

João Cesar Lyra

**Efeitos da adição de polietilenoglicol ao surfactante exógeno no tratamento da
síndrome de aspiração de mecônio em coelhos
recém-nascidos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências
Área de concentração: Pediatria

SÃO PAULO
2006

Dedico essa tese ...

... à Sílvia, minha mulher, pelo amor, paciência e amizade. O

resumo de tudo que alguém pode sonhar pra ser feliz.

... aos meus filhos, Luisa e Gabriel, por quem eu vivo e respiro.

O real sentido de nossas vidas.

... ao meu pai, pelo carinho e atenção e por fazer parte de nossas

vidas de maneira tão especial.

... às minhas irmãs que eu amo, Célia, Estela e Lílian, pelo apoio

e torcida constantes.

Essa tese é especialmente dedicada a uma mulher forte e determinada, que fez toda a diferença em minha vida. Nada teria sido possível se não fosse seu amor incondicional.

A despeito de sua partida, sua presença é constante, seus ensinamentos permanecem e seu amor se perpetua.

Eu divido com você, mãe, esse momento e posso sentir sua alegria em participar de mais uma etapa vencida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Flávio Adolfo Costa Vaz, pela orientação dessa tese, pelas valiosas sugestões e pelo estímulo e dedicação à pesquisa científica.

Ao Dr. Celso de Moura Rebello, pelo apoio e amizade. Seus conhecimentos deram origem à idéia inicial e sua determinação tornou possível a execução desse projeto.

À Dra. Lígia Maria Suppo de Souza Rugolo, pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar. Seu entusiasmo e competência profissional contagiam e são exemplos.

A todos os membros da equipe da Unidade de Pesquisa Experimental (Celso, Renata, Alex, Luciana e Marcelo), pela amizade e participação efetiva na execução desse trabalho.

À equipe da Unidade Neonatal do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial aos meus queridos amigos: Maria Regina, Saskia, Léia, Grasiela, Karina, Geraldo e Adriana, que me apoiaram e me garantiram as condições práticas para as viagens, cursos e elaboração da tese.

À Dra. Maria Regina Bentlin, pela amizade e constante estímulo para meu crescimento profissional.

À equipe de pesquisadores do Instituto Butantan, em especial ao Prof. Isaias Raw e Profa. Flávia Kubrusly, pela produção e fornecimento do surfactante utilizado nesse estudo e pelo apoio aos profissionais do laboratório de pesquisa.

À Dra. Marisa Dolhnikoff pela ajuda prestada na escolha dos métodos de análise morfológica e na interpretação dos resultados da histologia.

Ao Professor Antonio Claret Lyra, meu pai, pela correção ortográfica do texto.

À minha família, pelo suporte emocional, fundamental para superar as dificuldades.

A Deus, por guiar essa jornada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O sistema surfactante	03
1.2. Mecanismo de inibição do surfactante	06
1.2.1. Modelo experimental de aspiração de mecônio para estudo da inativação do surfactante	09
1.3. Terapia de reposição com surfactante exógeno na síndrome de aspiração de mecônio	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local do trabalho	19
3.2. Preparo do mecônio	19

3.3. Preparo do surfactante	20
3.3.1. Adição de polietilenoglicol ao surfactante porcino.....	21
3.4. Animais de experimentação	21
3.4.1. Nascimento e início da ventilação	21
3.4.2. Randomização	23
3.4.3. Ventilação e coleta de dados de mecânica pulmonar	24
3.4.4. Sacrifício e manipulação dos pulmões	24
3.5. Histopatologia	28
3.6. Análise estatística	30
4. RESULTADOS	32
4.1. Mecânica respiratória	34
4.2. Histopatologia	37
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Considerações finais	67
6. CONCLUSÕES	70
7. ANEXOS	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ventilação mecânica e sistema de aquisição de dados	26
Figura 2	Visualização dos dados na tela do computador	26
Figura 3a	Fotografia de um pulmão normal	27
Figura 3b	Fotografia de um pulmão com SAM	27
Figura 4	Grade de leitura para contagem do número de interceptos	29
Figura 5	Desenho do estudo	31
Figura 6	Diagrama de formação dos grupos de estudo	38
Figura 7	Gráfico dos valores de volume-corrente	39
Figura 8	Gráfico dos valores de complacência pulmonar dinâmica	40
Figura 9	Gráfico dos valores de pressão ventilatória	41
Figura 10	Gráfico dos valores da curva P-V	42
Figura 11a	Fotografia de lâmina representativa de um pulmão normal	43
Figura 11b	Fotografia de lâmina representativa do grupo MEC	43
Figura 12	Fotografias de lâminas representativas dos grupos S100 e PEG	44
Figura 13	Gráfico dos valores de Lm e índice de distorção	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μg	micrograma
μm	micrômetro
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	complacência dinâmica
cm	centímetro
CO ₂	gás carbônico
curva P-V	curva pressão-volume pulmonar
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
Dra.	doutora
ECMO	oxigenação extracorpórea por membrana
ed.	edição
et al.	e outros
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
FL	fosfolípido
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR	frequência respiratória
g	grama
GA	grandes agregados

HE	hematoxilina-eosina
I:E	relação inspiração/expiração
ID	índice de distorção
kDa	quilodáltons
kg	quilograma
Lm	diâmetro alveolar médio
m	metro
MEC	grupo de animais com aspiração de mecônio sem tratamento com surfactante
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
N	nanômetro
n	número
O ₂	oxigênio
°C	graus Celsius
p.	página
PA	pequenos agregados
PaCO ₂	pressão parcial arterial de gás carbônico
PaO ₂	pressão parcial arterial de oxigênio
PEEP	pressão positiva no final da expiração
PEG	polietilenoglicol

PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidil-inositol
PIP	pico de pressão inspiratória
Profa.	professora
PV	pressão ventilatória
relação I:E	relação inspiratória e expiratória
RN	recém-nascido
S100	grupo de animais com aspiração de mecônio tratados com 100 mg/kg de surfactante
SAM	síndrome de aspiração de mecônio
SDR	síndrome do desconforto respiratório
SDRA	síndrome da angústia respiratória do tipo agudo
SE	surfactante exógeno
SP-A	proteína A do surfactante
SP-B	proteína B do surfactante
SP-C	proteína C do surfactante
SP-D	proteína D do surfactante
TS	tensão superficial
VC	volume-corrente
VM	ventilação mecânica
vol	volume

RESUMO

LYRA JC. *Efeitos da adição de polietilenoglicol ao surfactante exógeno no tratamento da síndrome de aspiração de mecônio em coelhos recém-nascidos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 94p.

O mecônio é um potente inativador da função do surfactante pulmonar, porém a reposição de surfactante exógeno para tratamento da síndrome de aspiração de mecônio em recém-nascidos tem efeito limitado e não diminui a mortalidade. Estudos mostram que a adição de polímeros como o polietilenoglicol (PEG) ao surfactante melhora sua atividade “in vitro” mantendo baixa tensão superficial. No presente estudo, avaliamos os efeitos da adição de PEG ao surfactante exógeno sobre a mecânica pulmonar e sobre a regularidade da expansão do parênquima pulmonar em coelhos recém-nascidos. Coelhos da raça New-Zealand-White, nascidos de parto cesáreo aos 30 dias de gestação, foram submetidos a traqueostomia e randomizados em 3 grupos de estudo de acordo com o tipo de tratamento administrado no décimo minuto de ventilação: grupo com aspiração de mecônio, sem tratamento com surfactante exógeno (MEC); grupo com aspiração de mecônio e tratamento com surfactante -100 mg/kg (S100); e grupo com aspiração de mecônio e tratamento com surfactante - 100 mg/kg adicionado de PEG -5% / 15 kDa (PEG). Mecônio humano foi administrado via traqueostomia na dose de 6 ml/kg e

concentração de 65 mg/ml. Os animais dos três grupos foram submetidos à ventilação mecânica com pressão positiva no final da expiração de 3 cmH₂O; frequência respiratória de 60 incursões por minuto, fração inspiratória de O₂ de 1,0 e pico de pressão inspiratória necessário para se manter volume-corrente fixo de 8 ml/kg. Os valores de complacência dinâmica, pressão ventilatória e volume-corrente foram obtidos a cada 5 minutos até o sacrifício com 20 minutos, com auxílio de um transdutor de pressão associado a um pneumotacógrafo, sendo analisados por um “software” específico. O surfactante foi produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Após a ventilação, foi realizada a curva pressão-volume e os pulmões foram fixados com formalina a 10%. A análise histológica foi feita calculando o diâmetro alveolar médio (Lm) e o índice de distorção através do desvio padrão do Lm. Análise estatística foi feita pela ANOVA One Way, com nível de significância de 0,05. Após 20 minutos de ventilação, os valores de complacência dinâmica (ml/cm H₂O.kg) foram: 0,44±0,05 (MEC*); 0,68±0,12 (S100) e 0,59± 0,05 (PEG) e de pressão ventilatória (cm H₂O): 18,40±2,02 (MEC*); 11,84±1,82 (S100) e 13,60±1,39 (PEG). Ambos os grupos tratados apresentaram padrão de expansão do parênquima mais homogêneo em relação aos animais não tratados: índice de distorção de 18,53±4,71 (MEC*); 8,41±2,35 (S100) e 11,73±4,28 (PEG) (**p* < 0,05 vs outros grupos). Concluimos que os animais tratados com surfactante mostraram melhora significativa da mecânica pulmonar, com melhora da complacência pulmonar, menores valores de pressão ventilatória necessários para se manter o volume-corrente pré-estabelecido, maior volume pulmonar máximo e maior homogeneidade do padrão de expansão pulmonar, comparados ao grupo sem tratamento.

Não houve influência da adição de polietilenoglicol ao surfactante com relação aos parâmetros avaliados.

Descritores: Surfactantes pulmonares; Modelos animais de doenças; Polímeros; Síndrome de aspiração de mecônio/terapia; Ventilação pulmonar/efeito de drogas; Coelhos.

SUMMARY

LYRA JC. *Effects of polyethylene glycol added to exogenous surfactant for meconium aspiration syndrome treatment in newborn rabbits* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 94p.

Meconium is known to be a potent inactivator of pulmonary surfactant, and exogenous surfactant treatment for meconium aspiration syndrome failed to decrease mortality. A number of studies have shown, in vitro, that the addition of polymers such as polyethylene glycol (PEG) to the surfactant maintains good surface activity in the presence of meconium.

In the present study we evaluated the effects of the (PEG) addition to the exogenous surfactant in the pulmonary mechanics and in the regularity of pulmonary parenchyma inflation in newborn rabbits. New-Zealand-White rabbits born by c-section were submitted to tracheotomy and soon after human meconium (6 ml/kg – 65 mg/ml) was administered through tracheotomy. A randomization was done after 10 minutes ventilation, into 3 study groups according to the surfactant treatment used: MEC (no

treatment), S100 (100 mg/kg) and PEG (100 mg/kg added with PEG 5% / 15kDa). The animals were ventilated with 100 % oxygen, respiratory rate of 60 / minute and positive end-expiratory pressure of 3 cm H₂O. Peak inspiratory pressure was adjusted to keep a steady tidal volume of 8 ml/kg. A ventilator-plethysmograph system was used and values of dynamic compliance, ventilatory pressure and tidal volume were recorded every 5 minutes, using specific software, within a period of 20 minutes. The surfactant was produced by Butantan Institute (Sao Paulo, Brazil). After the ventilation period, a PV-curve was performed and the lungs were fixed in 10% formalin. Histological analysis was assessed calculating the mean linear intercept (Lm) and lung tissue distortion (SDI) by the standard deviation of the Lm. Statistical analysis was made by ANOVA One Way, significance was set at 0.05. After 20 minutes of ventilation, dynamic compliance (ml/kg.cmH₂O) was 0.44±0.05 (MEC*); 0.68±0.12 (S100) and 0.59±0.05 (PEG) and ventilatory pressure (cmH₂O) was 18.40±2.02 (MEC*); 11.84±1.82 (S100) and 13.60±1.39 (PEG). Both groups receiving surfactant had lower mean linear intercept and more homogeneity in the lung parenchyma when compared with MEC group: SDI = 18.53±4.71 (MEC*), 8.41±2.35 (S100) and 11.73±4.28 (PEG) (**p < 0,05 vs all the other groups*). We concluded that animals treated with surfactant showed significant improvement in pulmonary mechanics and more regularity of the lung parenchyma compared with non-treated animals. This improvement was found in both studied groups (independently of the PEG addition) without differences between them.

Descriptors: Pulmonary surfactants; Disease models, animal; Polymers; Meconium aspiration syndrome/therapy; Pulmonary ventilation/drug effects; Rabbits.

1.

Há mais de duas décadas o surfactante exógeno vem sendo utilizado para tratamento da síndrome do desconforto respiratório (SDR), doença decorrente da imaturidade pulmonar e inadequada produção de fosfolipídios e proteínas do surfactante, sendo hoje a terapia de reposição do surfactante (TRS) prática comum nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, o que contribuiu para a redução substancial das taxas de mortalidade de recém-nascidos (RN) prematuros (Curley e Halliday, 2001; Suresh e Sool, 2001). O avanço das pesquisas na área do surfactante permitiu o conhecimento aprofundado de suas funções e propriedades físico-químicas, abrindo possibilidades para seu uso em outras doenças, que não a SDR, como: síndrome de aspiração de mecônio (SAM), síndrome do desconforto respiratório do tipo agudo (SDRA), hemorragia pulmonar, pneumonias, hérnia diafragmática, bronquite crônica, asma e fibrose cística (Greenough, 2000; Dargaville et al., 2001). Vários estudos “in vitro” e com animais já demonstraram que em todas essas situações pode haver algum grau de disfunção ou inativação do surfactante endógeno, com diminuição de sua atividade pela ação de substâncias inibidoras que, uma vez presentes no alvéolo, causam deficiência qualitativa do surfactante (Wiswell, 2001).

