PAULA PRISCILA OHARA SAKAE

**Avaliação da termoestabilidade do surfactante de origem
porcina desenvolvido pelo Instituto Butantan utilizando-se o
modelo experimental do coelho prematuro**

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. Alexander Roberto Precioso

São Paulo

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, meus príncipes Felipe e Henrique, que me ensinam todos os dias o verdadeiro significado de amar.

Ao meu amado marido Eduardo, minha melhor companhia hoje e sempre.

Aos meus queridos pais, Paulo e Suzana, de quem tenho o orgulho e o privilégio de ser filha, e em quem me espelho como pessoa e profissional.

Ao meu irmão Fernando, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Alexander Roberto Precioso, meu orientador, por ter me convidado a realizar este trabalho e me apresentado à pesquisa experimental, além de sua participação ativa e acolhedora em todas as etapas desta dissertação e também de minha formação.

Ao Dr. Celso Moura Rebello, responsável pela Unidade de Pesquisa Experimental, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, e pela sua valorosa contribuição para este trabalho, em inúmeros aspectos.

À Profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone, pelas sugestões valiosas em minha aula de qualificação, e pela sua contribuição à minha formação como pediatra e neonatologista.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, por sua participação em minha qualificação e sugestões construtivas para aprimorar este trabalho.

À Dra. Flávia Saldanha Kubrusly, do Instituto Butantan, por suas orientações e esclarecimentos em relação ao objeto de meu estudo, e também por sua contribuição em minha qualificação.

À Dra. Renata Suman Mascaretti, por seu apoio e paciência em me ensinar a ler as lâminas e em esclarecer minhas dúvidas.

À fisioterapeuta Luciana Branco Haddad e ao técnico Marcelo Silva Santos, pela amizade e colaboração em diversas etapas desta pesquisa.

À toda equipe da Unidade de Pesquisa Experimental, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. Isaías Raw, do Instituto Butantan, pela oportunidade de realizar este trabalho como parte da parceria entre o Instituto Butantan e o Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Dra. Thaís Mauad, pelos esclarecimentos em relação à análise histopatológica e pelo auxílio para que eu pudesse fotografar as lâminas.

Aos animais, essenciais para que este estudo fosse concluído, nos permitindo avançar na melhoria aos cuidados prestados aos recém-nascidos.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: 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*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

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

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Desenvolvimento pulmonar.....	4
1.2.	Síntese e composição do surfactante.....	6
1.3.	Surfactante exógeno.....	12
1.3.1.	Tipos de surfactante exógeno.....	13
1.4.	Surfactante Butantan.....	17
1.4.1.	Estabilidade do Surfactante Butantan.....	19
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Geral.....	22
2.2.	Específicos.....	22
3.	MÉTODOS.....	23
3.1.	Momentos de avaliação do Surfactante Butantan.....	24
3.2.	Formação dos grupos de estudo.....	26
3.3.	Surfactante Butantan.....	26
3.4.	Surfactante Curosurf®.....	26
3.5.	Nascimento dos animais.....	27
3.6.	Ventilação dos animais.....	28
3.7.	Curva pressão-volume pulmonar.....	30
3.8.	Análise histopatológica pulmonar.....	30
3.9.	Análise estatística.....	34
3.10.	Desenho do estudo.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Caracterização dos grupos de estudo.....	37
4.2.	Mecânica ventilatória.....	38
4.2.1.	Mecânica ventilatória no Momento zero.....	39
4.2.2.	Mecânica ventilatória no Momento 1.....	42

4.2.3. Mecânica ventilatória no Momento 2.....	45
4.2.4. Mecânica ventilatória no Momento 3.....	48
4.2.5. Mecânica ventilatória no Momento 4.....	51
4.2.6. Mecânica ventilatória no Momento 5.....	54
4.3. Análise histopatológica.....	57
5. DISCUSSÃO.....	61
5.1. Considerações finais.....	68
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS.....	72
Apêndice	

LISTAS

Lista de abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Complacência Dinâmica
DO	Diário Oficial da União
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
ID	Índice de Distorção
Lm	Intecepto Linear Médio
PEEP	Pressão expiratória final positiva
P _{insp}	Pico de pressão inspiratória
PV	Pressão Ventilatória
RN	Recém-nascido
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório
SP	Apoproteína do surfante
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VC	Volume corrente

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais preparações de surfactante exógeno disponíveis em 2007.....	14
Tabela 2 – Pressão ventilatória (cmH ₂ O), aos 5 minutos de ventilação, dos grupos Butantan, Curosurf e Controle, em cada um dos momentos do estudo.....	38

Lista de figuras

Figura 1 –	Síntese e reciclagem do surfactante pulmonar.....	7
Figura 2 –	Interação das proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C com a camada de fosfolípides do surfactante pulmonar.....	11
Figura 3 –	Determinação do Intercepto Linear Médio (Lm) e do Índice de Distorção.....	33
Figura 4 –	Desenho do estudo.....	35
Figura 5 –	Momento zero.....	41
Figura 6 –	Momento 1.....	44
Figura 7 –	Momento 2.....	47
Figura 8 –	Momento 3.....	50
Figura 9 –	Momento 4.....	53
Figura 10 –	Momento 5.....	56
Figura 11 –	Intercepto linear Médio dos grupos Butantan e Curosurf, nos seis momentos de avaliação.....	58
Figura 12 –	Índice de Distorção dos grupos Butantan e Curosurf, nos seis momentos de avaliação.....	59
Figura 13 –	Aspecto microscópico do pulmão de coelhos prematuros, no Momento 2 do estudo.....	60

RESUMO

Sakae PPO. *Avaliação da termoestabilidade do surfactante de origem porcina desenvolvido pelo Instituto Butantan utilizando-se o modelo experimental do coelho prematuro* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008; 82p.

INTRODUÇÃO: A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) é uma das principais causas de morbi-mortalidade no período neonatal, acometendo predominantemente os recém-nascidos prematuros, devido a uma está deficiência de surfactante pulmonar. O Instituto Butantan desenvolveu um surfactante de origem porcina com objetivo de torná-lo disponível a todo Sistema Único de Saúde. O objetivo deste estudo foi avaliar, em um modelo experimental de SDR (coelho), a estabilidade do Surfactante Butantan (SB) um ano após sua produção e armazenamento a 2 a 8°C.. **MÉTODOS:** 94 coelhos prematuros foram randomizados em dois grupos de tratamento: grupo Butantan e grupo Curosurf (controle), e foram analisados em seis momentos de avaliação: momento zero (imediatamente após a retirada do refrigerador ao final de 1 ano de armazenamento), momento 1 (24 horas após ter sido mantido a 24°C), momento 2 (após 30 dias de armazenamento a 20° C), momento 3 (após 60 dias de armazenamento a 20° C), momento 4 (após 90 dias de armazenamento a 20° C) e momento 5 (após 180 dias de armazenamento a 20° C). Após receberem o surfactante, os animais foram ventilados por 15 minutos para avaliação da pressão ventilatória e complacência pulmonar dinâmica e curva pressão-volume pulmonar, seguindo-se à avaliação histopatológica dos pulmões. **RESULTADOS:** A eficácia do SB foi semelhante à do Curosurf, um ano após a sua produção e armazenamento a 2 a 8°C. Neste momento de avaliação, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo quanto a: pressão ventilatória, complacência pulmonar dinâmica e curva pressão-volume pulmonar. Ao longo dos seis meses de armazenamento inadequado do SB, demonstrou-se a redução de sua eficácia durante a fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar. No entanto, a análise histopatológica, demonstrou não haver diferença significativa entre os dois grupos de estudo em nenhum dos momentos de avaliação. **CONCLUSÕES:** As propriedades bioquímicas do SB foram preservadas após um ano de sua produção e armazenamento em refrigeração de 2 a 8°C. Condições inadequadas de armazenamento resultam em alterações das propriedades bioquímicas do SB e, conseqüentemente, de sua função, o que foi demonstrado por parâmetros de mecânica ventilatória, mas não pela análise histopatológica dos pulmões.

Descritores: Surfactantes pulmonares, Síndrome do Desconforto Respiratório do recém-nascido, tensão superficial, estabilidade de medicamentos, modelos animais.

SUMMARY

Sakae PPO. *Stability analysis of a surfactant derived from porcine lungs administered to premature newborn rabbits*. [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo (Brazil); 2008.

INTRODUCTION: Respiratory Distress Syndrome (RDS) is one of the major causes of death among premature newborns, and its development results from surfactant deficiency. The Butantan Institute has recently produced a porcine-derived surfactant preparation in order to make it available nationwide for RDS treatment in the near future. The aim of this study was to evaluate, in an animal model of surfactant deficiency (premature rabbits), the stability of the Butantan Surfactant (SB) one year after its production and storage in the refrigerator, at 2 to 8°C. **METHODS:** 94 premature newborn rabbits were randomized into two treatment groups: SB or Curosurf® (control surfactant), and were assessed in six different time-points: time-point zero (immediately after removal of surfactant from the refrigerator after one year of storage); time-point 1 (after 24h of storage at 24°C), time-point 2 (after 30 days of storage at 20°C), time-point 3 (after 60 days of storage at 20°C), time-point 4 (after 90 days of storage at 20°C) and time-point 5 (after 180 days of storage at 20°C). The animals were artificially ventilated for 15 minutes for lung mechanics assessment (ventilatory pressure, dynamic lung compliance and pressure-lung volume curve), followed by removal of the lungs for histopathologic analysis. **RESULTS:** After one year of its production and storage at 2 to 8°C, SB was as efficient as Curosurf. At this time-point, The Butantan Surfactant showed no significant differences with Curosurf® regarding the ventilatory pressure, dynamic lung compliance and pressure-lung volume curve. Throughout the six month period of warming, SB showed a decreasing efficiency, as revealed by the expiratory phase of the pressure-lung volume curve. However, the histopathologic analysis revealed no significant differences between the two groups, in any of the study time-points. **CONCLUSIONS:** The Butantan Surfactant preserved its biochemical properties one year after its production and storage at 2 to 8°C. On the other hand, adverse storing conditions can lead to alterations in the SB biochemical properties that result in deterioration of its function, which was demonstrated in this study by changes in lung mechanics, but not in the histopathologic analysis.

Descriptors: Newborn respiratory distress syndrome, pulmonary surfactants, surface tension, drug stability, animal models.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A transição do ambiente intra-uterino para o extra-uterino e o início da respiração significam a primeira e mais importante etapa a ser superada pelo recém-nascido. A adaptação bem-sucedida às condições do meio externo constitui o resultado final de um processo organizado que se inicia com o crescimento e a diferenciação dos pulmões e a formação de superfícies de troca gasosa no interior dos alvéolos¹.

