. *Int Care Med*. 2001; 27: 1532-8.
43. Ito Y, Veldhuizen RA, Yao LJ, McCaig LA, Bartlett AJ, Lewis JF. Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 493-9.
44. Bauman LA, Wilson DF. Surfactant in pediatric respiratory failure. *New Horiz*. 1997; 7: 399-413.
45. Kruse MF, Schult-Monting J, Hoehn T. Rate of surfactant administration influences lung function and gas exchange in a surfactant-deficient rabbit model. *Pediatr Pulmonol*. 1998; 25: 196-204.
46. Zhou ZH, Sun B, Lin K, Zhu LW. Prevention of rabbit acute lung injury by surfactant, inhaled nitric oxide, and pressure support ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 581-88.

-
47. 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.
48. Wilson DF, Thomas NJ, Markovitz BP, Bauman LA, DiCarlo JV, Pon S, Jacobs BR, Jefferson LS, Conaway MR, Egan EA. Effect of exogenous surfactant (Calfant) in pediatric acute lung injury. A randomized controlled trial. *JAMA.* 2005; 293: 470-6.
49. McCabe AJ, Wilcox DT, Holm BA, Glick PL. Surfactant – A review for pediatric surgeons. *Journal of Pediatric Surgery.* 2000; 35(12): 1687-700.
50. Kurdowka A, Noble JM, Steinberg KP, Ruzinsk JT, Hudson LD, Martin TR. Anti-interleukin 8 autoantibody: Interleukin 8 complexes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 463-8.
51. Goodman RB, Streiter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 602-11.
52. Ranieri VM, Slutsky AS. Respiratory physiology and acute lung injury: the miracle of Lazarus [editorial]. *Int Care Med.* 1999; 25: 1040-3.
53. McColm JR, Stenson BJ, Biermasz N, McIntosh N. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants [editorial]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2000; 82: F156-9.

-
54. Krause M, Olsson T, Law AB, Parker RA, Lindstrom DP, Sundell HW, Cotton RB. Effect of volume recruitment on response to surfactant treatment with lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 862-6.
55. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Maekawa N, Obara H. Effects of exogenous surfactant on acute lung injury induced by intratracheal instillation of infant formula or human breast milk in rabbits. *Anesthesiology*. 1999; 91: 240-52.
56. Kunst PW, Bohm SH, Vazquez de Anda G, Amato MB, Lachmann B, Postmus PE, de Vries PM. Regional pressure volume curves by electrical impedance tomography in a model of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2000; 28: 178-83.
57. Vazquez de Anda G, Bohm SH, Faes TJ, Lachmann B, Postmus PE, de Vries PM. Monitoring of recruitment and derecruitment by electrical impedance tomography in a model of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2000; 28: 3891-5.
58. Shimabukuru DW, Sawa T, Gropper MA. Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med*. 2003; 31: S524-31.
59. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anesth Scand*. 1980; 24: 231-6.
60. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994; 32: 9-15.
61. Serra S, Morgante L. Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. I. General characteristics and

comparative analysis with the biuret method and Lowry's method. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1980; 56: 160-5.

62. Doyle IR, Jones ME, Barr HA, Orgeig S, Crockett AJ, McDonald CF, Nicholas TE. Composition of human pulmonary surfactant varies with exercise and level of fitness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149:1619-27.