Diante dos conhecimentos referentes à inativação do surfactante e às possibilidades de sua modificação em busca de melhor desempenho, desenvolvemos o presente estudo com hipótese de que a adição de PEG ao surfactante de origem porcina

resulta em melhor efeito do surfactante na função respiratória e no padrão histológico pulmonar de coelhos recém-nascidos com SAM.

1.1) O Sistema Surfactante

O surfactante pulmonar é uma substância complexa constituída de proteínas e fosfolipídios (FL) de importância vital para a função pulmonar, com atividade biofísica e de proteção alveolar. Sua principal atividade biofísica consiste em diminuir a tensão superficial na interface ar-líquido a valores próximos a zero, prevenindo colapso e superdistensão de alvéolos e bronquíolos, diminuindo o trabalho respiratório. A baixa tensão superficial também modula o movimento de líquidos do alvéolo para o interstício e ajuda no transporte muco-ciliar. Ao lado destas ações, o surfactante tem importante papel na proteção contra infecções e na atividade antiinflamatória do pulmão (Meyer e Zimmerman, 2002).

O surfactante é composto por 90% de lipídios e 10% de proteínas. O maior componente da fração lipídica (80%) é a dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), cujas características conferem ao surfactante sua capacidade de diminuir a tensão superficial a níveis extremamente baixos, próximos a zero. O fosfatidilglicerol (PG) é o segundo fosfolipídio mais abundante (10 %) e tem importante papel na adsorção e re-expansão do filme de surfactante durante a inspiração. O fosfatidil-inositol (PI) representa uma fração menor do total de fosfolipídios (2-5 %) e mimetiza a função do PG, sendo que, nos casos de deficiência deste último, seus níveis estarão aumentados. Os lipídios neutros estão representados no surfactante pelo colesterol, cuja principal função é manter o surfactante

fluidificado à temperatura corpórea, uma vez que a DPPC tende a assumir estado de gel em temperaturas abaixo de 41° C. O colesterol também tem papel importante na adsorção e remodelação da monocamada de fosfolípido durante a re-expansão (inalação), juntamente com o PG e as proteínas do surfactante, designadas apoproteínas (Hite, 2002).

As apoproteínas, embora representem apenas 10% da composição do surfactante, são muito importantes, pois atuam juntamente com os lipídios, para que o surfactante possa exercer suas funções. São classificadas em dois grupos: as hidrofóbicas e as hidrofílicas. As proteínas hidrofílicas (SP-A e SP-D) são removidas durante o processo de extração lipídica; as hidrofóbicas (SP-B e SP-C) são fortemente ligadas aos fosfolipídios e não se perdem com a extração (Bauman e Willson, 1999).

A SP-B e a SP-C atuam diretamente na diminuição da tensão superficial e na manutenção da estrutura da monocamada. A presença da SP-B parece ser importante para o controle da síntese de surfactante pelo pneumócito tipo II. Estudos “in vitro” sugerem que a SP-C facilita a adsorção do filme à superfície alveolar, além de melhorar a estabilidade do mesmo (Jobe e Ikegami, 2001).

As proteínas hidrofílicas têm menor papel direto na diminuição da tensão superficial do que as proteínas hidrofóbicas, porém a atividade destas últimas é otimizada na presença das primeiras. A SP-A interage com a SP-B para melhorar a adsorção dos lipídios, facilita a formação da mielina tubular e aumenta a proteção do surfactante contra agentes inibidores. A SP-D promove a remoção de impurezas e a retirada de moléculas de fosfolipídios da monocamada para posterior reciclagem (Anzueto, 2002). A SP-A e a SP-D por apresentarem na sua constituição moléculas de

carboidratos capazes de reconhecer e se ligar a patógenos desempenham função imunológica, facilitando a quimiotaxia de neutrófilos e a fagocitose e destruição de microorganismos pelos macrófagos alveolares (Curley e Halliday, 2001; Hite, 2002).

Essa função imunológica não se restringe às proteínas hidrofílicas. A interação destas com a SP-B e a SP-C e com a fração lipídica do surfactante promove diminuição da produção de superóxidos pelos neutrófilos e macrófagos, diminui a produção de citocinas pelos macrófagos e estimula a fagocitose pelos monócitos e neutrófilos alveolares (Anzueto, 2002).

Os componentes do surfactante são sintetizados no retículo endoplasmático dos pneumócitos tipo II, transportados pelo complexo de Golgi e armazenados no citoplasma da célula na forma de corpos lamelares, os quais são secretados por exocitose para a luz alveolar, formando a mielina tubular. Considera-se que a mielina tubular seja um estágio de transição entre os corpos lamelares e o surfactante disperso. O surfactante extracelular pode ser encontrado sob duas formas: como grandes e pequenos agregados, com diferentes atividades biofísicas ou formando uma monocamada de proteínas e fosfolipídios com alta capacidade de deformação e adaptação à superfície ar-líquido, onde exerce sua função de diminuir a tensão superficial. Após sucessivos ciclos respiratórios, com as compressões e descompressões do alvéolo, moléculas de lipídios e proteínas retornam ao interior do pneumócito, por endocitose, sendo reintegradas ao sistema de produção e secreção, num processo chamado de reciclagem (Kattwinkel, 1998; Anzueto, 2002).

Surfactantes pulmonares foram isolados de várias fontes biológicas para estudos na área clínica. Todos contêm fosfolipídios e pelo menos duas proteínas hidrofóbicas

(SP-B e SP-C). Os surfactantes provenientes de várias espécies de mamíferos são bastante semelhantes na sua composição e seqüência de SP-B e SP-C, o que permite o uso cruzado entre diferentes espécies, com objetivo de melhorar a função pulmonar. Porém esta similaridade não elimina os riscos antigênicos e infecciosos do uso de surfactantes heterólogos (Long et al., 1996).

Os surfactantes naturais de origens bovina e suína, disponíveis para uso comercial, não possuem as proteínas hidrossolúveis SP-A e SP-D na sua composição, devido ao processo de isolamento lipídico. Os surfactantes sintéticos não possuem proteínas e seus fosfolipídios têm características diferentes dos naturais (Bauman e Willson, 1999). Por isso sua atividade biológica é menor do que a observada com o surfactante natural e são menos resistentes a contaminantes inativadores presentes no interior do alvéolo (Bruni et al., 1996).

1.2) Mecanismos de inibição do surfactante

Para que o surfactante possa exercer sua função na superfície alveolar, é necessário que haja controle rigoroso do seu metabolismo, desde a síntese pelos pneumócitos do tipo II, incluindo seu armazenamento e secreção, até os mecanismos de recaptção, reciclagem e ressecreção para a superfície alveolar. Qualquer circunstância que interfira com uma dessas etapas pode causar alterações na formação e manutenção do filme tensoativo, com diminuição da quantidade de surfactante ativo na interface ar-líquido da superfície alveolar. Na deficiência quantitativa de surfactante, como na SDR, ocorre diminuição da sua produção; já na deficiência qualitativa, por disfunção do

surfactante, existem fatores que interferem no ciclo alveolar do seu metabolismo, causando inativação da película tensoativa, devido à alteração, destruição ou remoção da película de fosfolipídios da superfície alveolar ou por adição de substâncias com propriedades tensoativas que substituem ou competem com a película original. Os principais agentes com essas propriedades inativadoras são: proteínas (albumina, fibrinogênio e hemoglobina), colesterol, ácidos graxos livres e bilirrubina, edema pulmonar, citocinas, proteases, agentes oxidantes (oxigênio em altas concentrações), além de agentes físicos, como barotrauma e volutrauma (Grenough, 2000; Miyoshi e Ribeiro, 2004).

Segundo Dargaville e Morley (2000), a inativação do surfactante pode ser definida como qualquer processo que interfira com a liberação de fosfolipídios do surfactante para a monocamada e/ou dificulte a incorporação de DPPC à monocamada durante a compressão. Dois mecanismos básicos de inativação podem ser encontrados (Holm et al., 1999):

a) inibição por competição, na qual proteínas competem com as moléculas de FL, dificultando sua incorporação ao filme que reveste a superfície alveolar. Proteínas maiores, como albumina e hemoglobina, competem com os constituintes do surfactante na interface. Já as proteínas menores, como a fosfolipase A, tendem a penetrar no filme, misturando-se com os fosfolipídios do surfactante e diminuindo sua atividade. Nesse caso a função do surfactante pode ser restaurada com o aumento da concentração de fosfolipídios.

b) infiltração de outros tipos de FL, diferentes da DPPC (por exemplo, a lisofosfatidilcolina), ou de outros lipídios (ácidos graxos livres) no filme de superfície. A

lisofosfatidilcolina tem a capacidade de penetrar no filme de surfactante e interagir com as moléculas de FL, alterando a capacidade de adsorção e a dinâmica do surfactante. Essas substâncias possuem atividade de superfície, o que as torna capazes de diminuir a tensão superficial até certo ponto, porém não conseguem manter a estabilidade da monocamada durante a compressão alveolar, causando assim piora da função do surfactante. Este modo de inibição geralmente não é revertido com o aumento da concentração de fosfolipídios.

Zasadzinski et al. (2005) estudaram os mecanismos biofísicos de inativação do surfactante mostrando que as proteínas séricas presentes na hipofase reduzem ou até eliminam o processo normal de adsorção do surfactante à interface ar-líquido. Segundo esses autores, substâncias inativadoras hidrossolúveis são transferidas da subfase e incorporadas à superfície alveolar muito mais rápido que os componentes ativos do surfactante, impedindo a efetiva diminuição da tensão superficial.

Como citado anteriormente, o surfactante pode ser encontrado em dois diferentes estados funcionais, identificados por meio de microscopia eletrônica: os grandes agregados (GA) e os pequenos agregados (PA). Em condições normais, 80 a 90% do surfactante encontram-se sob a forma de grandes agregados, que se caracterizam pelo alto conteúdo de SP-B com ótima atividade de superfície. Doenças pulmonares agudas em geral podem causar inativação do surfactante por induzirem aumento na taxa de conversão de grandes agregados para pequenos agregados (Günther, 2001). Como os pequenos agregados desempenham pior atividade tensoativa, a alta relação PA/GA está relacionada com piora da função do surfactante (Ochs et al., 2006).

1.2.1) Modelo experimental de aspiração de mecônio para estudo da inativação do surfactante

O avanço das pesquisas com surfactantes permitiu o conhecimento aprofundado de suas funções e propriedades físico-químicas e abriu possibilidades para novas linhas de pesquisa nessa área. Com o objetivo de investigar os mecanismos de inativação do surfactante, foram desenvolvidos vários modelos experimentais como, por exemplo, a indução da SDRA, da pneumonia e da síndrome de aspiração de mecônio, utilizando-se diferentes técnicas e espécies animais (Dargaville e Morley, 2000).

O modelo de SAM, através da instilação de mecônio em diferentes concentrações em pulmões de ratos, coelhos e cobaias, tem sido amplamente utilizado para o estudo da inativação do surfactante (Robertson e Lachmann, 1988; Sun et al., 1993a; Tashiro et al., 2003; Tollofsrud et al., 2003) e mostra que a presença de mecônio nas vias aéreas distais pode causar anormalidades na função do surfactante devido à inibição ou alteração na composição, resultando em diminuição da complacência pulmonar, diminuição da capacidade residual funcional, atelectasia e hipoxia (Brown e Pattishal, 1993; Cleary et al., 1997; Kattwinkel, 1998).

O mecônio é um líquido viscoso, de coloração esverdeada, constituído de secreções gastrintestinais, tais como: bile, ácidos biliares, muco, suco pancreático, células descamadas do trato gastrintestinal do feto, além de líquido amniótico, vérnix caseoso, lanugo e sangue deglutidos (Kääpä et al, 1997). Sun et al. (1993a) descreveram a seguinte composição bioquímica do mecônio, utilizando a técnica de separação com água-metanol ou clorofórmio: 150 mg de proteínas, 1 mg de bilirrubina, 49 mg de ácidos

graxos livres, 47 mg de triglicérides e 270 mg de colesterol para cada grama de mecônio (peso seco). Essas substâncias presentes no mecônio interagem com o surfactante, prejudicando suas funções. Moses et al. (1991) avaliaram a ação do mecônio e seus componentes na atividade biofísica do surfactante pulmonar de origem bovina, observando que diferentes concentrações de mecônio adicionadas ao surfactante, tanto na fase solúvel em água como em clorofórmio, causam aumento da tensão superficial em níveis incompatíveis com as funções fisiológicas normais.

Na SAM a presença do mecônio no alvéolo causa aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, o que permite a passagem de proteínas plasmáticas para a luz alveolar. Os efeitos inibitórios dessas proteínas sobre o surfactante foram documentados no estudo de Holm et al. (1988), que mostra que a adição de albumina, hemoglobina ou fibrinogênio ao extrato de surfactante pulmonar bovino causa importante inibição da sua atividade tensoativa e diminuição da adsorção à interface ar-líquido. Cleary et al. (1997) estudaram os efeitos do mecônio sobre os níveis de proteína e fosfolipídios alveolares em ratos e observaram a ocorrência de resposta inflamatória nos pulmões, com diminuição dos níveis de apoproteínas A e B do surfactante mesmo com baixas quantidades de mecônio. Sun et al (1993a), utilizando coelhos recém-nascidos como modelo experimental de SAM, mostram maiores valores de pressão parcial de CO₂ e pH mais baixo no grupo com SAM, comparados ao grupo controle (animais saudáveis). Nesse experimento os traçados de volume-corrente e pressão de insuflação pulmonar nos animais que receberam mecônio na traquéia foram similares àqueles encontrados em pulmões imaturos de animais com deficiência de surfactante (modelo experimental de

síndrome do desconforto respiratório), ventilados sob condições semelhantes. Ainda nesse estudo foi demonstrada “in vitro”, a inibição da função do surfactante, provavelmente pela ação de proteínas, bilirrubinas, colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres presentes no mecônio. Davey et al. (1993) avaliaram as alterações fisiológicas e inflamatórias em pulmões de cobaias submetidas à aspiração de mecônio. Os resultados mostraram pior oxigenação e piora da complacência dinâmica nos animais com SAM, quando comparados aos animais sadios. No aspirado traqueal documentou-se maior contagem absoluta e maior atividade quimiotática de neutrófilos, além de maior conteúdo protéico nos animais com SAM.