A capacidade de realizar a oxigenação e a ventilação de forma adequada é um dos principais fatores determinantes na sobrevida e prognóstico dos recém-nascidos¹. Ainda hoje, apesar de todos os avanços obtidos na melhoria do atendimento a esses pacientes de características tão singulares, os distúrbios respiratórios no período neonatal permanecem como causa importante de morbi-mortalidade¹. As primeiras descrições clínicas da Síndrome do Desconforto Respiratório Neonatal (SDR) foram publicadas na Europa ainda no século 19². Posteriormente, em 1929, o sueco Von Neergard demonstrou que a presença de substâncias tensoativas nos alvéolos se fazia necessária para manter a ventilação pulmonar, e que a tensão superficial, muito mais que somente a elasticidade do parênquima, era responsável pela retração total do pulmão².

Porém, foi só em 1959 que Avery e Mead³ relacionaram a ocorrência da Síndrome do Desconforto Respiratório Neonatal, antes chamada de Doença da Membrana Hialina, à deficiência de uma substância tensoativa, que Clements havia denominado “surfactante pulmonar” (surfactant =

surface active agent), capaz de diminuir a tensão superficial alveolar com a redução do volume pulmonar. Nesse estudo, considerado um marco na evolução da neonatologia, os autores demonstraram que recém-nascidos prematuros que haviam falecido em decorrência da Doença de Membrana Hialina apresentavam uma elevada tensão superficial pulmonar^{3, 4}.

A deficiência de surfactante no pulmão do recém-nascido, associada ou não à sua disfunção, encontra-se na gênese de diversos distúrbios respiratórios neonatais além da SDR. O principal fator de risco para a ocorrência dessa deficiência de surfactante é a prematuridade: aproximadamente 50% dos RN com idade gestacional entre 26 e 28 semanas, e de 20 a 30% daqueles com 30 a 31 semanas de idade gestacional são acometidos pela SDR¹.

1.1. Desenvolvimento Pulmonar

O desenvolvimento do pulmão humano pode ser dividido em cinco períodos distintos¹. Durante a fase embrionária (até a 7ª semana de gestação), ocorre a formação das vias aéreas de condução, isto é, os brônquios-fonte direito e esquerdo, que se ramificam em brônquios secundários (ou lobares) e estes, por sua vez, dão origem aos ramos terciários (ou segmentares). O epitélio que recobre as vias aéreas assim formadas dará origem às vias aéreas menores e aos alvéolos.

O período compreendido entre a 8ª e a 16ª semana de gestação corresponde à fase pseudoglandular, que se caracteriza pela ramificação intensa dos brônquios segmentares (com 16 a 25 gerações de túbulos brônquicos) até a formação dos bronquíolos terminais que, nessa fase, são recobertos por um epitélio pseudoestratificado colunar, gradualmente substituído por um epitélio colunar alto nas porções mais distais.

Na etapa seguinte, denominada fase canalicular (17ª a 24ª semana), os bronquíolos terminais se dividem em bronquíolos respiratórios, que se ramificam em grupos de túbulos e brotos recobertos de epitélio cuboidal. Esses túbulos e brotos se diferenciam, crescem e se alargam para formar os ácinos pulmonares, conjuntos de estruturas formados pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e os alvéolos propriamente ditos, que são as unidades respiratórias do pulmão adulto. Nesse estágio do desenvolvimento, ocorre ainda, nos túbulos acinares, a diferenciação dos pneumócitos do tipo II e o início da síntese dos componentes do surfactante, que são

armazenados sob a forma de corpúsculos multivesiculares e multilamelares intracelulares. Efetuam-se também a diferenciação dos pneumócitos do tipo I e a formação dos capilares pulmonares e da barreira alvéolo-capilar.

Entre a 25ª e 38ª semana de gestação (fase sacular), verificam-se a diminuição do interstício e a dilatação e expansão dos túbulos e brotos acinares, que darão origem aos ductos alveolares e alvéolos pulmonares do pulmão adulto. Os septos intersaculares e interductais se desenvolvem, e ocorre a deposição de elastina nos futuros septos interalveolares. O surfactante pode ser visto nos espaços aéreos na forma de mielina tubular, secretada pelos pneumócitos do tipo II.

O período final de desenvolvimento do pulmão estende-se da 36ª semana de gestação aos 2 anos de vida, podendo completar-se até os 8 anos de idade e caracteriza-se pela formação de septos interalveolares secundários (alveolarização). Esse processo, que é mais intenso nos primeiros 12 a 24 meses de vida após o nascimento, constitui o principal responsável pelo importante incremento da área de superfície do pulmão.

1.2. Síntese e Composição do Surfactante

Desde 1946, sabe-se que o interior do pulmão contém quantidades elevadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), embora, na época, não tenha sido identificada como a substância tensoativa intralveolar². Estudos posteriores mostraram que o surfactante pulmonar é um composto de fosfolípides e proteínas, sintetizado pelos pneumócitos do tipo II presentes no epitélio alveolar. O componente proteico do surfactante é representado pelas proteínas denominadas SP-A, SP-B, SP-C e SP-D, que correspondem a cerca de 10% da composição do surfactante, enquanto os lipídeos representam a maior fração (aproximadamente 90%), dos quais 70 a 80% correspondem à fosfatidilcolina. Cerca de 60% da fosfatidilcolina apresentam-se na forma dissaturada, que é a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o agente responsável pela diminuição da tensão superficial na interface ar-líquido da superfície alveolar⁵. Os demais lipídeos do surfactante dividem-se entre: fosfatidilglicerol (5 a 10%), fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e esfingomielina⁶. O fosfatidilglicerol torna o filme lipídico mais fluido e facilita sua adsorção na interface ar-líquido⁷.

À temperatura corpórea normal, a camada de lipídeos composta principalmente de dipalmitoilfosfatidilcolina forma uma estrutura com elevada tensão superficial que, durante a compressão causada pela expiração, comprime e força a saída dos componentes mais fluidos do surfactante⁷.

Os fosfolípides são sintetizados no retículo endoplasmático a partir de precursores (colina, ácidos graxos, fósforo e glicerol) e translocados ao

complexo de Golgi, onde se agregam às proteínas do surfactante SP-B e SP-C em bicamadas compactadas e concentricamente organizadas, formando os chamados corpos lamelares, que são secretados por exocitose para a luz alveolar⁶ (Figura 1). As proteínas do surfactante são sintetizadas no retículo endoplasmático como peptídeos precursores, que são processados no complexo de Golgi. A SP-A e a SP-D são liberadas para a luz alveolar por outras vesículas secretórias⁸.

Figura 1 - Síntese e reciclagem do surfactante pulmonar. Adaptado de: Baudouin, SV. *N Engl J Med.* 2004; 351: 853-5⁹.

Uma vez na superfície do pneumócito tipo II, os corpos lamelares se hidratam e desenovelam, constituindo uma matriz fosfolipídica entremeada de proteínas, conhecida como mielina tubular, capaz de adsorver-se rapidamente na superfície e se dispersar¹⁰. A mielina tubular atua como um reservatório, a partir do qual se forma um sistema de monocamada e multicamadas de fosfolípides na interface ar-líquido, que reduz a tensão superficial a níveis mínimos¹⁰. As moléculas de fosfatidilcolina na monocamada se alinham com as extremidades polares voltadas para a subfase líquida e as cadeias de acil voltadas para o ar. Com a respiração, e também por inativação por processos biológicos, proteínas e lipídeos livres e insaturados se dissociam da monocamada, formando vesículas, das quais cerca de 70 a 80% são recaptadas pelos pneumócitos do tipo II para degradação ou reciclagem dos componentes^{5, 6, 8}.

Os macrófagos alveolares, estimulados pela presença do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), internalizam e catabolizam as vesículas remanescentes, contribuindo para a renovação e a manutenção do *pool* de surfactante na luz alveolar⁸. Alterações no gene que decodifica o GM-CSF ou no gene receptor deste, ou a inativação de ambos por anticorpos anti-GM-CSF, podem interferir no catabolismo do surfactante pelos macrófagos alveolares, levando ao acúmulo de restos celulares e surfactante na luz alveolar e à redução da superfície de troca gasosa, que resultam no distúrbio denominado proteinose alveolar pulmonar⁸.

Embora as proteínas constituam apenas 10% da composição do surfactante, são essenciais à sua homeostase e função. A SP-A, SP-B, SP-C e SP-D foram assim nomeadas de acordo com a ordem cronológica de identificação⁷.

As proteínas SP-A e SP-D são moléculas grandes e hidrossolúveis, pertencentes à família das colectinas, superfamília das lecitinas tipo C, cálcio-dependentes. As proteínas SP-A e a SP-D atuam na reorganização e *turnover* do surfactante: a SP-A liga-se à DPPC, regulando a secreção de fosfolípidos e sua recaptação pelo pneumócito tipo II ⁷. A SP-A também desempenha papel protetor contra proteínas do plasma que possam inativar o surfactante^{11, 12}.

Nos últimos anos, têm-se valorizado as proteínas SP-A e SP-D como importantes constituintes da defesa inata pulmonar, uma vez que podem atuar como opsoninas, ligando-se aos lipopolissacarídeos de algumas bactérias⁷. Assim, a ausência da SP-A e da SP-D aumenta a suscetibilidade a alguns microrganismos, como por exemplo, *Streptococcus* do grupo B, *Pseudomonas*, *H. influenzae* e a alguns vírus (herpes simples tipo 1, influenza A e vírus sincicial respiratório)^{6, 7, 13}. A SP-A e a SP-D estimulam ainda a captação de bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, e Gram-positivas, como pneumococos e *S. aureus*, pelos neutrófilos, em um processo dependente de cálcio¹³. Essas colectinas, portanto, podem promover o clareamento de microrganismos no pulmão pelos neutrófilos, independentemente da síntese de anticorpos específicos¹³.

A proteína SP-D interage com os macrófagos alveolares, estimulando a liberação de radicais livres por essas células. A SP-D também tem um papel importante na proteção contra a *Candida albicans* e, além do pulmão, pode ser encontrada em todas as superfícies mucosas do corpo humano, sendo por isso considerada uma proteína equivalente à IgA no sistema de defesa inata humano¹³.

As proteínas SP-B e SP-C são, por outro lado, moléculas bem menores e hidrofóbicas e, devido à sua solubilidade em lipídeos e solventes orgânicos, seu isolamento é muito mais difícil. Tanto a SP-A quanto a SP-B e a SP-D já foram identificadas também no trato gastrointestinal, enquanto a SP-C parece ser a única proteína específica do surfactante, pois até hoje não foram encontradas moléculas homólogas no organismo⁷.

A SP-B é um componente essencial do surfactante pulmonar, pois atua em diversas etapas de sua formação. Essa proteína é capaz de interagir com os fosfolípidos contidos nas vesículas intracitoplasmáticas do pneumócito tipo II, de modo a organizá-los sob a forma de corpos lamelares¹⁰. Na luz alveolar, a SP-B atua na formação da mielina tubular e das camadas de fosfolípidos na interface ar-líquido, promovendo a adsorção das moléculas lipídicas no filme em expansão⁷. Além disso, a SP-B interage simultaneamente com as duas camadas de fosfolípidos, aproximando-as e estabilizando-as durante o ciclo respiratório¹⁰.

A SP-C é uma das proteínas mais abundantes do surfactante, correspondendo a aproximadamente 4% de seu peso¹⁰. O peptídeo precursor da SP-C sofre um processamento proteolítico, dependente da

presença da SP-B. A SP-C é incorporada aos corpos lamelares com a SP-B, e então secretada para a luz alveolar¹⁰.

A SP-C difere estruturalmente da SP-B – trata-se de um peptídeo menor, em alfa-hélice, que se insere nas camadas lipídicas. Tem a função de facilitar a formação destas, pois permite uma maior mobilidade das moléculas de fosfolípides entre as vesículas e o filme de surfactante. Além disso, a SP-C também auxilia na estabilização dos fosfolípides durante a respiração, de forma análoga à SP-B¹⁰ (Figura 2). Devido à capacidade de promover a adsorção e disseminação dos fosfolípides na interface ar-líquido e, conseqüentemente, de reduzir a tensão superficial, as proteínas SP-B e SP-C são essenciais à atividade do surfactante pulmonar¹⁴.

Figura 2 – Interação das proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C com a camada de fosfolípides do surfactante pulmonar. Adaptado de Whitsett JA, Weaver TE. *N Engl J Med*. 2002;347:2141-8¹⁰.

1.3. Surfactante Exógeno

Após a descrição inicial da fisiopatologia da SDR por Avery e Mead em 1959³, começaram a surgir, na década de 60, as primeiras tentativas de utilização de surfactante exógeno para o tratamento da SDR em recém-nascidos. Esses primeiros estudos não conseguiram demonstrar benefícios com o uso do surfactante disponível na ocasião, que era constituído somente de fosfolípides (com elevada proporção de DPPC) e administrado sob a forma de nebulização¹⁵.

Em 1972, Enhorning e Robertson¹⁶ utilizaram surfactante extraído de coelhos adultos para tratar filhotes prematuros, mostrando uma melhora significativa da mecânica pulmonar. Um estudo com cordeiros prematuros demonstrou que a administração de surfactante levava à melhora na oxigenação e ventilação¹⁷.

O primeiro ensaio clínico com resultados favoráveis foi então publicado em 1980, por Fujiwara et cols.¹⁸, que demonstraram uma melhora na oxigenação e ventilação de 10 recém-nascidos com SDR grave, que haviam recebido por via endotraqueal uma preparação de surfactante de pulmões bovinos extraído com solventes orgânicos. Nos Estados Unidos, a utilização de surfactante exógeno em recém-nascidos para o tratamento da SDR, a partir de 1989, foi responsável por uma redução de 30% na mortalidade de RN de muito baixo peso e por uma diminuição de até 31% nos custos de tratamento por paciente¹⁹. Após o estudo de Fujiwara et cols., diversos ensaios clínicos multicêntricos foram realizados tanto na Europa quanto nos

Estados Unidos^{20 21, 22, 23, 24,}, demonstrando uma redução significativa da mortalidade por SDR (de 40 a 50%), de forma que, a partir de 1990, o surfactante exógeno passou a ser utilizado rotineiramente no tratamento da SDR em RN.

Na América Latina, antes da introdução do surfactante exógeno, a mortalidade neonatal por SDR superava 50% dos casos, chegando a mais de 75% entre os menores de 1000g^{25, 26, 27}. Devido ao impacto da utilização do surfactante exógeno no tratamento da SDR a partir de 1990, a realização de novos ensaios clínicos com placebo passou a ser considerada antiética²⁸. Por essa razão, há poucos dados disponíveis sobre a América Latina que sejam provenientes desse tipo de estudo. Entretanto, um estudo multicêntrico que utilizou controles históricos revelou que a redução da mortalidade por SDR, na primeira semana de vida, com o uso do surfactante foi de aproximadamente 50%²⁵.

1.3.1. Tipos de Surfactante Exógeno

Atualmente, diferentes preparações de surfactante exógeno estão disponíveis comercialmente. A maior parte dessas preparações é constituída por fosfolípidos e pelas proteínas SP-B e SP-C, diferindo do surfactante endógeno pela ausência das proteínas hidrossolúveis SP-A e SP-D.

Os surfactantes exógenos podem ser classificados de acordo com sua origem: natural ou sintética (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais preparações de surfactante exógeno disponíveis em 2007

Nome genérico	Nome comercial	Origem	1.1 Fabricante
Pumactant	ALEC® *	Sintética	Britannia (Reino Unido)
Bovactant	Alveofact®	Lavado de pulmão bovino	Lyomark (Alemanha)
BLES	BLES®	Lavado de pulmão bovino	BLES Biochemicals (Canadá)
Poractant alfa	Curosurf®	Macerado de pulmão suíno	Chiesi Farmaceutici (Itália)
Cosfoceril	Exosurf®	Sintética	GlaxoSmithKline (EUA)
Calfactant	Infasurf®	Lavado de pulmão bovino	ONY Inc. (EUA)
Surfactant-TA	Surfacten®	Macerado de pulmão bovino	Tokyo Tanabe (Japão)
Lucinactant	Surfaxin®	Sintética	Discovery Labs (EUA)
Beractant	Survanta®	Macerado de pulmão bovino	Ross Labs (EUA)

FONTE: modificado de Sweet DS, et al. *J Perinat Med.* 2007; 35: 175-86²⁹

* Deixou de ser produzido

Os surfactantes naturais são obtidos a partir de pulmões bovinos ou porcinos. Independentemente de sua origem, durante o processo de produção, utilizam-se para a extração solventes orgânicos que removem as proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D e preservam apenas as hidrofóbicas SP-B e SP-C. Os surfactantes derivados de lavado pulmonar, como o calfactant (Infasurf®) e o BLES®, apresentam um maior conteúdo de SP-B em relação aos extratos de macerado de pulmão, como o poractant (Curosurf®) e o

beractant (Survanta[®])³⁰, embora essa diferença não tenha sido associada à melhor evolução clínica³¹.

O poractant alfa é obtido após a extração com solventes orgânicos (clorofórmio e metanol) e a purificação por cromatografia, de forma que sua composição final é de 99% de lipídeos polares e apenas 1% de proteínas hidrofóbicas³⁰. O beractant, na verdade, é o mesmo produto que o Surfactante TA (Surfacten[®]) desenvolvido no Japão, mas foi testado e aprovado para uso nos Estados Unidos com outra denominação (Survanta[®])¹⁵. A partir do macerado de pulmão bovino, os fosfolípides e as proteínas SP-B e SP-C são extraídos com solventes orgânicos e recebem a adição de DPPC, ácido palmítico e triglicérides para aprimorar as propriedades tensoativas do extrato³².

Os primeiros surfactantes sintéticos desenvolvidos continham apenas fosfolípides, com elevada concentração de DPPC. Destes, apenas o Exosurf[®] ainda se encontra disponível no mercado, tendo sido extensivamente analisado em ensaios clínicos randomizados e em estudos comparativos com outros surfactantes. Dados de uma metanálise de 2001 mostraram que os surfactantes naturais foram superiores aos sintéticos de primeira geração, com importante redução da mortalidade e de síndrome de extravasamento de ar³³. Por esse motivo, os surfactantes naturais ainda são considerados o tratamento de escolha para a SDR²⁹.

Embora os surfactantes naturais sejam considerados os mais adequados para o tratamento da SDR, algumas reflexões ainda são feitas em relação ao seu conteúdo proteico. Devido à presença de proteínas de

origem animal em sua composição, os surfactantes naturais poderiam desencadear fenômenos imunológicos indesejáveis^{34, 35} ou transmitir agentes infecciosos. Até o momento, porém, os estudos realizados não demonstraram fenômenos imunológicos adversos associados ao uso do surfactante^{36, 37}.

Devido ao limitado êxito dos surfactantes sintéticos de primeira geração e da origem animal dos surfactantes naturais, desenvolveu-se uma nova geração de surfactantes sintéticos, contendo proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, análogos às proteínas do surfactante, que mimetizam suas propriedades estruturais e funcionais *in vitro* e *in vivo*. O lucinactant (Surfaxin[®]) faz parte dessa nova geração de preparações sintéticas. Além dos fosfolípides, contém um peptídeo sintético (sinapultide, também denominado peptídeo KL₄) que mimetiza a ação da SP-B^{38, 39}. Estudos multicêntricos recentes demonstraram que a mortalidade por SDR entre os RN que receberam o lucinactant foi menor que entre os que receberam cosfoceril, e semelhante à dos tratados com beractant e poractant^{40, 41}.

1.4. Surfactante Butantan

Em virtude da natureza complexa de sua produção e comercialização, os surfactantes exógenos utilizados no Brasil são adquiridos no exterior a um custo bastante elevado, o que limita seu uso a casos selecionados e a locais com maiores recursos. Com a finalidade de viabilizar o uso de surfactante exógeno no Sistema Único de Saúde em todo o território nacional, o Instituto Butantan, desenvolveu, com o Instituto de Química da Universidade de São Paulo e a iniciativa privada, uma tecnologia para produzir um surfactante exógeno brasileiro a baixo custo.

O Surfactante Butantan (SB) é uma preparação de origem natural, derivada de macerado de pulmões suínos. Os macerados obtidos permanecem em suspensão em solução salina por algumas horas, sendo filtrados a seguir. Ao material filtrado é adicionado um derivado de celulose (DEAE) para adsorção dos componentes. Após homogeneização e nova filtração, a suspensão é submetida à extração com solventes orgânicos (tricloroetileno e metanol). O material final obtido é diluído em solução salina e armazenado em refrigerador, à temperatura de 4°C⁴². A utilização do derivado de celulose tem como vantagem dispensar a centrifugação de grandes volumes de material extraído⁴². Esse fator foi um dos principais responsáveis pela redução nos custos de produção, que também foi conseguida com a doação dos pulmões suínos pela iniciativa privada.

A preparação final do SB tem uma concentração de 25 mg de fosfolípides por ml. O principal fosfolípide presente é a fosfatidilcolina (76%

do total), da qual 30 a 35% apresentam-se na forma saturada, a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que é a fração dotada de propriedades tensoativas. Os demais fosfolípides presentes são: fosfatidiletanolamina (6 a 8%), fosfatidilinositol/serina (6%), fosfatidilglicerol (6%) e esfingomielina (4 a 6%)⁴².

O Surfactante Butantan, assim como todos os surfactantes naturais obtidos com utilização de solventes orgânicos, não contém as proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D. As proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C presentes no Surfactante Butantan correspondem a 5,6% da composição total⁴² e são fundamentais para sua ação.