De acordo com pesquisas “in vitro” e em modelos animais, o efeito inativador do mecônio deve-se a diversos fatores que, isoladamente ou em conjunto, alteram as propriedades do surfactante (Wiswell, 2001). Em concentração maior que 1% o mecônio desempenha efeito tóxico direto nos pneumócitos do tipo II, devido ao acúmulo de cálcio intracelular induzido pelos sais biliares (Daragaville e Mills, 2005). Também já foi demonstrado que o mecônio causa diminuição dos níveis de SP-A e SP-B, além de diminuir a quantidade de fosfolipídios do surfactante (Cleary et al., 1997). Substâncias que fazem parte da constituição do mecônio como ácidos graxos livres, triglicerídios, colesterol e lisofosfatidilcolina, competem com as moléculas de surfactante na formação da monocamada que recobre o alvéolo, alterando a sua função pela remoção de parte dos fosfolipídios do filme da superfície alveolar, aumentando a tensão superficial durante a compressão. A hemorragia, o edema, as células inflamatórias e os mediadores químicos encontrados no interior do alvéolo, em decorrência da presença de mecônio, também

contribuem para a inativação do surfactante (Holm et al., 1988; Davey et al., 1993; Sun et al., 1993a).

1.3) Terapia de reposição com surfactante exógeno na síndrome de aspiração de mecônio

Com base nos conceitos de inativação do surfactante, as pesquisas em laboratório têm demonstrado grande benefício da reposição de surfactante exógeno sobre a função pulmonar de animais com SAM. Os resultados mostram melhora da mecânica pulmonar, avaliada pelas medidas de complacência pulmonar, pressões ventilatórias e volume-corrente (Sun et al., 1996; Lyra et al., 2004), melhora nas trocas gasosas (Sun et al., 1993b; Lam et al., 2000) e no padrão histológico pulmonar, com menor lesão do parênquima, menos edema, menor influxo de neutrófilos para os espaços intra-alveolares (Sun et al., 1996) e melhor padrão de expansão alveolar (Sun et al., 1993b; Lyra et al., 2004).

Apesar das evidências do importante distúrbio do sistema surfactante que ocorre na SAM e os promissores resultados da terapia de reposição de surfactante exógeno em animais de experimentação, o uso dessa terapêutica para RN humanos com SAM tem sido objeto de discussão, pois os ensaios clínicos apresentam resultados conflitantes. A metanálise dos dois estudos clínicos mais importantes nesta área mostrou que o uso de surfactante exógeno para tratamento de RN com SAM reduziu a gravidade da insuficiência respiratória, diminuindo a indicação de oxigenação por membrana extra

corpórea (ECMO). Porém não foram observadas diferenças nas taxas de mortalidade (Soll e Dargaville, 2006), com muitos pacientes que não respondem (Halliday et al., 1996), e outros que melhoram por tempo curto e não sustentado (Findlay et al., 1996; Lotze et al., 1998). Recentemente um grupo de pesquisadores chineses realizou um estudo multicêntrico, randomizado e controlado para avaliar a resposta de RN com SAM ao tratamento com surfactante. O grupo tratado (até 4 doses com intervalo de 6 a 12 horas) apresentou tendência à melhora da oxigenação, porém não houve diferença quanto à duração da ventilação mecânica, incidência de complicações e mortalidade, quando comparado ao grupo-controle (Chinese Collaborative Study Group for Neonatal Respiratory Diseases, 2005).

A heterogeneidade de resultados dos estudos clínicos pode ser explicada, em parte, pelo fato de que os mecanismos que causam insuficiência respiratória nos pacientes com SAM são variados (pneumonite, obstrução de vias aéreas, hipertensão pulmonar, disfunção do surfactante) (Kammash et al., 1993). Além disso, o mecônio pode inativar o surfactante exógeno por meio dos mesmos mecanismos descritos para o surfactante endógeno (Bae et al., 1998; Almas et al., 2000; Herting et al., 2001). Por outro lado, os métodos usados no preparo e purificação dos surfactantes exógenos disponíveis comercialmente resultam num produto final com atividade inferior ao surfactante natural. Na técnica de extração de lipídios, comumente utilizada na manufatura de surfactante de origem animal, ocorre perda da SP-A, que tem a propriedade de aumentar a resistência do surfactante frente a agentes inibidores. Além disso, surfactantes naturais preparados a partir de pulmões macerados têm menor proporção de SP-B e SP-C, proteínas que também têm atividade antiinibitória. Os

surfactantes sintéticos não possuem proteínas na sua constituição, o que os torna o tipo mais susceptível à inibição (Dargaville e Morley, 2000).

Diante deste conceito de inativação do surfactante exógeno, recentes estudos sugerem a modificação dos surfactantes até agora conhecidos, na tentativa de torná-los mais resistentes à ação inativadora de proteínas e do mecônio. Diversas pesquisas com uso de surfactantes de terceira geração como o sinapultide (Surfaxin[®]) e lusupultide (Venticute[®]) mostram alguma proteção contra a inativação, provavelmente relacionada à presença da proteína “SP-B-like” e da SP-C recombinante, respectivamente (Wiswell et al., 2002; Dargaville e Mills, 2005). Outra possibilidade se refere ao uso de polímeros como substâncias adjuvantes acrescidas ao surfactante. Estudos “in vitro” demonstram melhora da função do surfactante quando adicionado de polímeros não-iônicos como o dextran (Tashiro et al., 2000), o hialuronato (Lu et al., 2005a) e o polietilenoglicol (PEG) (Taeusch et al., 1999; Lu et al., 2001a).

Embora não estejam completamente esclarecidos os mecanismos exatos pelos quais os polímeros interferem na função do surfactante, os dados disponíveis na literatura sugerem que a sua ação incrementa a atividade das apoproteínas, com melhora das propriedades adsorptivas e maior estabilidade da monocamada durante a compressão (Dargaville e Morley, 2000). Os polímeros não-iônicos, por serem agentes osmoticamente ativos, causariam desidratação da superfície lipídica, desestabilizando a camada de fosfolípidios, aumentando a taxa de transferência dos mesmos para a superfície ar-líquido, tornando o surfactante mais resistente diante de seus inibidores (Dehority et al., 2005).

Alguns experimentos com animais confirmam os achados dos estudos “in vitro” nos quais a adição de PEG melhora a função do surfactante. Taeusch et al. (1999) demonstraram melhora da capacidade pulmonar total de ratos adultos com aspiração de mecônio no grupo que recebeu surfactante com PEG, comparado ao grupo tratado apenas com surfactante. Lu et al. (2000) concluíram que a adição de PEG ao Survanta[®] melhorou a troca gasosa e a mecânica pulmonar, além de melhorar o padrão histológico dos pulmões de ratos adultos com lesão pulmonar causada pelo mecônio. Por outro lado, outros estudos não apresentam resultados tão positivos. No estudo de Campbell et al. (2002) a adição de PEG diminuiu a eficácia do surfactante no modelo de lesão pulmonar aguda através de lavagem com solução salina em coelhos adultos. Recentemente Dehority et al. (2005) demonstraram melhora do volume pulmonar, porém sem repercussão na oxigenação em coelhos adultos com SDRA tratados com surfactante e PEG, comparados ao grupo tratado apenas com surfactante. Resultados semelhantes foram obtidos em nosso meio por Freddi et al. (2005), utilizando PEG adicionado ao surfactante exógeno em um modelo experimental de SDRA.

Assim, o uso dos polímeros não-iônicos como adjuvantes dos surfactantes requer um maior entendimento, incluindo estudos com diferentes espécies animais, que elucidem melhor os seus mecanismos de ação, determinem a sua concentração ótima, assim como o peso molecular ideal destes polímeros (Dargaville et al., 2000; Dehority et al., 2005; Dargaville e Mills, 2005).

2.

2.1) Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da adição de polietilenoglicol ao surfactante exógeno no tratamento da síndrome de aspiração de mecônio.

2.2) Objetivos específicos:

Determinar, em coelhos recém-nascidos de termo com SAM, os efeitos do tratamento com surfactante exógeno adicionado de polietilenoglicol, comparado ao surfactante puro sobre:

- a) a complacência pulmonar, a pressão ventilatória necessária para se obter um volume-corrente de 8 ml/kg e os volumes pulmonares.
- b) a homogeneidade da expansão alveolar.

3. Material e

3.1) Local do trabalho

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foi financiado, em parte, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo 98 / 14482 - 5).

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da FMUSP. A análise histológica pulmonar foi realizada sob supervisão da Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, do Departamento de Patologia da FMUSP.

3.2) Preparo do mecônio

A SAM foi induzida nos coelhos recém-nascidos por meio da administração endotraqueal de mecônio humano, na concentração de 65 mg/ml na dose de 6 ml/kg, seguindo as técnicas de modelos experimentais descritas na literatura (Sun et al., 1993a,b).

Foi coletado mecônio de recém-nascidos humanos a termo no primeiro dia de vida, normais, sem história de uso materno de drogas e sem contaminação com urina. O

material foi coletado no berçário do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As amostras foram acondicionadas em coletores plásticos e mantidas sob refrigeração (+3 ° C) até o recebimento pelo investigador num prazo máximo de 24 horas.

Inicialmente foi realizada a diluição do mecônio com água destilada em uma concentração de 25 mg/ml, seguida de filtragem para remoção de partículas com diâmetro maior que 3 µm, visando eliminar o possível efeito de obstrução das vias aéreas. Alíquotas de 5 ml foram encaminhadas para liofilização no Instituto Butantan, a duração do ciclo foi de 24 hs em equipamento específico (RePP ® - Division of the Virtis Company Gardiner, New York, modelo 41 sub, com compressor modelo Copeland 9TK1-0500-TFC ®). O procedimento de liofilização permite melhor acondicionamento e preservação do mecônio, além de facilitar o preparo para a aplicação. Para administração do mecônio aos animais o mesmo foi diluído em solução fisiológica a uma concentração de 65 mg/ml (Moses et al., 1991; Sun et al., 1993a,b).

3.3) Preparo do surfactante

O surfactante utilizado neste estudo foi produzido e fornecido pelo Instituto Butantan de São Paulo na concentração de 25 mg de lipídios/ml, obtido a partir de macerado de pulmão suíno, sendo composto por fosfolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e esfingomielina) e duas proteínas (SP-B e SP-C) (Kubrusly et al., 2000). O produto foi

mantido sob refrigeração a 3° C até o momento da administração, sendo todas as amostras obtidas a partir de um mesmo lote de produção.

Este surfactante já foi previamente testado e teve sua eficácia comprovada em estudo anterior, que utilizou modelo experimental de coelhos recém-nascidos prematuros com síndrome do desconforto respiratório (Arcas et al., 2000) e também em modelo experimental de SAM em coelhos recém-nascidos a termo (Lyra et al., 2004).

3.3.1) Adição de polietilenoglicol ao surfactante porcino

Foi utilizado PEG (Sigma Chemical Co. St. Louis, Estados Unidos) com peso molecular de 15 kDa, na concentração de 5% (massa/volume) (Taeusch et al., 1999). A mistura do PEG ao surfactante foi feita no dia de cada experimento, imediatamente antes de sua administração. O polímero foi adicionado sem diluição prévia diretamente na solução de surfactante. O frasco contendo a mistura final foi energicamente homogeneizado, utilizando-se um “mixer” (Mistral – Labline instruments INC, Melrose, Estados Unidos) por um período mínimo de 30 segundos, em temperatura ambiente, obtendo-se uma mistura final homogênea, sem grumos visíveis a olho nu. A forma de preparo e mistura do PEG foi realizada seguindo técnica descrita na literatura (Lu et al., 2001a; Lu et al., 2005b).

3.4) Animais de experimentação

3.4.1) Nascimento e início da ventilação

Foram estudados coelhos da raça New-Zealand-White fornecidos pelo biotério da Fazenda Benjamin Fleider. Para controle da idade gestacional, as fêmeas foram colocadas em gaiolas com os machos durante um período de 6 horas. Em seguida foram mantidas em gaiolas individuais até a confirmação da gestação.

Os recém-nascidos a termo foram obtidos através de cesariana aos 30 dias de gestação. Inicialmente as coelhas prenhes foram sedadas com aplicação intramuscular de solução de quetamina e acepromazina (10mg/kg e 0,1 mg/kg), seguida de raqui-anestesia com 2 ml de solução 1:1 (vol:vol) de lidocaína a 2% e bupivacaína a 0,5%. Após laparotomia e histerotomia sobre colchão térmico, o coelho recém-nascido foi removido e as membranas e a placenta retiradas.

Após a secagem e aferição do peso, o animal foi anestesiado com administração intraperitoneal de quetamina-acepromazina (10 mg/kg - 0,1 mg/kg) e submetido à traqueostomia com cânula de metal (diâmetro interno de 1mm). Antes do início da ventilação foi realizada a administração endotraqueal de mecônio (65 mg/ml), na dose de 6ml/kg, e feita ventilação manual com balão auto-inflável por cerca de dez segundos. Em seguida os animais receberam pancurônio por via intraperitoneal (20 µg), para que não houvesse respiração espontânea. A ventilação mecânica foi iniciada, utilizando-se frequência respiratória (FR) de 60 ciclos/min; fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de

1,0; pico de pressão inspiratória (PIP) necessário para se obter volume-corrente de 8 ml/kg e pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 3 cmH₂O. O modo de ventilação utilizado foi em assistida-controlada, com aparelho de ventilação mecânica ciclado a tempo, limitado a pressão (INTER 3[®] - Intermed-São Paulo, Brasil), durante um período de 20 minutos.

3.4.2) Randomização

Foram excluídos do estudo os animais que não apresentaram redução nos valores de complacência pulmonar maior ou igual a 30% em relação aos valores normais de complacência para os recém-nascidos de termo desta espécie animal, valores esses obtidos na literatura (Sun et al., 1993a,b) e por nós confirmados em estudo prévio (Lyra et al., 2004). Também foram excluídos os animais que apresentaram sinais de pneumotórax em algum momento do estudo e os que apresentaram peso de nascimento inferior a 30 g.