Antes de se avaliarem a eficácia e a segurança do Surfactante Butantan no tratamento da SDR em ensaios clínicos fez-se necessária a realização de estudos pré-clínicos. A análise ultraestrutural do Surfactante Butantan comprovou *in vitro* as propriedades tensoativas de sua fração fosfolipídica⁴³. A eficácia do Surfactante Butantan já foi demonstrada em um modelo experimental (coelho) de SDR^{44, 45}.

Demonstrou-se também que sua administração a animais não está associada a fenômenos imunológicos adversos⁴⁶.

Diferentes modelos experimentais já foram utilizados a fim de reproduzir a imaturidade pulmonar da SDR, destacando-se os primatas, carneiros e coelhos^{47, 48, 49, 50}. O modelo do coelho prematuro apresenta diversas vantagens em relação aos demais: o tamanho do animal e o grande número de animais por ninhada facilitam a manipulação e reduzem os custos do experimento. Outro fator favorável é o tempo curto de gestação,

31 dias para gestação a termo, sendo a gestação de 27 dias correspondente a 32 semanas de gestação em humanos. O modelo do coelho prematuro tem sido utilizado tanto na avaliação da mecânica pulmonar em resposta à administração do surfactante exógeno^{51, 52, 53} quanto no estudo do metabolismo de seus componentes^{54, 55, 56}.

O coelho prematuro foi, portanto, o modelo experimental de imaturidade pulmonar escolhido para a análise do Surfactante Butantan no tratamento da SDR. Nos estudos comparativos^{44, 45}, os animais que receberam Surfactante Butantan apresentaram uma melhora nos parâmetros de mecânica ventilatória quando comparados aos não tratados. Além disso, os resultados obtidos com o surfactante Butantan foram semelhantes aos conseguidos com animais tratados com outro surfactante.

1.4.1. Estabilidade do Surfactante Butantan

O Surfactante Butantan, assim como todos os surfactantes exógenos de origem natural, deve ser mantido em refrigeração (de 2 a 8°C) e retirado apenas imediatamente antes de sua utilização, devendo então ser aquecido a 37°C por 5 minutos. A exposição do surfactante à temperatura ambiente (15 a 30°C), ou até a temperaturas maiores, ocasiona hidrólise dos fosfolípidos, em especial da fosfatidilcolina, com geração de ácidos graxos e lisolecitina, que comprometem a capacidade tensoativa da matriz lipídica^{57, 58, 59, 60, 61}. A perda de função do surfactante também se deve à degradação das apoproteínas SP-B e SP-C⁵⁷.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que todos os fármacos e medicamentos sensíveis a fatores ambientais (como luz, umidade e temperatura) sejam submetidos a estudos de estabilidade, com o objetivo de avaliar seu comportamento por influência de tais fatores⁶². De acordo com a Resolução RE nº 560, de 2 de abril de 2002 (D.O. 03/04/2002) da ANVISA, os estudos de estabilidade podem ser de dois tipos: os estudos de estabilidade acelerada e os de estabilidade de longa duração⁶².

Os estudos de estabilidade acelerada visam a aumentar a velocidade de degradação química e a alterar as características de uma substância, em condições forçadas de armazenamento, de tal forma que as reações de degradação possam ser monitoradas a fim de prever um prazo de validade da substância em condições normais de armazenamento⁶².

Já os estudos de estabilidade de longa duração são validações dos experimentos em relação às características do medicamento, executados durante e após o prazo de validade esperado. Devem ser realizados para estabelecer o período de vida útil do medicamento e confirmar o período projetado inicialmente, e ainda para definir as condições de armazenamento com base nos resultados⁶².

Dessa forma, a realização de ambos os tipos de estudo de estabilidade era obrigatória para encerrar as análises do Surfactante Butantan, antes que pudesse ser disponibilizado para utilização em ensaios clínicos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar, utilizando o modelo do coelho prematuro, a estabilidade do surfactante de origem porcina produzido pelo Instituto Butantan (SB), um ano após sua produção e armazenamento em refrigeração, de 2 a 8° C.

2.2. Específicos

Após o armazenamento do SB em refrigeração, de 2 a 8°C, durante um ano, e sua administração a coelhos prematuros, nos momentos zero, 24 horas, 30, 60, 90 e 180 dias depois de retirado do refrigerador:

- Avaliar seus efeitos sobre a mecânica ventilatória pulmonar;
- Avaliar seus efeitos sobre a aeração, ocorrência de atelectasia e hiperinsuflação pulmonar, por meio da determinação do Intercepto Linear Médio e do Índice de Distorção do parênquima pulmonar.

MÉTODOS

3. Métodos

Trata-se de um estudo experimental, realizado na Unidade de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de outubro de 2003 a março de 2004, que aliou características de ambos os tipos de estudo de estabilidade de produtos biológicos, isto é, de estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração.

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – projeto número 139/05) e obteve apoio financeiro da Fundação Butantan.

3.1. Momentos de avaliação do Surfactante Butantan

A escolha dos momentos de avaliação e das temperaturas de armazenamento do Surfactante Butantan para a realização deste estudo seguiu as diretrizes estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, em sua Resolução RE nº 560, de 03 de abril de 2002⁶².

De acordo com essa resolução, os estudos de estabilidade de longa duração devem ser realizados nas condições de armazenamento determinadas para o medicamento, ao final do período de vida útil definido

como provisório, visando a confirmar esse prazo de validade. Para a realização de testes de estabilidade acelerada, a Resolução da ANVISA recomenda a utilização de temperaturas no mínimo 15°C acima da temperatura de armazenamento, durante um período de seis meses (180 dias). Como o SB foi mantido armazenado por um ano em refrigeração de 2 a 8°C, definiram-se assim os seguintes momentos e temperaturas de análise:

- a) Momento zero: imediatamente após o SB ser retirado do refrigerador e aquecido a 37°C por 5 minutos. Esse momento atuou como estudo de estabilidade de longa duração, uma vez que foi realizado em condições normais de armazenamento, após o período de validade provisório de um ano;
- b) Momento 1: 24 horas após o SB ser retirado do refrigerador e mantido nesse período à temperatura ambiente de 24°C;
- c) Momento 2: 30 dias após o SB ser retirado do refrigerador e mantido nesse período à temperatura de 20°C, controlada por banho-maria;
- d) Momento 3: 60 dias após o SB ser retirado do refrigerador e mantido nesse período à temperatura de 20°C, controlada por banho-maria;
- e) Momento 4: 90 dias após o SB ser retirado do refrigerador e mantido nesse período à temperatura de 20°C, controlada por banho-maria;
- f) Momento 5: 180 dias após o SB ser retirado do refrigerador e mantido nesse período à temperatura de 20°C, controlada por banho-maria;

Os momentos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem, portanto, ao estudo de estabilidade acelerada.

3.2. Formação dos grupos de estudo

Em cada um dos momentos de avaliação, comparamos o Surfactante Butantan a um surfactante controle (Curosurf®). Foram constituídos, portanto, dois grupos de estudo, cada um composto por no mínimo 7 coelhos prematuros, e denominados “Grupo Butantan” e “Grupo Curosurf”, de acordo com o surfactante recebido.

3.3. Surfactante Butantan

O Surfactante Butantan (SB) utilizado neste estudo foi produzido em outubro de 2002 (lote 03/02 B), na concentração de 25 mg/ml. Após sua produção, foi mantido em refrigeração de 2 a 8°C durante um ano e disponibilizado para a realização do presente estudo ao final desse período de armazenamento. A dose do Surfactante Butantan administrada aos animais após o nascimento foi de 100 mg/kg.

3.4. Surfactante Curosurf®

O surfactante de origem porcina Curosurf® (Farmalab-Chiesi Farmaceutici, 1ml = 80mg) foi utilizado neste estudo como surfactante controle. Por esse motivo, o Curosurf® foi usado dentro de seu prazo de

validade, não tendo sido submetido a condições adversas de conservação. Antes de sua utilização, foi aquecido a 37°C por 5 minutos, e administrado aos animais após o nascimento, também na dose de 100 mg/kg.

3.5. Nascimento dos animais

Foram utilizadas coelhas prenhes da raça New-Zealand-White (Benjamin Fleder® Ltda., Mogi das Cruzes, SP) com idade gestacional conhecida por cruzamento realizado em datas programadas. Após a confirmação da prenhez, a data do cruzamento foi considerada dia zero da gestação, cuja duração completa na coelha é de 31 dias. Para a realização deste estudo, interrompeu-se a gestação com 27 dias.

Assim, no 27º dia de gestação, as coelhas prenhes foram sedadas com quetamina e acepromazina via intramuscular nas doses de 10 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente, procedendo-se à realização de raquianestesia com 2ml da solução de marcaína e lidocaína a 2% (volume 1:1). A coelha foi então posicionada em decúbito dorsal, com a cabeça elevada e os olhos vendados, recebendo oxigênio por máscara, para a retirada dos filhotes por parto cesáreo. Após a abertura da parede abdominal e do útero, os fetos foram removidos, um por um, a partir da extremidade distal de cada um dos cornos uterinos, secados e pesados.

Após o nascimento, cada animal foi colocado sobre colchão térmico e sob fonte de calor radiante, e sedado com 10 mg/kg de quetamina e 0,1

mg/kg de acepromazina por via intraperitoneal, procedendo-se à anestesia local na região cervical anterior com lidocaína a 2% e à traqueostomia com cânula de metal inoxidável (18GA). O surfactante designado foi instilado via intratraqueal, com o auxílio de um fino cateter passado pelo interior da cânula, e o coelho foi então ventilado manualmente por 5 vezes, utilizando-se um balão auto-inflável à FiO_2 de 100%.

3.6. Ventilação dos animais

Imediatamente após a administração do surfactante e da ventilação manual, o animal foi acoplado à ventilação mecânica (Inter 3[®] - Intermed, São Paulo), com parâmetros iniciais de: FiO_2 de 21%, frequência respiratória de 60 ciclos/ minuto, tempo inspiratório de 0,5s e tempo expiratório de 0,5s (relação inspiração: expiração de 1:1), pressão expiratória (PEEP) constante de 0 cmH_2O e pressão inspiratória (P_{insp}) necessária à obtenção de um volume-corrente alvo constante de 8 ml/kg, ajustado individualmente a cada 1-2 minutos. Esse volume-corrente foi escolhido por permitir uma ventilação alveolar adequada neste modelo animal⁵².

As medidas de pressão ventilatória e volume corrente foram obtidas com a utilização de um transdutor de pressão (Validyne[®]) e de um pneumotacógrafo (Hans Rudolph Inc.[®], Kansas City, Estados Unidos), conectados a um programa de computador específico para leitura e análise de dados (LabView Data Acquisition[®] 5.1, National Instruments).