O processo de randomização para a entrada de cada animal em um determinado grupo de estudo foi feito de forma aleatória por sorteio, sendo que cada ninhada deu origem a animais para os 3 diferentes grupos. No caso de exclusão por algum motivo, o animal era substituído por outro do mesmo grupo previamente sorteado. Após dez minutos de ventilação os animais foram divididos em 3 grupos de estudo de acordo com o tipo de tratamento administrado: sem tratamento com surfactante exógeno (MEC);

tratamento com surfactante -100 mg/kg (S100); tratamento com surfactante -100 mg/kg adicionado de polietilenoglicol a 5% (PEG).

3.4.3) Ventilação e coleta de dados de mecânica pulmonar

Após o início da ventilação foram coletados dados de volume-corrente (VC), complacência dinâmica (CD) e pressão ventilatória (PV) com 5, 10, 15 e 20 minutos. Os dados foram obtidos com auxílio de um pneumotacógrafo (modelo 3700 series, Hans Rudolph Inc, Kansas City, MO), acoplado a um transdutor de pressão (modelo DP45-24, Validyne Corp., Northridge, CA) localizado entre o circuito do ventilador e o tubo traqueal, sendo analisados com o auxílio de um sistema de aquisição de dados computadorizado (LabView 5.1, National Instruments) desenvolvido especificamente para este fim (R.A. Eletro Sistemas Ltda, Campinas, Brasil) (Figuras 1 e 2). Considerou-se PV como a diferença entre o pico de pressão inspiratória e a pressão positiva no final da expiração, e a complacência dinâmica (ml/cmH₂O.kg) foi calculada dividindo-se o volume-corrente (ml/kg) pela PV (cmH₂O). O ajuste do PIP foi feito conforme a necessidade para se manter o VC alvo de 8 ml/kg, até 30 segundos antes de cada aferição. A calibração do sistema de ventilação e aquisição de dados foi feita antes do início de cada dia de experimento, sendo aceita uma variação da ordem de 5% dos valores obtidos.

3.4.4) Sacrifício e manipulação dos pulmões

Após 20 minutos de ventilação, os animais receberam sedação profunda com pentobarbital sódico (25 mg/kg) intraperitoneal, seguido do clampeamento da traquéia por 5 minutos e sacrifício com injeção intratecal de 0,5 ml de lidocaína a 3%. Em seguida foi realizada uma curva pressão-volume pulmonar (curva P-V), com o auxílio de um sistema de coluna d'água. Com o tórax ainda fechado, mediu-se o volume dos pulmões na fase de insuflação, a partir da pressão de 0 cmH₂O, utilizando-se incrementos de 5 cmH₂O até pressão máxima de 30 cmH₂O, seguida de deflação do pulmão a decréscimos de 5 cmH₂O até 0 cmH₂O. O tempo de equilíbrio antes da anotação dos valores foi de 30 segundos após cada mudança de pressão. Os valores foram corrigidos para a complacência do sistema e anotados em ml/kg.

Após a realização da curva P-V os pulmões foram reinsuflados com pressão de 30 cmH₂O por 1 minuto, seguida de diminuição da pressão até 10 cmH₂O e clampeamento da traquéia, com o objetivo de se obter melhor visualização histológica dos efeitos do surfactante pulmonar. Os animais foram dissecados com retirada dos pulmões e coração em monobloco. O tecido pulmonar foi obtido de maneira padronizada, sendo enviados para análise histológica cortes realizados no lobo superior direito de cada pulmão. De acordo com estudo-piloto para determinação de área representativa, essas são as regiões pulmonares com maior evidência da presença de mecônio (Figuras 3a e 3b). Os fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% por um período mínimo de 24 horas. Os cortes, de 5 micrômetros de espessura, foram processados em parafina e corados através do método de hematoxilina e eosina (HE).



FIGURA 1. Animal conectado ao ventilador mecânico. A seta mostra o pneumotacógrafo acoplado entre a cânula e o circuito do aparelho. Os dados são transmitidos ao computador, via transdutor de fluxo e pressão.

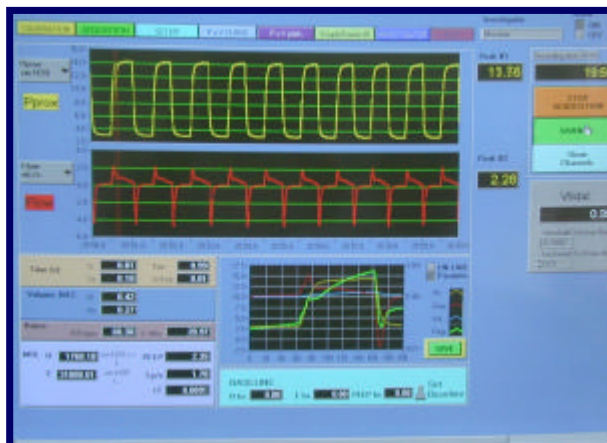


FIGURA 2. A tela do computador, onde os valores de PIP, PEEP, Fluxo e VC são monitorizados em tempo real, durante o período de ventilação mecânica.

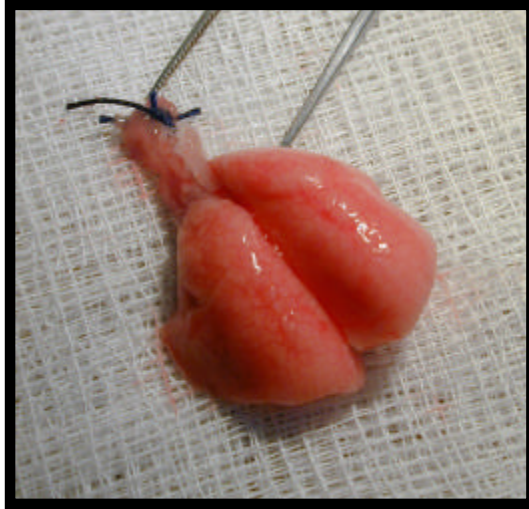


Figura 3a. Fotografia de um pulmão de coelho recém-nascido normal.

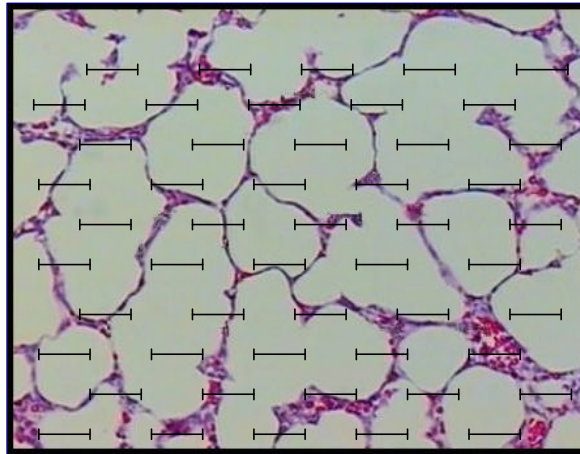


Figura 3b. Fotografia de um pulmão de coelho recém-nascido com SAM.

3.5) Histopatologia

O estudo histopatológico foi realizado através de microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse E 600[®], Japão) com o objetivo de estudar áreas de atelectasia ou hiperinsuflação pulmonar. Para isso determinou-se o número de interceptos alveolares, através de uma grade contendo 100 pontos e 50 retas de tamanho conhecido, sendo contados 10 campos por lâmina no aumento de 200 vezes. A partir do número de interceptos por campo, foi determinado o diâmetro alveolar médio (Lm) e o índice de distorção (ID) para comparação entre os grupos. O Lm foi calculado como a relação entre o comprimento das retas e o número de interceptos (cruzamento da reta com o septo alveolar) e o ID a partir do desvio padrão das médias do Lm de cada grupo (Figura 4) (Dolhnikoff et al., 1997). A leitura das lâminas foi realizada de maneira cega por dois examinadores em momentos diferentes.

O desenho do estudo está resumido de forma esquemática na Figura 5.



$$L_m = \frac{\text{comprimento da reta}}{\text{n}^\circ \text{ de interceptos}}$$

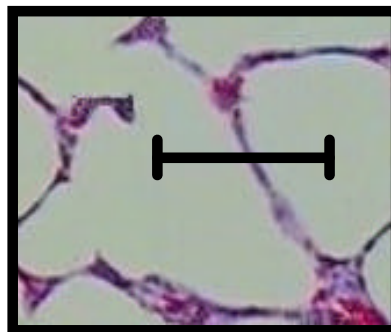


FIGURA 4. Acima, fotografia de uma lâmina com interposição do retículo contendo 50 retas e 100 pontos. O L_m é calculado a partir do número de interceptos por campo. O intercepto corresponde ao cruzamento da reta com o septo alveolar. O ID é calculado a partir do desvio padrão da média do L_m . Abaixo, detalhe de uma reta cruzando um intercepto alveolar.

3.6) Análise estatística

A comparação das médias entre os grupos foi feita utilizando-se “ANOVA ONE WAY” e a comparação entre os quatro momentos de aferição de PV e CD em cada grupo individualmente, ao longo do período de ventilação mecânica, foi feita utilizando-se “ANOVA ONE WAY” para medidas repetidas. Foi utilizado "Student-Newman-Keuls" como pós-teste discriminatório, adotando-se um nível de significância de 5%. Quando os dados não apresentaram os pré-requisitos de distribuição normal e mesma variância, foi utilizado "Kruskal-Wallis Análise de Variância One Way em Ranks" como opção de teste para dados não paramétricos. A comparação entre proporções foi feita utilizando-se o teste do Qui-quadrado.

O tamanho mínimo calculado da amostra foi de 8 animais em cada grupo, baseado em uma diferença entre as médias dos grupos na dimensão de 0,77 ml/cmH₂O.kg (para complacência pulmonar), com um desvio-padrão considerado igual para todos os grupos e da ordem de 0,7, com um poder de teste de 0,80 e um nível de significância de 0,05. Os valores de complacência pulmonar considerados foram obtidos a partir de dados de literatura (Sun et al., 1993a,b).

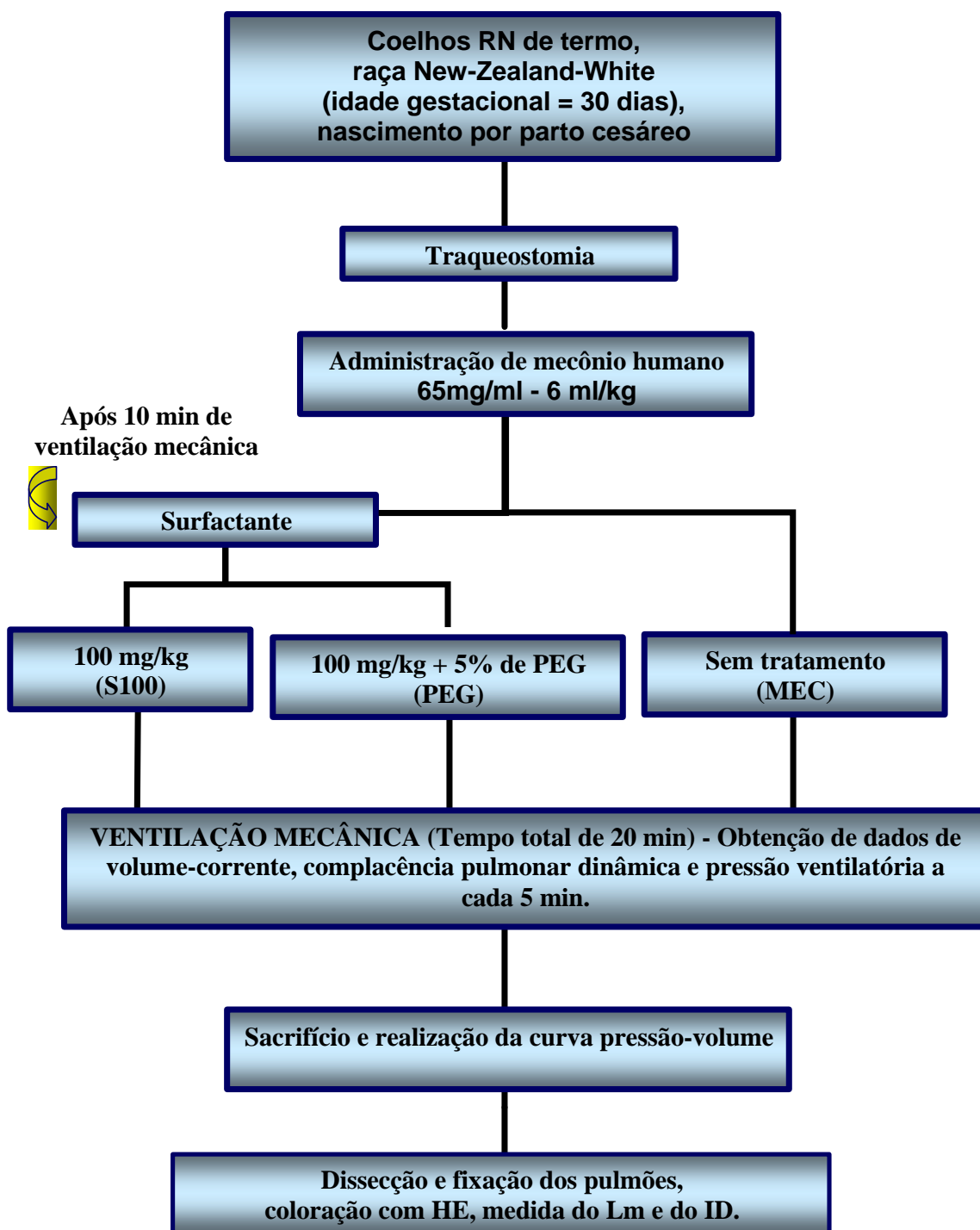


FIGURA 5. Desenho do estudo.



4.