No início da ventilação, foi administrado pancurônio intraperitoneal na dose de 0,1mg/kg. Os animais permaneceram em ventilação mecânica por um período de 15 minutos e, a cada intervalo de 5 minutos e ao final do período de ventilação, registramos a pressão ventilatória (PV), definida como a diferença entre as pressões inspiratória, a expiratória ($PV = P_{\text{insp}} - P_{\text{EEP}}$) e o volume-corrente, sendo calculada a complacência dinâmica (CD) pela fórmula:

$$CD = \frac{[\text{volume-corrente (mL)} \div \text{peso de nascimento (kg)}]}{\text{Pressão ventilatória (cmH}_2\text{O)}}$$

O primeiro animal removido de cada fêmea foi traqueostomizado e ventilado por 15 minutos, porém não recebeu nenhum dos dois surfactantes, a fim de ser utilizado como controle de maturidade pulmonar daquela ninhada. Caso esse primeiro animal necessitasse de pressão ventilatória muito semelhante à dos demais que receberam surfactante, consideraríamos a ninhada de excessiva maturidade pulmonar e a descartaríamos, a fim de evitar a interferência da maturidade espontânea nos resultados.

3.7. Curva pressão-volume pulmonar

Ao final do período de ventilação, os animais receberam pentobarbital sódico intraperitoneal na dose de 25 mg/kg para sedação profunda, e as cânulas traqueais foram obstruídas a fim de possibilitar a reabsorção de ar e, com isso, o colapso alveolar. Após 5 minutos de clampeamento da traquéia, os animais foram sacrificados com injeção intratecal de 0,5ml de lidocaína a 2% e foram conectados, por meio da cânula traqueal, a um sistema de coluna de água em “U” para medição dos volumes pulmonares e obtenção da curva pressão-volume. Os pulmões foram gradualmente insuflados de 0 a 30 cmH₂O, a intervalos de pressão de 5 cmH₂O, sendo o volume pulmonar medido 30 segundos depois da estabilização a cada intervalo. O mesmo procedimento foi realizado de forma decrescente a cada 5 cmH₂O, até a pressão final de 0 cmH₂O. Os volumes pulmonares foram corrigidos para a complacência do sistema e expressos em mL/kg de peso corpóreo.

3.8. Análise histopatológica pulmonar

Após a realização da curva pressão-volume, procedemos à retirada dos pulmões para o estudo histopatológico. Uma vez seccionada a aorta abdominal, os pulmões foram insuflados a uma pressão de 20 cmH₂O, que foi mantida por um minuto e a seguir reduzida até 10 cmH₂O, com o

posterior clampeamento da traquéia. Esse procedimento teve como finalidade reduzir o aporte excessivo de sangue aos pulmões e evitar o colapso total dos pulmões a pressões inferiores a 10 cmH₂O, o que poderia interferir na leitura das lâminas.

Depois de removidos do tórax, os pulmões foram imersos em solução de formol a 10% para fixação por um período mínimo de 24 horas, após o qual foram retirados cortes de 2mm de espessura proximais e distais do lobo inferior direito. Os cortes obtidos foram embebidos em parafina, para preparação das lâminas com cortes de 5µm e corados com hematoxilina-eosina.

A análise histopatológica foi realizada de maneira cega e por um único investigador. Com a utilização de um aumento de 400x e o auxílio de uma grade de área conhecida em uma das oculares, composta de 100 pontos e 50 retas, foram examinados 20 campos microscópicos por lâmina, para contagem dos cruzamentos das retas com as paredes alveolares. A partir do número de cruzamentos, obtivemos o Intercepto Linear Médio (Lm), de acordo com a fórmula⁶³:

$$Lm = \frac{\text{Comprimento total das retas}}{\text{Número de cruzamentos}}$$

No aumento de 400x, cada reta mede 25 μm , e o comprimento total das retas equivale a 1250 μm . O Lm corresponde à distância entre as paredes alveolares e representa, dessa forma, o tamanho dos alvéolos e o grau de insuflação pulmonar.

Para cada animal, obtivemos uma média do número de cruzamentos nos 20 campos lidos, com o respectivo desvio-padrão. Essa média foi utilizada no cálculo do Lm de cada animal. Para cada um dos grupos de estudo (Butantan e Curosurf), calculamos a média do Lm e o Índice de Distorção (ID), que é a média dos desvios-padrão do número de cruzamentos (Figura 4). O ID reflete a homogeneidade de insuflação do parênquima pulmonar, sendo utilizado para identificar áreas de atelectasia e hiperinsuflação, bem como a variação campo-a-campo do tamanho dos alvéolos⁶⁴.

Figura 3 - Determinação do Intercepto Linear Médio (Lm) e do Índice de Distorção (ID)

3.9. Análise Estatística

Visando a detectar uma diferença entre as médias de complacência dinâmica entre os grupos de estudo (Butantan e Curosurf), da ordem de 0,05 mL/kg.cmH₂O (15%) e assumindo um desvio-padrão da ordem de 0,03 mL/kg.cmH₂O⁶⁵, com alfa de 0,05 e um poder de teste de 80%, concluímos ser necessários pelo menos 7 animais por grupo de estudo, em cada um dos momentos de avaliação.

Os dados obtidos de mecânica ventilatória e análise histopatológica foram inseridos em um banco de dados criado com o auxílio do programa SigmaStat 2.01, utilizado para análise estatística dessas informações, em cada momento do estudo.

Para a comparação das médias de pressão ventilatória, complacência dinâmica, volumes pulmonares, Lm e ID entre ambos os grupos (Butantan e Curosurf), foi aplicado o teste t de Student, enquanto para os dados não paramétricos, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Em ambos os casos, foi adotado um nível de significância (α) de 0,05.

3.10. Desenho do estudo

Figura 4 - Desenho do estudo. SB: Surfactante Butantan; Lm: Intercepto Linear Médio; ID: Índice de Distorção

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Caracterização dos grupos de estudo

No período total de realização do estudo, utilizamos 28 coelhas prenhes, o que levou ao nascimento de 118 coelhos prematuros, dos quais 24 foram utilizados como controle de maturidade pulmonar. Quatro das fêmeas apresentaram ninhadas muito menores que as esperadas (2 filhotes por ninhada), não sendo possível utilizar um dos filhotes como controle. Os 94 coelhos prematuros restantes foram randomizados entre os dois grupos de estudo, de acordo com o surfactante recebido: grupo Butantan, com 47 coelhos prematuros, e grupo Curosurf, com 47 coelhos prematuros. Apesar de terem sido calculados inicialmente 7 animais por grupo de tratamento, devido ao grande número de filhotes da maioria das ninhadas, foi possível utilizar 8 coelhos por grupo em todos os momentos de estudo, com exceção do Momento 1 (24h após a retirada do SB do refrigerador).

Em relação ao peso de nascimento dos coelhos prematuros, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo: $29,9 \pm 2,6\text{g}$ e $29,9 \pm 2,9\text{g}$ (média $\pm$ DP) nos grupos Butantan e Curosurf, respectivamente.

4.2. Mecânica Ventilatória

Para cada um dos grupos de estudo (Butantan e Curosurf), em cada um dos seis momentos de avaliação, foram construídas as curvas relativas ao volume-corrente, à pressão ventilatória, à complacência dinâmica e à curva pressão-volume pulmonar, obtidas ao longo e ao final dos 15 minutos de ventilação mecânica. Na tabela 2, apresentamos os resultados de pressão ventilatória dos grupos de estudo, aos 5 minutos de ventilação, que demonstram a imaturidade pulmonar dos coelhos prematuros.

Tabela 2 - Pressão ventilatória (cmH₂O), aos 5 minutos de ventilação, dos grupos Butantan, Curosurf e Controle, em cada um dos momentos do estudo. Valores expressos em Média $\pm$ DP

	Butantan	Curosurf	Controle	p
Momento zero	14,54 $\pm$ 2,73	16,95 $\pm$ 3,77	20,03 $\pm$ 4,00	0,03
Momento 1 (24h)	16,73 $\pm$ 3,37	21,77 $\pm$ 5,10	21,05 $\pm$ 10,54	0,22
Momento 2 (30d)	19,25 $\pm$ 1,63	20,38 $\pm$ 3,83	25,30 $\pm$ 0,50	0,018
Momento 3 (60d)	21,31 $\pm$ 1,33	24,69 $\pm$ 3,76	30,85 $\pm$ 2,19	< 0,001
Momento 4 (90d)	18,96 $\pm$ 1,17	21,29 $\pm$ 4,36	25,15 $\pm$ 2,93	0,02
Momento 5 (180d)	19,78 $\pm$ 0,96	22,74 $\pm$ 2,12	26,93 $\pm$ 2,41	< 0,001

4.2.1. Mecânica Ventilatória no Momento Zero: imediatamente após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e aquecido à temperatura de 37° C por 5 minutos.

Utilizamos seis coelhas prenhes para a realização do experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média necessária para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $20,03 \pm 4,00$ cmH₂O, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 8), foi $14,54 \pm 2,73$ cmH₂O, e para os do grupo Curosurf (n = 8), foi $16,95 \pm 3,77$ cmH₂O (Tabela 2). Esses resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo que receberam surfactante e o grupo controle (p = 0,03), confirmando a imaturidade pulmonar dos animais. Ao compararmos os dois grupos de surfactante entre si, contudo, não observamos uma diferença estatisticamente significativa com relação à pressão ventilatória (Figura 5).

A complacência pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante, durante todo o período de ventilação (Figura 5).

A fase inspiratória da curva pressão-volume pulmonar foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante. A fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de surfactante, com exceção, porém, do volume pulmonar gerado com pressão de 20 cmH₂O. Nesse nível de pressão, o volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan foi superior ao do grupo de estudo Curosurf ($p=0,038$) (Figura 5).

Figura 5 - Momento zero - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e de pressão-volume pulmonar

4.2.2. Mecânica Ventilatória no Momento 1: 24 horas após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e mantido à temperatura ambiente a 24°C

Cinco fêmeas foram utilizadas no experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média (em cmH₂O) para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $21,05 \pm 10,54$, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 7), foi $16,73 \pm 3,37$, e para os do grupo Curosurf (n = 7), foi $21,77 \pm 5,10$ (p = 0,22, referente aos três grupos de estudo). Ao compararmos apenas os grupos Butantan e Curosurf entre si, constatamos que ambos foram semelhantes no 5º minuto de ventilação, com um valor de p=0,073. Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Butantan ($20,66 \pm 4,38$) e Curosurf ($15,96 \pm 2,72$) (p = 0,033) aos 10 minutos de ventilação mecânica e também aos 15 minutos ($20,19 \pm 4,02$ vs. $15,77 \pm 2,93$; p = 0,011) (Figura 6).

Em relação à complacência dinâmica (em ml/kg/cmH₂O), também se demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Butantan ($0,52 \pm 0,10$) e Curosurf ($0,39 \pm 0,12$) (p = 0,017) aos 10 minutos de ventilação mecânica e também aos 15 minutos ($0,53 \pm 0,11$ vs. $0,41 \pm 0,11$; p = 0,011) (Figura 6).

A fase inspiratória da curva pressão-volume pulmonar foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante. A fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de surfactante, com exceção, no entanto, do volume gerado com pressão de 5 cmH₂O. Nesse nível de pressão, o volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan foi inferior ao do grupo de estudo Curosurf ($p= 0,026$) (Figura 6).

Figura 6 - Momento 1 - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e de pressão-volume pulmonar

4.2.3. Mecânica Ventilatória no Momento 2: 30 dias após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e mantido à temperatura constante de 20°C.

Utilizamos seis coelhas prenhes para a realização do experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $25,30 \pm 0,50$ cmH₂O, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 8), foi $19,25 \pm 1,63$ cmH₂O, e para os do grupo Curosurf (n = 8) foi $20,38 \pm 3,83$ cmH₂O (Tabela 2). Esses resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo que receberam surfactante e o grupo controle (p = 0,018), confirmando a imaturidade pulmonar dos animais. Quando comparamos os dois grupos de surfactante entre si, contudo, não observamos uma diferença estatisticamente significativa com relação à pressão ventilatória (Figura 7).

A complacência pulmonar também foi semelhante entre os dois grupos de estudo que receberam surfactante, durante todo o período de ventilação (Figura 7).

A fase inspiratória da curva pressão-volume pulmonar foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante. A fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de surfactante, até a pressão de 15 cmH₂O. Nas pressões de 10 cmH₂O e 5 cmH₂O, o volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan foi inferior ao do grupo de estudo Curosurf ($p=0,009$ com 10 cmH₂O e $p < 0,001$ com 5 cmH₂O, respectivamente) (Figura 7).

Figura 7 - Momento 2 - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e de pressão-volume pulmonar

4.2.4. Mecânica Ventilatória no Momento 3: 60 dias após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e mantido à temperatura constante de 20°C.

Utilizamos quatro coelhas prenhes para a realização do experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média necessária para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $30,85 \pm 2,19$ cmH₂O, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 8), foi $21,31 \pm 1,33$ cmH₂O, e para os do grupo Curosurf (n = 8), foi $24,69 \pm 3,76$ cmH₂O (Tabela 2). Esses resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo que receberam surfactante e o grupo controle ($p < 0,001$), confirmando a imaturidade pulmonar dos animais. Ao compararmos os dois grupos de surfactante entre si, observamos que a pressão ventilatória do grupo Butantan com 5 minutos de ventilação foi menor que a do grupo Curosurf, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p = 0,028$). Porém, aos 10 e 15 minutos de ventilação, a pressão ventilatória foi semelhante nos grupos Butantan e Curosurf (Figura 8).

A complacência pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante, durante todo o período de ventilação (Figura 8).

A fase inspiratória da curva pressão-volume foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante até a pressão de 15 cmH₂O, e na pressão de 30 cmH₂O. Nas pressões de 20 e 25 cmH₂O, durante a fase inspiratória, o volume pulmonar encontrado no grupo Butantan foi inferior ao do grupo Curosurf ($p < 0,05$) (Figura 8). A fase expiratória da curva pressão-volume também foi semelhante nos dois grupos de surfactante, até a pressão de 20 cmH₂O. O volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan com a pressão de 15 cmH₂O foi inferior ao do grupo de estudo Curosurf ($p=0,037$), e também foi inferior com 10 cmH₂O ($p < 0,001$) e com 5 cmH₂O ($p < 0,001$) (Figura 8).

Figura 8 - Momento 3 - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e de pressão-volume pulmonar.

4.2.5. Mecânica Ventilatória no Momento 4: 90 dias após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e mantido à temperatura constante de 20°C.

Quatro coelhas prenhes foram utilizadas para a realização do experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média necessária para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $25,15 \pm 2,93$ cmH₂O, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 8), foi $18,96 \pm 1,17$ cmH₂O, e para os do grupo Curosurf (n = 8), foi $21,29 \pm 4,36$ cmH₂O (Tabela 2). Esses resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo que receberam surfactante e o grupo controle (p = 0,02), confirmando a imaturidade pulmonar dos animais. Quando comparamos os dois grupos de surfactante entre si, contudo, não observamos uma diferença estatisticamente significativa com relação à pressão ventilatória (Figura 9).

A complacência pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante, durante todo o período de ventilação (Figura 9).

A fase inspiratória da curva pressão-volume pulmonar foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante. A fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar também foi semelhante nos dois grupos de surfactante, até a pressão de 20 cmH₂O. O volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan com pressão de 15 cmH₂O foi inferior ao do grupo de estudo Curosurf ($p=0,042$), e também foi inferior com 10 cmH₂O ($p = 0,001$) e com 5 cmH₂O ($p = 0,007$) (Figura 9).

Figura 9 - Momento 4 - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e de pressão-volume pulmonar

4.2.6. Mecânica Ventilatória no Momento 5: 180 dias após o Surfactante Butantan ser retirado do refrigerador e mantido à temperatura constante de 20°C.

Utilizamos três coelhas prenhes para a realização do experimento. Ambos os grupos de estudo foram ventilados com volume corrente aproximado de 8 ml/kg, durante todo o experimento.

A pressão ventilatória média necessária para ventilar os coelhos prematuros controle, aos 5 minutos de ventilação mecânica, foi $26,93 \pm 2,41$ cmH₂O, para ventilar os coelhos prematuros do grupo Butantan (n = 8), foi $19,78 \pm 0,96$ cmH₂O, e para os do grupo Curosurf (n = 8), foi $22,74 \pm 2,12$ cmH₂O (Tabela 2). Esses resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo que receberam surfactante e o grupo controle ($p < 0,01$), confirmando a imaturidade pulmonar dos animais. Ao longo dos 15 minutos de ventilação, o grupo Curosurf necessitou de pressões ventilatórias sempre maiores que o grupo Butantan, com uma diferença estatisticamente significativa. (Figura 10).

A média da complacência dinâmica do grupo Butantan foi maior que a do grupo Curosurf no 5º ($p < 0,01$) e no 15º minuto ($p = 0,015$) de ventilação mecânica, porém não houve diferença significativa no 10º minuto (Figura 10).

A fase inspiratória da curva pressão-volume pulmonar foi semelhante nos dois grupos de estudo que receberam surfactante até a pressão de 20

cmH₂O e na pressão de 30 cmH₂O. Na pressão de 25 cmH₂O, durante a fase inspiratória, o volume pulmonar encontrado no grupo Butantan foi inferior ao do grupo Curosurf ($p=0,045$) (Figura 10). A fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar também foi semelhante nos grupos de estudo, nas pressões de 30, 25 e 15 cmH₂O. O volume pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan com a pressão de 20 cmH₂O foi inferior ao do grupo de estudo Curosurf ($p=0,025$), e também foi inferior com 10 cmH₂O ($p < 0,001$) e com 5 cmH₂O ($p < 0,001$) (Figura 10).

Figura 10 - Momento 5 - Curvas de volume corrente, pressão ventilatória, complacência dinâmica e pressão-volume pulmonar

4.3. Análise histopatológica

No grupo Butantan, realizamos a análise histopatológica dos pulmões de 42 dos 47 animais submetidos à ventilação mecânica. Cinco animais não puderam ser submetidos à análise histopatológica devido à fixação inadequada dos pulmões, o que comprometeu a qualidade das lâminas. No grupo Curosurf, realizamos a análise histopatológica dos pulmões de 43 animais. Quatro animais não puderam ser submetidos à análise histopatológica também por fixação inadequada dos pulmões.

A análise histopatológica constituiu-se na avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm) e do Índice de Distorção (ID) para ambos os grupos de surfactante, em cada um dos momentos do estudo.

Ao longo dos seis meses do estudo, o valor de Lm foi semelhante em ambos os grupos de surfactante, isto é, não houve diferença significativa no tamanho médio dos alvéolos dos animais após terem recebido SB ou Curosurf (Figura 11).

Figura 11 - Intercepto Linear Médio (Lm) dos grupos Butantan e Curosurf, nos seis momentos de avaliação (valores expressos em média $\pm$ DP; $p=0,05$)

Ao longo dos seis meses do estudo, o valor de ID também foi semelhante em ambos os grupos de surfactante, isto é, não houve diferença significativa no padrão de aeração alveolar. Observamos um grau de heterogeneidade de insuflação alveolar semelhante nos dois grupos (Figura 12).

Figura 12 - Índice de Distorção dos grupos Butantan e Curosurf nos seis momentos de avaliação (valores expressos em média $\pm$ DP; $p=0,05$).

Na Figura 13, podemos observar como exemplo o aspecto microscópico do pulmão dos coelhos prematuros, visto com aumento de 40x, no Momento 2 (30 dias após o SB ser retirado da refrigeração e aquecido a 20°C). Na Figura 13A, é possível notar que o pulmão do animal utilizado como controle (e que, portanto, não recebeu nenhum surfactante) apresenta uma menor aeração alveolar que os pulmões dos animais dos grupos Butantan e Curosurf,

Figura 13 – Aspecto microscópico do pulmão de coelhos prematuros (aumento 40x), no Momento 2 do estudo. A – animal do grupo controle (que não recebeu surfactante). B – animal do grupo Butantan. C – animal do grupo Curosurf

DISCUSSÃO

5. Discussão

O uso do surfactante exógeno no tratamento da SDR nos recém-nascidos tem sido prática freqüente nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal em diversos países. No entanto, devido a seu elevado custo, nem sempre o surfactante está disponível em todos os locais ou em quantidade suficiente, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

Com a finalidade de disponibilizar um surfactante exógeno eficaz e de custo reduzido para o Sistema Único de Saúde em todo o país, o Instituto Butantan, desenvolveu, com o Instituto de Química da Universidade de São Paulo e a iniciativa privada, uma tecnologia nacional para a obtenção de um surfactante de origem porcina. A doação dos pulmões suínos e a tecnologia empregada na extração desse surfactante foram os principais fatores que determinaram a redução nos custos de produção do medicamento.

A fim de que pudesse ser liberado para uso clínico, o surfactante de origem porcina produzido pelo Instituto Butantan teve de ser analisado quanto à sua composição⁴², propriedades tensoativas⁴², eficácia em modelo experimental de SDR^{44, 45} e propriedades imunogênicas⁴⁶. Uma vez comprovada a semelhança de sua composição bioquímica à do surfactante endógeno e à dos surfactantes exógenos comercialmente disponíveis⁴² e demonstrada sua eficácia em modelo experimental de SDR (coelhos)^{44, 45} e também a ausência de fenômenos imunológicos adversos⁴⁶ associados ao seu uso, fez-se necessário o estudo de estabilidade do Surfactante Butantan, após um ano de armazenamento em refrigeração de 2 a 8°C.

O modelo experimental (coelho) de SDR foi utilizado para a realização do estudo de estabilidade na Unidade de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da FMUSP. A Resolução RE nº 560 da ANVISA foi utilizada como referência teórica para a determinação dos momentos de estudo⁶². De acordo com essa Resolução, os estudos de estabilidade de novos medicamentos podem ser de dois tipos: estabilidade acelerada ou estabilidade de longa duração. O presente estudo avaliou conjuntamente os dois tipos de estabilidade e foi fundamental para a confirmação do prazo de validade do Surfactante Butantan.