Foram utilizadas 15 fêmeas e um total de 48 animais recém-nascidos vivos. Foram excluídos 3 animais devido a pneumotórax, 4 com peso de nascimento inferior a 30 g e 5 que não apresentaram diminuição da complacência pulmonar superior a 30% em relação aos valores de complacência de animais sadios (Figura 6). O peso dos animais variou de 30,5 a 55,3 g, não havendo diferenças entre os pesos médios de cada grupo. O número de animais e a média de peso em cada grupo estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1: Número de animais e peso (média \pm dp) em cada grupo de estudo

Grupo	Número de animais	Peso médio (g)
MEC	12	44,0 \pm 7,4
S 100	12	38,8 \pm 5,6
PEG	12	41,2 \pm 3,0

4.1) Mecânica respiratória

As Figuras 7, 8 e 9 mostram os resultados dos animais durante os 20 minutos de ventilação mecânica quanto ao volume-corrente, complacência pulmonar dinâmica e pressão ventilatória, respectivamente.

Na Figura 7 observa-se que o volume-corrente se manteve constante (variação de 7,8 a 8,2 ml/kg) durante todo o período de ventilação, não havendo diferenças entre os 3 grupos.

Os animais dos 3 grupos iniciaram a ventilação mecânica com valores de complacência pulmonar dinâmica menor ou igual a 30 % em relação aos valores de complacência pulmonar considerados normais. Após o tratamento com surfactante exógeno, os animais do grupo S100, comparados ao grupo não tratado (MEC), apresentaram aumento significativo dos valores de complacência pulmonar dinâmica, que se mantiveram até o final do período de ventilação. O mesmo ocorreu com o grupo PEG, porém a melhora da complacência foi significativamente maior no grupo S100 comparado ao PEG (Figura 8).

Em relação à pressão ventilatória, observou-se que os animais que receberam surfactante (S100 e PEG) apresentaram diminuição dos valores de PV para manter o volume-corrente pré-fixado de 8 ml/kg após tratamento, porém não houve diferença significativa entre os dois grupos tratados, que mantiveram o mesmo desempenho até o final da ventilação. Os animais do grupo MEC permaneceram com valores elevados de pressão ventilatória durante todo o tempo de ventilação mecânica (Figura 9).

Esses efeitos sobre a complacência pulmonar dinâmica e sobre a pressão ventilatória ocorreram imediatamente após a administração do surfactante, aos 10

minutos de ventilação. A análise individual de cada um dos dois grupos tratados mostrou aumento da CD e diminuição da PV significativos ao longo do tempo de ventilação, comparando-se os valores pré e pós-administração do surfactante (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Valores de complacência pulmonar (ml/kg.cm H₂O) nos 4 momentos de aferição durante os 20 minutos de ventilação mecânica

Grupo	<i>TEMPO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA (min)</i>			
	5	10	15	20
S100	0,44*	0,47*	0,68	0,68
PEG	0,41[§]	0,44[§]	0,58	0,59

* p < 0,001 vs 15 e 20 min

§ p < 0,001 vs 15 e 20 min

Tabela 2 – Valores de pressão ventilatória (cm H₂O) nos 4 momentos de aferição durante os 20 minutos de ventilação mecânica

Grupo	<i>TEMPO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA (min)</i>			
	5	10	15	20
S100	19,32*	17,75*	11,99	11,84
PEG	19,52[§]	18,50[§]	13,64	13,60

* p < 0,001 vs 15 e 20 min

§ p < 0,001 vs 15 e 20 min

Os resultados das curvas P-V estão mostrados na Figura 10. Na fase de insuflação pulmonar, até a pressão de 10 cm H₂O, os pulmões dos animais dos 3 grupos de estudo permaneceram colabados. Os animais do grupo MEC necessitaram de pressão mais elevada para iniciar a insuflação pulmonar em relação ao grupo S100, e com pressão de 30 cmH₂O atingiram menores valores de volume pulmonar máximo, comparados ao grupo S100. Na fase de deflação pulmonar os animais dos grupos S100 apresentaram volumes pulmonares maiores em relação ao grupo MEC, nas pressões de 25 e 20 cm H₂O. No entanto, com pressão de 5 cm H₂O, o grupo MEC manteve volume pulmonar mais elevado do que os grupos tratados com surfactante. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos S100 e PEG em nenhum ponto da curva.

4.2) Histopatologia

O estudo histopatológico, em relação à aeração pulmonar, mostrou que os pulmões do grupo MEC apresentaram padrão heterogêneo, com focos de atelectasia distribuídos entre áreas normais e áreas hiperinsufladas, enquanto os dois grupos tratados mostraram-se com padrão mais homogêneo (Figuras 11 a,b e 12).

A Figura 13 apresenta o diâmetro alveolar médio (Lm) e o índice de distorção (ID) de cada grupo. Observou-se que os valores de Lm do grupo MEC diferiram significativamente dos grupos S100 e PEG. Quanto ao índice de distorção, os 2 grupos tratados com surfactante foram semelhantes entre si, diferindo ambos do grupo MEC, que teve valores maiores.

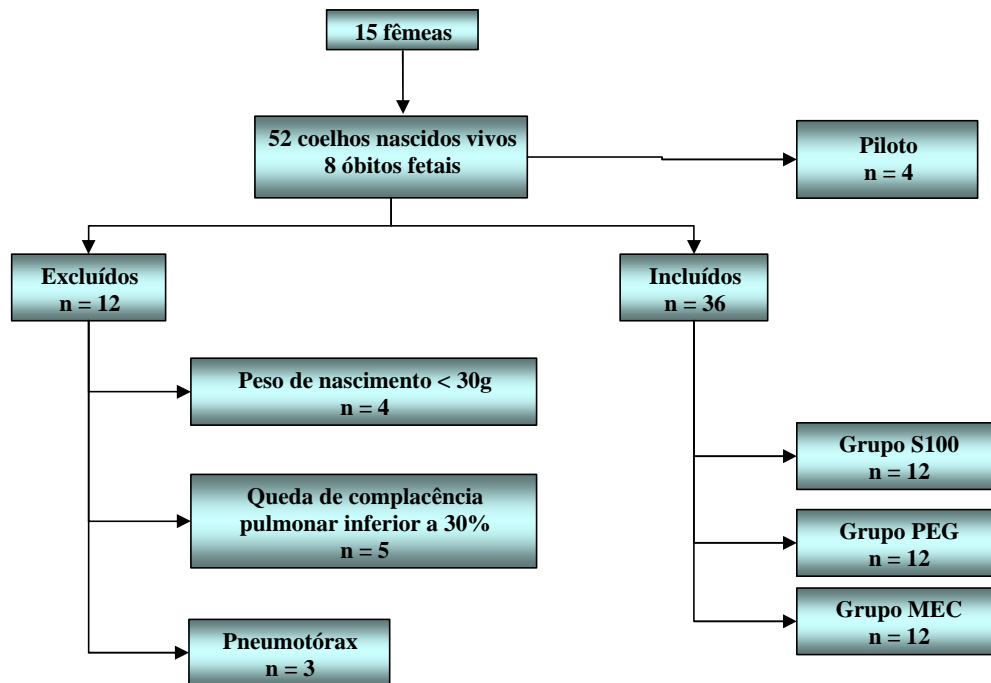


Figura 6. Diagrama de formação dos grupos de estudo.

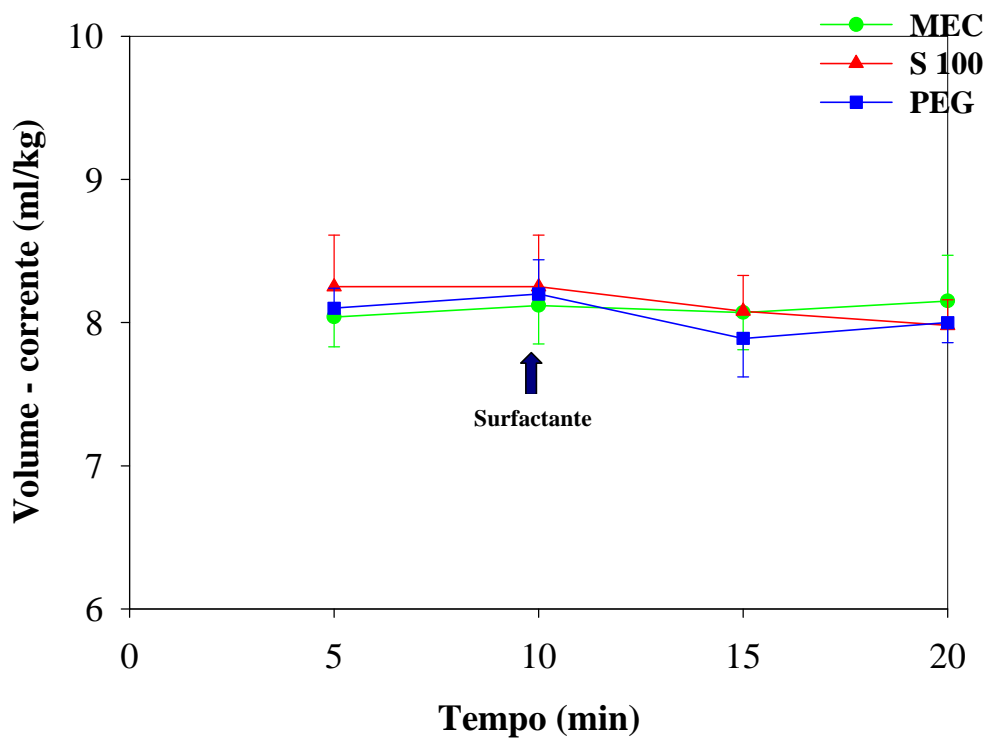


Figura 7. Valores VC dos três grupos durante os 20 minutos de ventilação (média \pm desvio-padrão). O VC variou de 7,8 a 8,2 ml/kg, não havendo diferença entre os 3 grupos estudados.

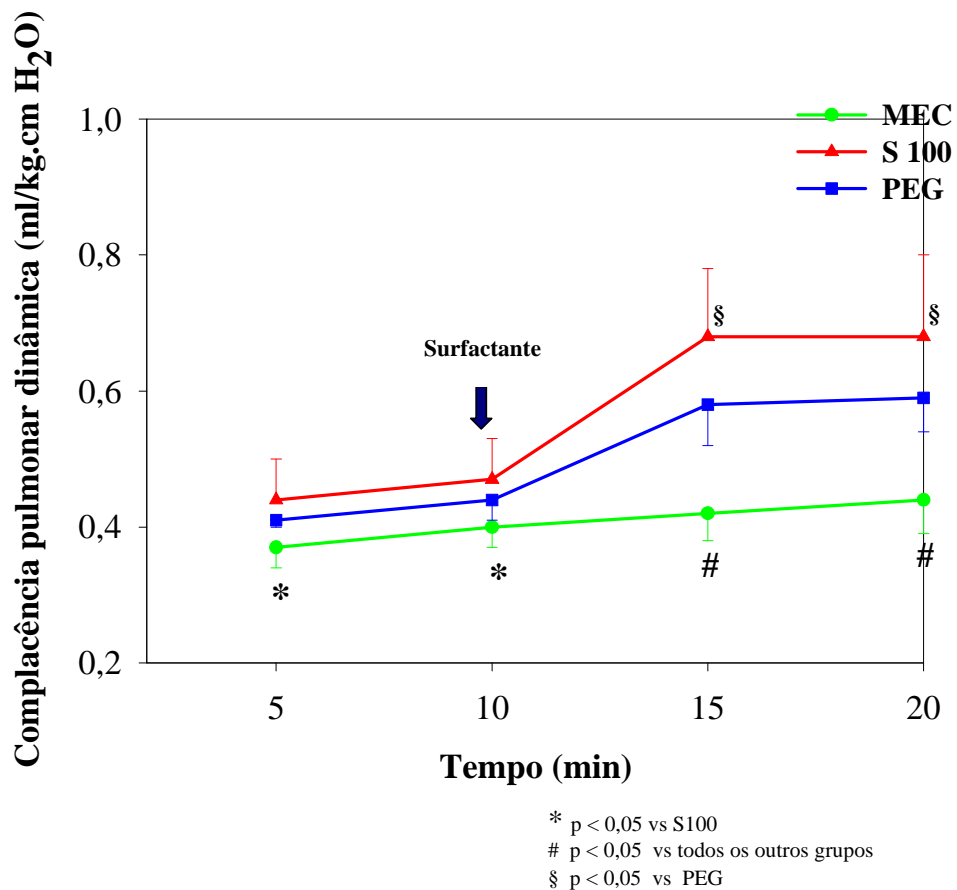


Figura 8. Valores de complacência pulmonar dinâmica (CD) durante os 20 minutos de ventilação (média \pm desvio-padrão). Após administração de surfactante puro (100 mg/kg) ou surfactante adicionado de PEG a 5%, houve melhora da CD em ambos os grupos tratados, porém com valores mais altos no grupo S100 comparado ao grupo PEG.