Os surfactantes exógenos de origem natural comercialmente disponíveis têm um prazo de validade previsto de um ano. O Surfactante Butantan, neste estudo, demonstrou ser tão eficaz quanto o surfactante controle utilizado, um ano após ter sido produzido e armazenado a 2 a 8°C, em relação tanto à mecânica ventilatória quanto à análise histopatológica. Esses resultados confirmam, portanto, que o prazo de validade do Surfactante Butantan deve ser de um ano.

Depois de avaliarmos o Surfactante Butantan no momento zero, demos início ao estudo de estabilidade acelerada. Para a realização desse tipo de análise, foi necessário manter o Surfactante Butantan em temperaturas adversas de armazenamento por um período de seis meses, com o intuito de provocar a degradação de seus componentes^{57, 62}.

A escolha da temperatura de 24°C no Momento 1 de avaliação seguiu a recomendação da ANVISA⁶² para a realização deste tipo de estudo, ou seja, o surfactante deveria ser submetido a uma nova temperatura no mínimo

15°C acima daquela de armazenamento inicial – no caso, de 2 a 8°C. A temperatura de 20°C utilizada nos demais momentos do estudo foi escolhida por estar dentro da faixa de temperatura ambiente (15 a 30°C) definida pela ANVISA e também por representar uma média anual na cidade de São Paulo, local onde foi realizada esta investigação.

Os resultados obtidos no Momento 1 (24 horas aquecido a 24°C) merecem uma análise mais criteriosa no que se refere à mecânica ventilatória. Os animais que receberam o Surfactante Butantan nesse momento apresentaram uma complacência maior que a dos animais do grupo Curosurf e necessitaram de pressões ventilatórias menores, quando o esperado era o oposto, em virtude das condições inadequadas de armazenamento do SB. No Momento 1, também se constatou que não houve diferença significativa na pressão ventilatória aos 5 minutos de ventilação mecânica entre o grupo de estudo controle e os grupos de estudo que receberam surfactante, sugerindo que os coelhos prematuros estudados talvez apresentassem uma maturidade pulmonar mais avançada do que a esperada.

Embora tais resultados tenham sido observados, notamos que o volume pulmonar encontrado no grupo Butantan, na fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar, foi sempre inferior ao encontrado no grupo Curosurf, havendo, contudo, uma diferença significativa apenas com a pressão de 5 cmH₂O.

A partir do Momento 2 de experimentação e até o Momento 5, observamos na curva pressão-volume pulmonar uma diminuição do volume

pulmonar encontrado no grupo de estudo Butantan, quando comparado ao volume pulmonar encontrado no grupo Curosurf, principalmente na fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar, e com diferenças significativas em determinados níveis de pressão. No decorrer dos diversos momentos de experimentação, essa diferença de volume pulmonar encontrada entre os dois grupos de estudo passou a ser significativa com níveis cada vez maiores de pressão, durante a fase expiratória. Ou seja, com níveis cada mais elevados de pressão, o volume pulmonar encontrado no grupo Butantan foi menor.

Ao considerarmos tais resultados, precisamos lembrar que os fosfolípidos do surfactante atuam por dois mecanismos para facilitar a expansão pulmonar. Ao reduzirem a tensão superficial da interface ar-líquido, os fosfolípidos diminuem a resistência à aeração nas vias aéreas terminais e nos alvéolos e, por consequência, também diminuem a pressão necessária para sua expansão inicial (pressão crítica de abertura). Além disso, a camada fosfolipídica estável formada na interface previne o colapso alveolar ao final da expiração⁵⁰. Os resultados deste estudo mostram, portanto, uma tendência ao colapso alveolar ao final da fase expiratória da curva pressão-volume pulmonar com o Surfactante Butantan. Sugerem ainda que, em decorrência das condições adversas de armazenamento ao qual foi submetido, o SB foi perdendo sua capacidade de reduzir a tensão superficial alveolar na fase expiratória, embora tenha preservado sua atividade facilitadora de abertura alveolar.

Muito embora a curva pressão-volume pulmonar do Momento 2 até o Momento 5 já sugerisse uma redução da atividade do Surfactante Butantan, foi somente no Momento 5 que observamos também uma diferença significativa na complacência pulmonar entre os grupos de estudo Butantan e Curosurf.

Devemos fazer algumas considerações quanto aos parâmetros ventilatórios utilizados na realização deste estudo, mais especificamente em relação ao uso de pressão expiratória final positiva (PEEP) de zero. Tal abordagem teve por objetivo retirar a influência da PEEP sobre a mecânica pulmonar. O uso de PEEP na ventilação mecânica pode compensar a perda de função do surfactante, pois mantém os alvéolos permanentemente abertos, facilitando assim sua expansão⁶⁶. Os primeiros surfactantes sintéticos, que continham apenas fosfolípides, eram dependentes da utilização de PEEP para promover uma melhora da complacência pulmonar^{67, 68}.

Quando se observam os resultados da análise histopatológica pulmonar, pode-se notar que, ao longo do estudo, os animais tratados com Surfactante Butantan apresentaram um tamanho alveolar médio (determinado pelo Lm) e uma heterogeneidade do padrão de aeração pulmonar (determinada pelo Índice de Distorção) semelhantes aos dos animais tratados com Curosurf. Tendo em vista os resultados obtidos na análise da mecânica ventilatória, seria esperada uma diferença significativa entre os dois grupos de surfactante em relação a ambos os parâmetros histopatológicos pulmonares no decorrer do estudo. A ausência dessa

diferença poderia sugerir, nesse caso, alguma interferência decorrente do modo de fixação dos pulmões para análise.

Antes de serem retirados para fixação em formol, os pulmões dos coelhos prematuros foram insuflados a 20 cmH₂O, e a traquéia foi clampeada após um período de estabilização a 10 cmH₂O. A utilização desse procedimento teve por objetivo impedir que o próprio esvaziamento total (até 0 cmH₂O) levasse ao colapso alveolar. Por outro lado, sabemos também que o uso de pressão positiva quando se fixam os pulmões não diminui o colapso alveolar. Pulmões prematuros com deficiência de surfactante apresentam colapso *post-mortem* mesmo se fixados com pressão positiva, e os alvéolos que contêm surfactante permanecem abertos mesmo com a imersão em formol para fixação⁶⁹. Portanto, consideramos que o modo de fixação pulmonar não foi responsável pelos achados histopatológicos do estudo, e especulamos se os resultados encontrados não estariam associados ao fato de a função do Surfactante Butantan ter sido parcialmente preservada, mesmo depois de ele ter sido submetido a condições adversas de armazenamento. Ou seja, a degradação dos componentes do surfactante não foi total e, portanto, não impediu o SB de facilitar a expansão alveolar e de manter parte dos alvéolos aberta. Talvez com a degradação completa dos componentes do Surfactante Butantan, pudéssemos encontrar uma diferença significativa entre os dois grupos de estudo quanto ao tamanho alveolar médio (Lm) e à heterogeneidade de aeração pulmonar (ID).

Além disso, é preciso lembrar que o tempo curto de ventilação mecânica utilizado (15 minutos) e o curto período em que os animais foram mantidos vivos podem ter sido responsáveis pela ausência de diferença significativa na análise histopatológica dos grupos de estudo.

Finalmente, consideramos ter sido adequada a escolha do modelo experimental do coelho prematuro para a realização deste estudo. O coelho prematuro já foi utilizado como modelo experimental da SDR para estudar diversos aspectos desta patologia, como estratégias ventilatórias, tipos de surfactante utilizado e seus efeitos na função pulmonar^{67, 69, 70}. O presente estudo demonstrou que esse modelo animal também é factível para avaliações de estabilidade das preparações de surfactante exógeno.

5.1. Considerações finais

A utilização do surfactante exógeno no tratamento da SDR neonatal tem determinado uma redução significativa na mortalidade dos recém-nascidos prematuros nos últimos anos, o que torna obrigatória a disponibilidade do surfactante exógeno em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. No entanto, sabemos que o alto custo associado a esse medicamento tem limitado seu uso e até mesmo inviabilizado sua aquisição por algumas instituições hospitalares, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

O Instituto Butantan, tendo como referência a realidade brasileira, produziu um surfactante de origem porcina com o objetivo final de disponibilizá-lo para o Sistema Único de Saúde, podendo dessa forma contribuir com a redução da mortalidade neonatal no Brasil. Embora o preço final desse surfactante ainda não esteja definido, foi estimado em menos de US\$150, quantia consideravelmente inferior ao preço de importação do medicamento, que é de aproximadamente US\$500.

A realização deste estudo é um dos exemplos dos benefícios alcançados pelo estabelecimento de uma parceria entre a Divisão de Biotecnologia do Instituto Butantan e o Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- As propriedades bioquímicas do Surfactante Butantan foram preservadas após um ano de sua produção e armazenamento em refrigeração de 2 a 8°C.
- Condições inadequadas de armazenamento do Surfactante Butantan resultam em alterações das suas propriedades bioquímicas e, portanto, da sua função, tendo como consequência a redução do volume pulmonar durante a fase expiratória da curva de pressão-volume.
- As alterações das propriedades bioquímicas e, portanto, da função do Surfactante Butantan ocasionadas pelas condições inadequadas de armazenamento foram demonstradas por parâmetros de mecânica ventilatória, e não pela análise histopatológica dos pulmões.

REFERÊNCIAS

7. Referências

1. Whitsett JÁ, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Acute Respiratory Disorders. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, editors. *Neonatology: pathophysiology management of the newborn*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1999. p. 485-508.
2. Parmigiani S, Solari E. The era of pulmonary surfactant from Laplace to nowadays. *Acta Biomedica*. 2003;74:69-75.
3. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelcetasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child*. 1959;97:517-23.
4. Avery ME. Surfactant deficiency in hyaline membrane disease: the story of discovery. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1074-5.
5. Ikegami M, Jobe AH. Surfactant metabolism. *Semin Perinatol*. 1993;17:233-40.
6. Kallapur S, Ikegami M. The surfactants. *Am J Perinatol*. 2000;17:335-43.
7. Johansson J, Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem*. 1997;244:675-93.
8. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 2003;349:2527-39.
9. Baudouin SV. Exogenous surfactant replacement in ARDS – one day, someday or never? *N Engl J Med*. 2004;351:853-5.
10. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*. 2002;347:2141-8.