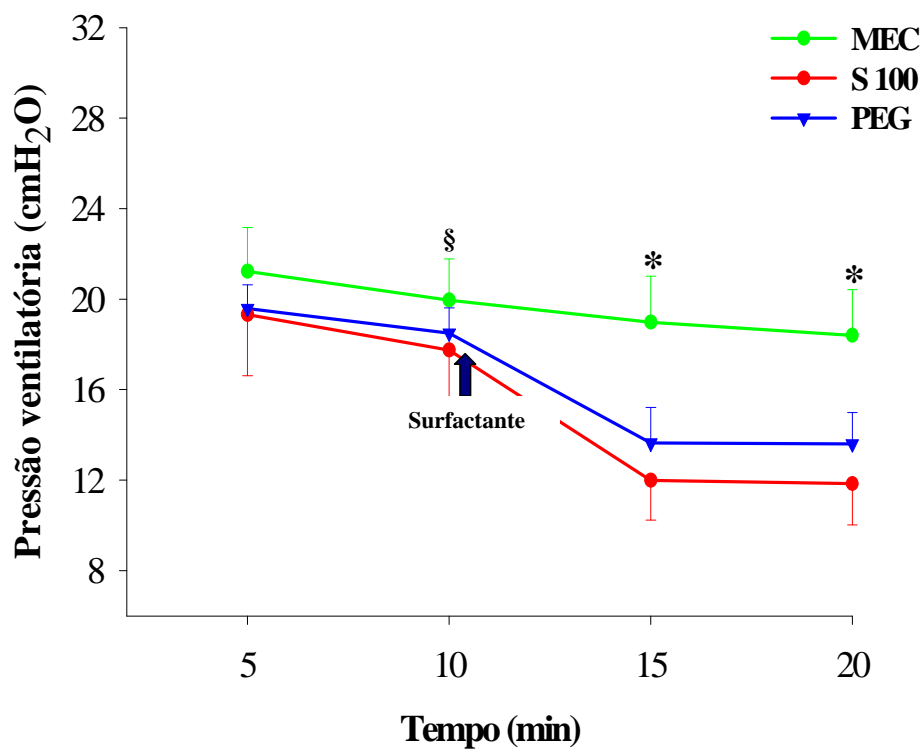
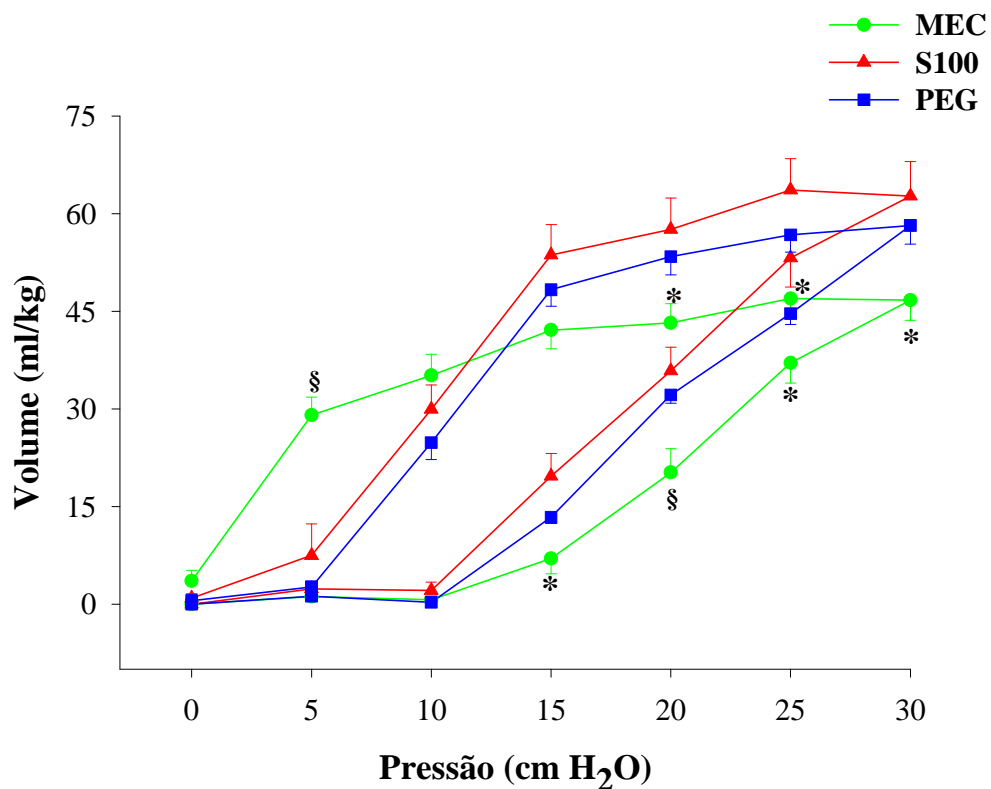


Figura 9. Valores de pressão ventilatória (PV) durante os 20 minutos de ventilação (média \pm desvio-padrão). Após a administração de surfactante puro ou adicionado de PEG, houve redução significativa dos valores de PV necessária para se manter o volume-corrente alvo nos dois grupos tratados, não havendo diferença entre S100 e PEG.



* p < 0,05 vs S100

§ p < 0,05 vs todos os outros grupos

Figura 10. Valores da curva pressão-volume pulmonar durante os 20 minutos de ventilação (média ± erro-padrão). Os animais do grupo MEC necessitaram de pressão mais elevada para iniciar a insuflação pulmonar em relação ao grupo S100. Com pressão de 30 cmH₂O os animais do grupo S100 atingiram maiores valores de volume pulmonar máximo, comparados ao grupo MEC, mantendo esse padrão durante a fase de deflação até a pressão de 20 cm H₂O. Não foram observadas diferenças entre os grupos S100 e PEG em nenhum ponto da curva.

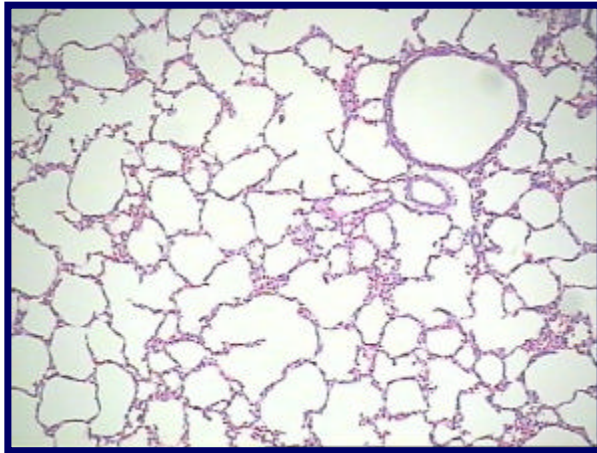


FIGURA 11a. Parênquima pulmonar de um coelho recém-nascido normal mostrando padrão de expansão homogêneo e arquitetura alveolar preservada. Aumento de 100x.

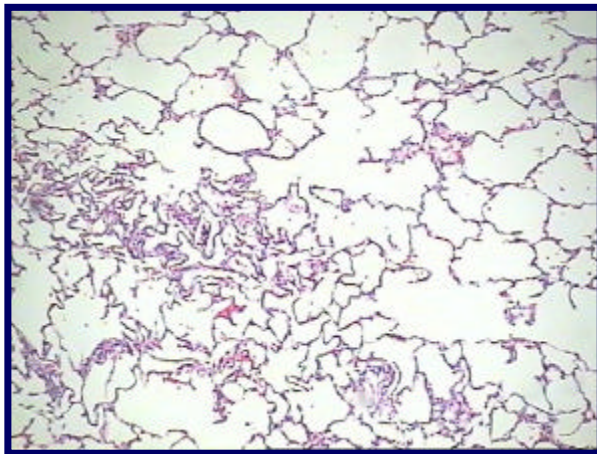


FIGURA 11b. Parênquima pulmonar de um animal do grupo MEC. Observa-se padrão de expansão alveolar heterogêneo, com áreas de atelectasia e hiperinsuflação. Aumento de 100x.

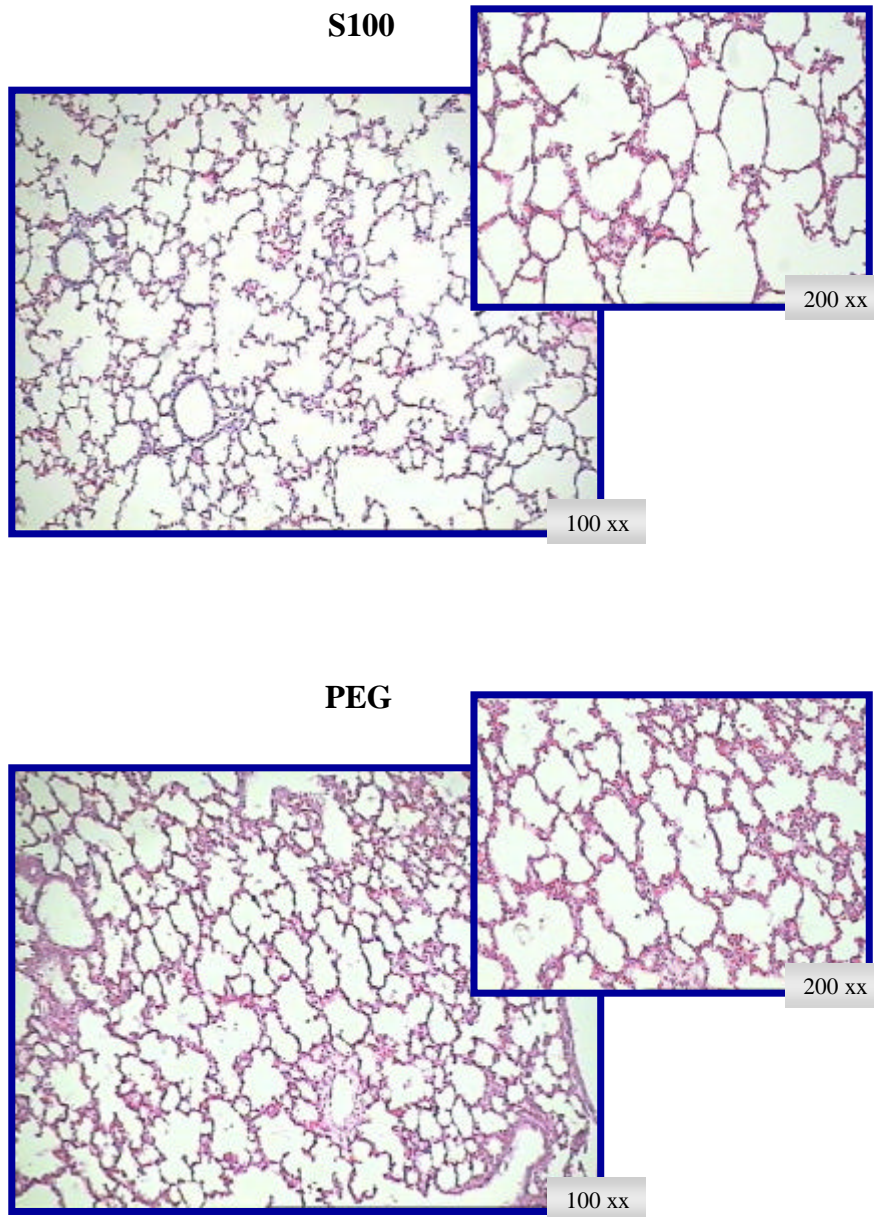


FIGURA 12. Fotografias de lâminas representativas dos grupos S100 e PEG. Após tratamento com surfactante, a arquitetura alveolar está mais próxima do normal e o parênquima pulmonar mais homogêneo.

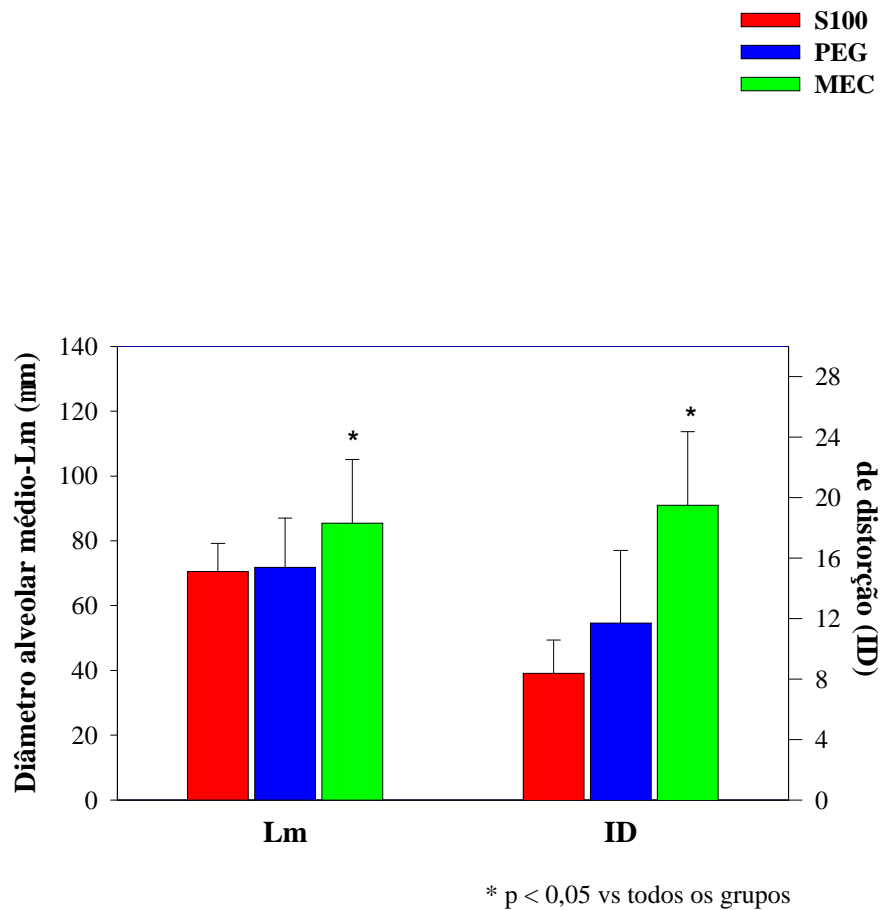


Figura 13. Valores do diâmetro alveolar médio (Lm) à esquerda e do índice de distorção (ID) à direita. Os grupos que receberam surfactante (100 mg/kg) ou surfactante com PEG a 5% apresentaram valores menores de Lm e de ID, denotando menor diâmetro alveolar e padrão de expansão pulmonar mais homogêneo em relação aos animais do grupo MEC.



5.

A realização do presente estudo baseou-se nos conhecimentos acumulados ao longo dos anos com a terapia de reposição de surfactante exógeno para prematuros com SDR, que é considerada um dos maiores avanços da neonatologia. Essa bem-sucedida prática abriu espaço para seu uso como prevenção e tratamento de diversas doenças respiratórias, nas quais a deficiência de surfactante ocorre de forma secundária, em decorrência da sua inativação. Porém nestes casos, devido à inativação do surfactante exógeno, o sucesso terapêutico depende da capacidade dos preparados farmacológicos de surfactante em resistir à inativação (Ochs et al., 2006).

Como tentativa de melhorar a função dos surfactantes diante de seus potenciais inativadores, a literatura propõe novos surfactantes que, modificados na sua forma original, seriam mais eficientes. Estudos recentes têm mostrado que a adição de proteínas recombinantes e análogos sintéticos da SP-A, SP-B e SP-C tornam o surfactante mais resistente à inativação (Herting et al., 2001). Porém esse processo é feito utilizando-se tecnologia avançada, o que determina um produto final comercialmente limitado devido ao alto custo de produção (Ochs et al., 2006).

Uma alternativa possível para esse problema seria a adição de polímeros não-iônicos na composição de surfactantes, na tentativa de incrementar sua função. Neste aspecto os estudos são realizados “in vitro” ou em modelos animais, apresentando resultados conflitantes, o que justifica a amplificação de pesquisas nesta área.

Com relação à escolha do modelo animal, no nosso estudo optamos pelos coelhos recém-nascidos como animais de experimentação, baseados na experiência por nós adquirida em estudo anterior, na possibilidade de comparação dos nossos resultados com dados da literatura e também devido ao fato de as pesquisas com surfactantes modificados realizadas até o momento terem sido feitas com ratos e coelhos adultos, com resultados inconclusivos, o que requer novos testes com diferentes espécies (Dargaville e Morley, 2000). Além disso, os coelhos são animais de pequeno porte, custo reduzido, de manuseio simples, fácil reprodução e apresentam grande número de recém-nascidos por ninhada (Kozma et al., 1974; Henry et al., 1997).

Desde o início da década de 80 vários modelos animais foram desenvolvidos para o estudo dos efeitos do mecônio sobre a função pulmonar e a resposta após a administração de surfactante. Porém esses primeiros experimentos eram feitos com animais adultos, não levando em conta os vários fatores que podem interferir na interpretação dos resultados quando se trata de recém-nascidos, tais como: a adaptação do RN à vida pós-natal, as variações pressóricas intrapulmonares, as propriedades físicas do líquido pulmonar, a estrutura da barreira ar-líquido e as alterações decorrentes de um possível processo asfíxico. Em vista disso vários outros modelos animais foram desenvolvidos e os autores passaram a utilizar animais recém-nascidos para investigar a inativação do surfactante pelo mecônio (Robertson, 1992).

Sun et al. (1993a) desenvolveram um modelo animal para quantificar, sob condições experimentais bem definidas, os efeitos da aspiração de mecônio sobre a

função pulmonar de coelhos recém-nascidos de termo e, posteriormente, os efeitos do tratamento com surfactante em coelhos recém-nascidos com SAM (Sun et al., 1993b).

Em estudo prévio reproduzimos esse modelo experimental, avaliando variáveis de mecânica e histologia pulmonar, após administração de um surfactante suíno em duas diferentes doses, e confirmamos sua utilidade para adequada avaliação das propriedades da mecânica pulmonar e do padrão histológico pulmonar (Lyra et al., 2004).

A indução da SAM nas variadas espécies estudadas é feita por meio da administração intratraqueal de mecônio a fresco ou diluído em solução salina em diversas concentrações (Sun et al., 1993a,b; Lu et al., 2000; Dehority et al., 2005). Rubin (1996) estudou as propriedades físicas do mecônio quando injetado na traquéia de animais de experimentação comparando mecônio a fresco com o reconstituído em solução fisiológica, e mostrou que não há diferenças no que diz respeito às características de transporte através das vias aéreas pelos movimentos muco-ciliares e nem quanto a adesividade do mecônio à superfície da via aérea. O autor sugere que o mecônio diluído seria o mais indicado para experimentos em laboratório, por mimetizar o que ocorre na clínica, onde a aspiração seria de mecônio diluído no líquido amniótico. Na maioria dos estudos o modelo de SAM é obtido utilizando-o de forma diluída em solução salina nas concentrações de 65 ou 130 mg/ml, sendo que não há diferença entre elas no que diz respeito à diminuição da complacência pulmonar (Sun et al., 1993a). Em nosso estudo utilizamos a menor concentração (65 mg/ml), que é menos viscosa, tornando mais fácil e reprodutível a administração do mecônio em cânula traqueal de diâmetro interno reduzido e, além disso, optamos pela forma de preparo e administração do mecônio na qual a diluição inicial e filtração eliminam as partículas maiores que 3

micrômetros, o que permite distribuição mais homogênea do mecônio, evitando obstrução das vias aéreas e possibilitando focalizar seus efeitos em relação à inativação do surfactante na luz alveolar (Sun et al., 1993b). Após a filtração o mecônio foi submetido ao processo de liofilização, o que facilita a estocagem do material com manutenção de suas propriedades bioquímicas. O volume de mecônio utilizado foi determinado a partir de estudos em ratos adultos com SAM, onde a diminuição dos valores de complacência pulmonar igual ou superior a 30 % em relação ao grupo-controle, que é o parâmetro utilizado para se considerar a indução da SAM, ocorreu após dose de 6 ml/kg (Sun et al., 1994).

A condição de base dos pulmões, a natureza do sistema surfactante endógeno, assim como vários componentes do ambiente intra-alveolar influenciam as propriedades metabólicas e biofísicas do surfactante exógeno, interferindo com sua ação final (Lewis et al., 1995). Esse é um fator importante a ser considerado na escolha do tipo de surfactante a ser utilizado em diferentes doenças pulmonares e também na interpretação dos resultados de estudos com animais de experimentação. O estudo de Puligandla et al. (2000) mostra que a eficácia do surfactante exógeno usado no tratamento clínico ou experimental dos diversos tipos de doença pulmonar depende do tipo de lesão pulmonar de base. Os autores provocaram a SDRA em coelhos adultos de 3 diferentes formas e compararam com um grupo-controle, observando diferenças no “pool” total de surfactante, na concentração de proteínas e lipídios, assim como diferentes porcentagens de grandes agregados e de SP-A recuperados por meio de lavagem traqueobrônquica nos diferentes grupos estudados. Os resultados desse estudo sugerem que um importante

fator a ser considerado parece ser a SP-A, cuja concentração influencia diretamente a taxa de conversão de grandes agregados.

Vários estudos que utilizam o modelo de coelhos recém-nascidos com SAM comprovam a inativação do surfactante “in vivo” e demonstram que a administração de surfactantes naturais, contendo fosfolipídios, SP-B e SP-C, melhora a função pulmonar e a oxigenação na SAM. Herting et al. (2001) compararam os efeitos inibitórios do mecônio sobre diversos tipos de surfactantes exógenos existentes no mercado e outros ainda em fase de pesquisa, por meio da medida da tensão superficial em surfactômetros desenvolvidos para este fim. Os autores mostram que os vários surfactantes testados reagem de forma diferente à inibição pelo mecônio, conforme o tipo e a concentração das apoproteínas de sua constituição, mas o Survanta[®] e o Curosurf[®] foram inibidos de forma semelhante quando em contato com a mesma concentração de mecônio. No estudo de Seeger et al. (1993) o Alveofact[®] (obtido por lavagem broncoalveolar) foi mais resistente ao efeito inibitório do fibrinogênio e albumina, comparado ao Survanta[®] e o Curosurf[®] (obtidos por macerado de pulmão), provavelmente devido à sua maior concentração de SP-B. No nosso experimento utilizamos um surfactante produzido com tecnologia nacional pelo Instituto Butantan, cuja eficácia já foi demonstrada no tratamento de SDR em coelhos prematuros (Arcas et al., 2000) e no tratamento de coelhos a termo com SAM (Lyra et al., 2004). O estudo da eficácia do surfactante do Butantan faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria da FMUSP. Atualmente esse surfactante está sendo testado em RN humanos num estudo clínico

multicêntrico brasileiro. Em estudo piloto (dados não publicados), utilizando o mesmo modelo experimental e avaliando os mesmos parâmetros de mecânica pulmonar, observamos que o surfactante Butantan tem efeito semelhante ao Curosurf[®], que é uma preparação disponível no mercado brasileiro, com melhora dos valores de complacência pulmonar dinâmica e redução dos níveis de pressão ventilatória.

As doses de surfactante habitualmente utilizadas nos experimentos em animais com SAM, com deficiência qualitativa de surfactante, variam em torno de 100 a 200 mg/kg (Sun et al., 1993a,b; Sun et al., 1996). Esse valor baseia-se no “pool” de surfactante pulmonar do RN a termo normal (Rebello et al., 1996) e nas doses habitualmente recomendadas para tratamento de prematuros com SDR que apresentam deficiência primária de surfactante pulmonar (Soll, 2006).

Dados da literatura mostram que as propriedades inativadoras do mecônio sobre o surfactante exógeno é dose-dependente, ou seja, são minimizadas na medida em que se aumenta a concentração de surfactante (Moses et al., 1991; Bae et al., 1998). Melhor resposta sobre a mecânica pulmonar foi obtida após dose de 200 mg/kg, comparada à dose de 100 mg/kg, no modelo de ratos com SAM (Sun et al., 1994), porém, no nosso estudo prévio em coelhos recém-nascidos não encontramos diferenças nos parâmetros de mecânica pulmonar e no padrão histológico dos pulmões com SAM após administração de 100 ou 200 mg/kg de surfactante (Lyra et al., 2004). Desta forma, como nossa intenção no atual estudo era de avaliar os possíveis efeitos da adição de PEG sobre a inativação do surfactante, optamos pela menor dose (100 mg/kg), a fim de maximizar os possíveis efeitos da adição de PEG sobre a função do surfactante exógeno.

Com relação à forma de administração do surfactante, alguns autores sugerem que seja feita por meio de lavagem traqueobrônquica com surfactante diluído em solução fisiológica (Ohama e Ogawa, 1999; Lam et al., 2000; Strohmaier et al.). Porém essa prática é questionada por outros que acreditam que a lavagem com grande quantidade de fluidos possa causar lesão do epitélio pulmonar e sobrecarregar o sistema cardiovascular dos RN (Kattwinkel, 2002). Alguns estudos delineados para verificar qual a melhor forma de administração de surfactante em coelhos mostram melhor distribuição dos fosfolípidios após administração em “bolus” (Segerer et al., 1993; 1996).

Não existe na literatura padronização de parâmetros ventilatórios a serem utilizados em modelos de animais com SAM. Diferentes modos de ventilar podem resultar em diferentes respostas após tratamento com surfactante. Desta forma há grande variação entre os estudos, sendo que os valores são adaptados de acordo com os objetivos de cada um (Henry et al., 1997). Sun et al. (1993b) utilizaram em coelhos recém-nascidos FR de 40 incursões por minuto (ipm), PEEP de zero, FiO₂ de 1,0 e relação I:E de 1:1; ajustando o PIP a cada 15 minutos para atingir volume-corrente pré-estabelecido de 8 a 10 ml/kg. Posteriormente esses autores utilizaram os mesmos parâmetros de FR e FiO₂ em ratos adultos mas, desta vez, fixaram o PIP e a PEEP inicialmente em 10 e 0 cm H₂O, com posterior aumento para 28 e 5 cm H₂O respectivamente, e observaram as variações no volume-corrente. Os resultados mostraram que níveis maiores de PIP são necessários para assegurar VC superior a 6 ml/kg, que é essencial para a sobrevivência dos animais nestas condições (Sun et al., 1993a;

1994). Wiswell et al. (1992) induziram a SAM em cobaias com idades entre 1 e 4 dias de vida. Foram necessários PIP de 28 cm H₂O, PEEP de 4 cm H₂O, FR de 40 ipm e FiO₂ de 0,75 para manter a PaO₂ entre 80 e 120, e a PaCO₂ entre 30 e 50 mmHg. Em outro estudo com ratos adultos (Sun et al., 1996), foi proposta uma forma de ventilação que mimetizasse a prática clínica, ajustando-se os parâmetros do ventilador de acordo com a monitorização dos gases sanguíneos. Para isso foram determinados valores-alvo dos gases arteriais (PaO₂ de 80-150; PaCO₂ de 50-80 mmHg e pH de 7,3-7,5). Nos animais que desenvolveram SAM os parâmetros necessários foram: FiO₂ = 1,0; PIP = 32-38 cm H₂O e PEEP = 6-8 cm H₂O.

Embora a FR de 60 ipm que foi utilizada no nosso estudo possa parecer elevada, é importante lembrar que o tipo de lesão pulmonar que nosso modelo propõe, procura excluir o efeito obstrutivo do mecônio, uma vez que esse passa pelo processo de filtração, que elimina grandes partículas com potencial efeito obstrutivo. Além disso, segundo dados de literatura, a FR normal de um coelho recém-nascido varia de 30 a 60 ipm, podendo alcançar até 100 ipm nas primeiras horas de vida (Kozma et al., 1974).

Em relação ao volume-corrente, estudos recentes mostram que a utilização de valores elevados causa superdistensão alveolar com conseqüente lesão pulmonar, principalmente em pulmões com deficiência de surfactante, edema ou atelectasia (Auten et al., 2001). Pacientes com SDRA, ventilados com VC = 12ml/kg, apresentaram maior mortalidade em relação àqueles ventilados com 6 ml/kg (39,8% vs 31%, p = 0,007) (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000). Embora se saiba que elevados volumes-corrente devem ser evitados, os métodos específicos para aplicação deste

conceito precisam ser definidos, tanto para uso clínico quanto experimental (Clark et al., 2000). Estudo de Rider et al. (1992) em coelhos prematuros mostrou que VC de 8 ml/kg foi suficiente para manter valores de PaCO₂ dentro de limites normais. Com base nestes estudos, e também em dados da prática clínica, no presente estudo fixamos o volume-corrente em 8 ml/kg, fazendo os ajustes necessários nos valores do PIP para assegurá-lo, e assim obter ventilação homogênea de todos os animais estudados. Nossos resultados mostraram que este objetivo foi alcançado, uma vez que o VC manteve-se constante e sem diferença entre os 3 grupos, durante todo o período de ventilação.