11. Ainsworth SB, Milligan DWA. Surfactant therapy for respiratory distress syndrome in premature neonates: a comparative review. *Am J Respir Med*. 2002;1:417-33.
12. Yukitake K, Brown CL, Schlueter MA, 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.
13. Frerking I, Günther A, Seeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med*. 2001;27:1699-1717.
14. Ghodrat M. Lung surfactants. *Am J Health-Syst Pharm*. 2006;63:1504-21.
15. Jobe AH. Drug therapy: pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med*. 1993;328:861-8.
16. Enhorning G, Robertson B. Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics*. 1972;50:55-66.
17. 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.
18. Fujiwara T, Chida S, Watabe Y, Maeta H, Morita T, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet*. 1980; I:55-9.
19. Schwartz RM, Luby AM, Scanlon JW, Kellogg RJ. Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500g. *N Engl J Med*. 1994;330:1476-80.

20. Collaborative European Multicenter Study Group. Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: an international randomized clinical trial. *Pediatrics*. 1988;82:683-91.
21. Soll RF, Hoekstra RE, Fangman JJ, Corbet AJ, Adams JM, James LS, Schulze K, Oh W, Roberts Jr. JD, Dorst JP, Kramer SS, Gold AJ, Zola EM, Horbar JD, McAuliffe TL, Lucey JF. Multicenter trial of single-dose modified bovine surfactant extract (Survanta) for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1990;85:1092-102.
22. Horbar JD, Soll Rf, Sutherland JM, Kotagal U, Philip AGS, Kessler DL, Little GA, Edwards WH, Vidyasagar D, Raju TNK, Jobe AH, Machiko I, Mullett MD, Myerberg DZ, McAuliffe TL, Lucey J. A multicenter randomized, placebo-controlled trial of surfactant therapy for respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1989;320:959-65.
23. Horbar JD, Wright EC, Onstad L. Decreasing mortality associated with the introduction of surfactant therapy: an observational study of neonates weighing 601 to 1300 grams at birth. *Pediatrics*. 1993;92:191-6.
24. Long W, Thompson T, Sundell H, Schumacher R, Volberg F, Gunthrie R. Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome: the American Exosurf Neonatal Study Group I. *J Pediatr*. 1991;118:595-605.
25. Rossello JD, Hayward PE, Martell M, Del Barco M, Margotto P, Grandzoto J, Bastida J, Peña J, Villanueva D. Hyaline membrane disease (HMD) therapy in Latin America: impact of exogenous surfactant

- administration on newborn survival, morbidity and use of resources. *J Perinat Med.* 1997;25:280-287.
26. Flores G, Padilla ML, Barrera E. Ensayo clínico con un surfactante artificial en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria neonatal. *Perinatal Reprod Hum.* 1995;9; 149.
27. Rocha C, Correa L, Jacomo AD. Letalidade e complicações no tratamento da doença de membrana hialina em unidade de terapia intensiva neonatal. *J Pediatría.* 1991;67:366.
28. Charatan F. Surfactant trial in Latin American infants criticized [editorial]. *BMJ.* 2000;321:913.
29. Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Saugstad D, Simeoni U, Speer CP, Valls-i-Soler A, Halliday H. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med.* 2007;35:175-86.
30. Suresh GK, Soll RF. Current surfactant use in premature infants. *Clin Perinat.* 2001;28:671-94.
31. Bloom BT, Kattwinkel J, Hall RT, Delmore PM, Egan EA, Trout JR, Malloy MH, Brown DR, Holzman IR, Coghill CH, Carlo WA, Pramanik AK, McCaffree MA, Toubas PL, Laudert S, Gratny LL, Weatherstone KB, Seguin JH, Willett LD, Gutcher GR, Mueller DH, Topper WH. Comparison of Infasurf (calf lung surfactant extract) to Survanta (beractant) in the treatment and prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics.* 1997;100:31-8.

32. Taeusch HW, Keough KMW, Williams M, Slavin R, Steele E, Lee AS, Phelps D, Kariel N, Floros J, Avery ME. Characterization of bovine surfactant for infants with respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1986;77:572-81.
33. Soll RF, Blanco F. *Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome (Cochrane Review)*. Cochrane Library. 2008; issue 2. Available from: <http://cochrane.bvsalud.org/portal/php/index.php>.
34. Merritt TA, Strayer DS, Hallman M, Spragg RD, Wozniak P. Immunologic consequences of exogenous surfactant administration. *Semin Perinatol*. 1988;12:221-30.
35. Strayer DS, Hallman M, Merritt TA. Immunogenicity of surfactant: II. porcine and bovine surfactants. *Clin Exp Immunol*. 1991;83:41-6.
36. Whitsett JA, Hull WM, Luse S. Failure to detect surfactant protein-specific antibodies in sera of premature infants treated with Survanta, a modified bovine surfactant. *Pediatrics*. 1991;81:505-10.
37. Chida S, Phelps DS, Soll RF, Taeusch HW. Surfactant proteins and anti-surfactant antibodies in sera from infants with respiratory distress syndrome with and without surfactant treatment. *Pediatrics*. 1991;88:84-9.
38. Cochrane CG, Revak SD. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science*. 1991;254:566-8.
39. Cochrane CG. Surfactant protein B and mimic peptides in the function of pulmonary surfactant. *FEBS Lett* 1998;430:424.

40. Moya FR, Gadzinowski J, Bancalari E, Salinas V, Kopelman B, Bancalari A, Kornacka MK, Merritt TA, Segal R, Schaber CJ, Tsai H, Massaro J, D'Agostino R, International Surfaxin Collaborative Study Group. A multicenter, randomized, masked, comparison trial of lucinactant, cosfoceril palmitate, and beractant for the prevention of respiratory distress syndrome among very preterm infants. *Pediatrics*. 2005;115:1018-29.
41. Sinha SK, Lacaze-Masmonteil T, Valls i Soler A, Wiswell TE, Gadzinowski J, Hadju J, Bernstein G, Sanchez-Luna M, Segal R, Schaber CJ, Tsai H, Massaro J, D'Agostino R, Surfaxin Therapy Against Respiratory Distress Syndrome Collaborative Group. A multicenter, randomized, controlled trial of lucinactant versus poractant alfa among very premature infants at high risk for respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 2005;115:1030-8.
42. Kubrusly FS, Netto SL, Iourtov D, Raw I, Araújo, PS. A natural surfactant from pig lungs. *Biotechnol Lett*. 2000;22:1251-53.
43. Cianciarullo AM, Leme E, Beçak W, Raw I, Kubrusly FS. Ultrastructural chemical reaction to detect saturated phospholipids of a natural surfactant from pig lungs. *Biotechnol Lett*. 2001;23:1293-6
44. Arcas RM, Chang CY, Proença RSM, Reyes AMA Lyra JC, Gibelli MABC, Vaz FAC, Okay Y, Rebello CM. In vivo testing of a new low-cost surfactant compared to Survanta using the preterm rabbit model: lung mechanics and morphometric analysis. *Pediatr Res*. 2000;47:386A.

- 45.Chang CY, Proença RSM, Arcas RM, Lyra JC, Andrade AMR Gibelli MABC, Okay Y, Vaz FAC, Rebello CM. Evaluation of the effectiveness of a new animal origin surfactant using the premature rabbit model. *Perinatology*. 2001;1105-10.
- 46.Precioso AR, Mascaretti RS, Kubrusly FS, Gebara VC, Raw I, Rebello CM. Analysis of the immunogenicity of a new porcine lung surfactant using the rabbit model. *Pediatr Res*. 2003;53:2465.
- 47.Enhorning G, Hill D, Sher-wood G, Cutz E, Robertson B, Bryan C. Improved ventilation of prematurely delivered primates following tracheal deposition of surfactant.. *Am J Obstet Gynecol..* 1978;132:529-36.
- 48.Adams FH, Towers B, Osher AB, Ikegami M, Fujiwara T, Nozaki M. Effects of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs: I. clinical and autopsy findings. *Pediatr Res*. 1978;12:841-8.
- 49.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;14:2082-5.
- 50.Lachmann B, Berggren P, Curstedt T, Grossmann G, Robertson B. Combined effects of surfactant substitution and prolongation of inspiration phase in artificially ventilated premature newborn rabbits. *Pediatr Res*. 1982;16:921-7.
- 51.Robertson B, Lachmann B. Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Experim Lung Res*. 1988;14:279-310.

52. Sun B, Kobayashi T, Curstedt T, Grossmann G, Robertson B. Application of a new ventilator-multi-pletismograph system for testing efficacy of surfactant replacement in newborn rabbits. *Eur Respir J.* 1991;4:364-70.
53. Metcalfe IL, Pototschnik R, Burgoyne R, Enhorning G. Lung expansion and survival in rabbit neonates treated with surfactant extract. *J Appl Physiol.* 1982;53:838-43.
54. Henry M, Ikegami M, Ueda T, Jobe AH. Surfactant protein B metabolism in newborn rabbits. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1300:97-102.
55. Tanaka Y, Talei T, Kanazawa. Lung surfactants: effects of fatty acids, triacylglycerols and protein on the activity of lung surfactant. *Chem Pharm Bul.* 1983;31:4100-9.
56. Ueda T, Ikegami M, Jobe AH. Clearance of surfactante proteína A from rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:89-94.
57. Krill SL, Harn J, Hahn KR, Gupta SL. Activity loss on room temperature storage of Survanta, a bovine lung based surfactant. *Int J Pharm.* 1996;132:89-94.
58. Kensil CR, Dennis EA. Alkaline hydrolusis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry.* 1981;20:6079-85.
59. Grit M, De Smidt JH, Struijke A, Crommelin DJA. Hydrolysis of phosphatidilcholine in aqueous liposome dispersions. *Int J Pharm.* 1989;50:1-6.
60. Grit M, Crommelin DJA. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chem Phys Lipids.* 1992;62:113-22.

61. Grit M, Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids*. 1993;64:3-18.
62. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 560, de 2 de abril de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 2002 03 abr.
63. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax*. 1962;17:320-8.
64. 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 da Universidade de São Paulo; 2003.
65. Chia CY. *Avaliação da função de um novo surfactante de origem porcina obtido da extração orgânica acoplada à adsorção em derivado de celulose* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.
66. Kobayashi T, Kataoka H, Ueda T, Murakami S, Takada Y, Kokubo M. Effects of surfactant supplement and end-expiratory pressure in lung-lavaged rabbits. *J Appl Physiol*. 1984;57:995-1001.
67. Rider ED, Ikegami M, Whitsett JA, Hull HW, Absolom D, Jobe AH. Treatment responses to surfactant containing natural surfactant proteins in preterm rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:669-76.
68. Ogawa A, Brown CL, Schlueter AM, Benson BJ, Clements JA, Hawgood S. Lung function, surfactant apoprotein content, and level of PEEP in prematurely delivered rabbits. *J Appl Physiol*. 1994;4:1840-9.

69. Lachmann B, Tischer A-M, Grossmann G, Robertson B. Lung compliance and alveolar expansion in the artificially ventilated premature newborn rabbit after maternal treatment with ambroxol. *Respiration*. 1981;42:209.
70. Davis AJ, Jobe AH, Häfner D, Ikegami M. Lung function in premature lambs and rabbits treated with a recombinant SP-C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:553-9.