Apesar do potencial efeito tóxico para o pulmão, decorrente do uso de altas concentrações de oxigênio, a FiO₂ foi mantida em 1,0, pois permite maior sobrevida dos animais que recebem mecônio na traquéia (Sun et al., 1993b; Clark et al., 2000). Além disso, Crapo et al. (1986) estudaram a evolução da lesão pulmonar em ratos expostos a altas concentrações de O₂ por período prolongado e observaram que nas fases iniciais não houve alterações morfológicas, apenas bioquímicas.

Fixamos o tempo de ventilação em 20 minutos, uma vez que os efeitos inibitórios do mecônio sobre a função do surfactante são imediatos e a melhora dos valores de volume pulmonar e da mecânica respiratória ocorre logo após o tratamento com surfactante (Robertson e Lachmann, 1988), permitindo que o uso de curto período de ventilação seja suficiente para responder à pergunta formulada (Moses et al., 1991; Sun et al., 1993b; 1994; 1996). Além disso, tempo de ventilação superior a 30 minutos relaciona-se com maior prevalência de pneumotórax e mortalidade mais elevada neste modelo animal (Sun et al., 1991). Nossos resultados confirmaram esses dados mostrando que, imediatamente após infusão de mecônio na traquéia, os animais apresentaram

diminuição da complacência pulmonar, com maior necessidade de pressão ventilatória, comparados aos valores considerados normais para animais sadios e apresentaram imediata melhora após a administração de surfactante, com sobrevida de 100 % durante o período de ventilação.

A idéia de tornar o surfactante mais resistente à inativação data do final da década de 1990, quando Sun et al. (1997) mostraram que a adição de SP-A ao surfactante natural de origem suína (Curosurf[®]) o torna mais efetivo no tratamento da SAM em ratos, quando comparado ao produto puro. Mais tarde, Taeusch et al. (1999), baseados neste conceito e, considerando que a SP-A é uma proteína que contém carboidrato na sua composição (glicoproteína), elaboraram um estudo para explorar os efeitos de açúcares simples, polímeros de açúcar e polímeros não-iônicos, na inativação do surfactante pelo mecônio. Os resultados mostram que o dextran e o PEG revertem a inativação do Survanta[®] pelo mecônio “in vitro”.

A partir desses dados iniciais, a adição de polímeros não-iônicos ao surfactante tem sido objeto de estudo por diferentes autores e os resultados de testes biofísicos e experimentos com animais mostram que os polímeros podem restabelecer a função do surfactante a valores próximos do normal, incrementando a função das apo-proteínas, melhorando assim as propriedades adsortivas e a estabilidade da monocamada de surfactante durante a compressão, observando-se ainda que esses efeitos não se restringem apenas a um tipo de inibidor ou a um modo único de inibição (Dargavile e Morley, 2000). Porém a interpretação desses resultados é difícil devido à falta de uniformidade desses estudos, que utilizam diferentes concentrações de surfactante e de

inibidores e diversos polímeros com variados pesos moleculares e concentração. Tashiro et al. (2000) usaram dextran com peso molecular de 67 kDa em uma concentração de 10 mg/ml para avaliar seu efeito protetor sobre a inativação do surfactante pelo mecônio. Tausch et al. (1999) também utilizaram o mecônio como agente inativador, mas optaram por testar dextran com peso molecular de 9 kDa, com concentrações de surfactante de 1,25 mg/ml versus 5 mg/ml. Em outro estudo, Lu et al. (2000) estudaram as propriedades anti-inibitórias do PEG e do dextran utilizando o modelo de SAM em ratos adultos.

Como já visto, o modelo animal usado pode afetar a resposta ao surfactante adicionado de polímero, pois diferentes tipos de lesão pulmonar produzem diferentes ambientes alveolares. Por exemplo, no modelo animal de SDRA por meio de lavagem bronco-alveolar ocorre remoção do surfactante, enquanto no modelo de SAM ocorre inativação, mas não remoção (Dehority et al., 2005). Esse fato faz diferença quando se escolhe o tipo de polímero que se deseja estudar. Kobayashi et al. (1999) mostraram que o dextran restabelece a atividade do surfactante após inibição com albumina. Já no estudo de Lu et al. (2000) os autores analisaram os efeitos do tratamento com surfactante adicionado de dextran comparado ao tratamento com surfactante puro em ratos com SAM e não encontraram diferenças em relação aos parâmetros avaliados. Especula-se que esse achado possa ser explicado pelo fato da aspiração de mecônio representar uma forma mais potente de inativação do surfactante do que aquela que ocorre no modelo de inativação causado pela albumina. Baseados nestes dados, optamos em nosso estudo por utilizar o PEG como adjuvante na função do surfactante inibido pelo mecônio.

Diversos estudos concluem que o melhor efeito do PEG adicionado ao surfactante requer uma concentração ótima do polímero que, por sua vez, depende do peso molecular deste, porém sem consenso quanto aos valores ideais (Meyuhas et al., 1996; Ruppert et al., 2003; Yu et al., 2004). Em nosso estudo utilizamos o PEG de 15 kDa orientados pelo estudo de Tausch et al. (1999), que mostrou que o PEG adquire função quando utilizado com peso molecular acima de 3 kDa.

O PEG é um polieter neutro biocompatível, cuja fórmula é $H(OCH_2CH_2)_nOH$. Essa substância em temperatura ambiente é totalmente solúvel em água e em alguns solventes orgânicos, não é tóxica e é aprovada para consumo humano interno. Devido à sua característica de promover fusão celular tem grande uso industrial, em pesquisas de laboratório e em biotecnologia com diversas aplicações médicas. O PEG faz ligações covalentes com lipídios, aumentando a vida média de lipossomos, o que justifica seu uso como veículo de algumas drogas. Faz também ligação covalente com proteínas, não afetando a atividade biológica destas, mas podendo diminuir sua imunogenicidade (Winterhauer et al., 1995).

Estudo “in vitro” de Tausch et al. (1999) mostra as medidas de tensão superficial (TS) do surfactante puro (Survanta[®]), do surfactante adicionado de PEG e do PEG puro em mistura com o mecônio. O surfactante (concentração de 1,25 mg/ml) apresenta valores de TS em torno de 30 mN/m, que são muito maiores que os valores fisiológicos considerados normais (<10 mN/m). Quando se adiciona PEG (peso molecular de 10 kDa, na concentração de 5%) ao surfactante, a TS diminui para valores próximos a 1 mN/m. No caso da mistura de PEG (sem surfactante) com o mecônio a TS é mantida em valores superiores a 40 mN/m. Ainda neste estudo foi verificado que o

efeito do PEG na prevenção da inativação pelo mecônio ocorreu com peso molecular do polímero superior a 3 kDa em concentrações maiores que 5% (massa/volume). No estudo de Yu et al. (2004) o PEG foi adicionado a um surfactante de origem bovina e mostrou bom desempenho com pesos moleculares de 8 a 35 kDa.

O mecanismo pelo qual o PEG previne ou reduz a inativação do surfactante pelo mecônio não está plenamente esclarecido, sendo ainda objeto de especulações, uma vez que a interação PEG-surfactante é bastante complexa e pouco compreendida. É provável que esta ação ocorra por meio de vários processos. Em concentrações acima de 5% os polímeros aumentam seu volume molecular e, por força de seu efeito osmótico, dependendo de sua concentração, causam desidratação dos espaços entre as vesículas de lipídios, criando as chamadas forças de depleção ou de atração que induzem melhor agregação desses lipídios (formação de grandes agregados), permitindo assim que maior concentração deles esteja disponível para a adsorção na interface ar-líquido. O aumento da taxa de adsorção tem papel muito importante do ponto de vista fisiológico, uma vez que o filme de surfactante deve ser formado rapidamente durante a abertura inicial dos pulmões. Esse processo se dá por meio da ligação da molécula de oxigênio presente no PEG ao radical hidrogênio da molécula de água. Assim a adição de polímero a uma solução de lipídios causa ruptura do balanço osmótico do sistema coloidal, induzindo a formação de duas fases distintas: uma fase rica em lipídios e uma fase rica em polímeros (Meyuhas et al., 1996; Yu et al., 2004). A presença do PEG em soluções contendo surfactante e mecônio faz com que os componentes do mecônio fiquem concentrados na fase rica em polímero. Em outras palavras, o PEG atuaria mantendo fisicamente separados os componentes do mecônio (potencialmente inativadores do surfactante) dos

componentes do surfactante. Avaliações feitas com microscopia eletrônica mostram que o PEG está associado a mudanças estruturais do surfactante, que deixa de apresentar formato de vesículas, passando a assumir um aspecto estrutural de membranas espessas, o que melhora sua atividade “in vitro” (Taeusch et al., 1999, Dehority et al., 2005).

Os nossos resultados não mostraram melhor atividade do surfactante quando adicionado de PEG. Após administração de surfactante com ou sem PEG aos animais com SAM observou-se diminuição dos valores de pressão ventilatória, sem diferença entre S100 e PEG quando comparados ao grupo sem tratamento. Porém, embora os dois grupos tratados tenham mostrado melhora na complacência pulmonar, o grupo S100 apresentou valores significativamente mais elevados do que o grupo PEG. Nossos resultados diferem dos obtidos por Lu et al. (2000), que utilizaram modelo de SAM em ratos adultos. Nesse estudo o tratamento com surfactante (50 mg/kg) adicionado de PEG (5%; 10 kDa) teve melhores resultados que o tratamento com surfactante puro (50 ou 100 mg/kg) em termos de pressão ventilatória, complacência pulmonar e oxigenação. Comparando-se especificamente os valores de PV pré e pós-tratamento, o estudo mostra uma diminuição dos valores de PV da ordem de 24% no grupo surfactante + PEG e de 9,5% no grupo surfactante. No nosso estudo estes valores foram de 26% e 33% respectivamente. Já o estudo de Campbell et al. (2002) apresenta resultados comparáveis aos nossos, mostrando que coelhos adultos com SDRA tratados com surfactante (100 mg/kg) tiveram desempenho idêntico ao grupo de animais tratados com surfactante na mesma dose adicionado de PEG (5%; 10 kDa), no que diz respeito aos valores de PIP após tratamento. Também foi observada piora da oxigenação ao longo do período de

ventilação no grupo que recebeu surfactante e PEG, comparado ao grupo tratado apenas com surfactante.

Na complementação da avaliação da mecânica pulmonar realizamos a curva P-V. O comportamento elástico do pulmão é caracterizado pela relação entre a pressão e o volume durante a insuflação e deflação do pulmão. A curva P-V reflete essa relação de mudança no volume pulmonar em resposta à variação da pressão de distensão, o que define a complacência pulmonar estática. Durante a realização da curva P-V, inicialmente há necessidade de uma determinada pressão para abrir o pulmão na fase de insuflação e a manutenção de uma pressão para mantê-lo aberto; quando a pressão é removida ocorre a fase de deflação pulmonar, que obedece a uma curva com morfologia diferente da curva de insuflação. Isso ocorre graças às inter-relações entre o surfactante, a estrutura pulmonar e a parede torácica que, atuando conjuntamente, conferem ao pulmão a propriedade de, uma vez insuflado, manter-se aberto durante a fase de exalação. Esta estabilidade alveolar durante a expiração define a capacidade residual funcional (Cardoso, 1987; Auten et al., 2001).

Em nosso estudo observamos que a pressão de abertura pulmonar foi maior para o grupo sem tratamento em relação ao grupo de animais que foram tratados com 100 mg/kg de surfactante. Na pressão máxima de 30 cmH₂O e durante a fase de deflação pulmonar, até a pressão de 20 cmH₂O, os animais tratados apresentaram volumes pulmonares maiores que os não-tratados, porém com significância estatística apenas entre S100 e MEC. Um achado não esperado foi o volume pulmonar maior no grupo com aspiração de mecônio na pressão de deflação de 5 cmH₂O. Este resultado poderia ser explicado por uma possível falha no procedimento de filtragem do mecônio,

permanecendo partículas grandes que obstruiriam a via aérea e, por um mecanismo de válvula, causariam aprisionamento de ar. Porém a análise histológica feita em estudos anteriores, que utilizaram essa mesma técnica de preparo e administração do mecônio, não mostrou presença de qualquer indício de mecônio nas vias aéreas de condução, o que torna esta explicação inconsistente (Sun et al., 1993a,b). No nosso estudo também não foi encontrado mecônio obstruindo as vias aéreas, porém não foi utilizada coloração específica para identificação dessa substância (Martinez-Burnes et al., 2002). Outra possibilidade que pode ser especulada, e que nos parece mais adequada, é a de um possível mecanismo de obstrução causado pela maior quantidade de líquido pulmonar viscoso presente neste grupo, o que dificultaria a saída de ar. Isso já foi demonstrado em laboratório onde animais com aspiração de mecônio, que não recebem tratamento com surfactante, apresentam lesão pulmonar progressiva com passagem de proteínas dos vasos para o alvéolo e conseqüente edema alveolar (Sun et al., 1994). Esse efeito pode ser imperceptível nos pontos de pressões maiores, na fase de deflação pulmonar da curva P-V, sendo evidenciado apenas com baixas pressões (Enhörning e Robertson, 1972), o que condiz com o achado do nosso estudo, onde o volume pulmonar dos animais do grupo MEC foi mais elevado do que os volumes pulmonares dos animais dos grupos S100 e PEG, apenas na pressão de 5 cmH₂O. A presença de excesso de líquido nos pulmões dos animais não-tratados poderia ser confirmada comparando-se os pesos dos pulmões dos diferentes grupos, porém no nosso estudo não foi realizada essa medida.

Em dois estudos onde foi realizada a curva P-V os volumes pulmonares com pressão de 30 cmH₂O foram significativamente mais elevados nos grupos que receberam surfactante adicionado de PEG, comparados àqueles que receberam apenas surfactante

(Lu et al., 2000; Dehority et al., 2005). Porém em outro estudo mais recente os autores não encontram diferenças na curva P-V de animais tratados com Curosurf[®] ou Curosurf[®] adicionado de PEG (Lu et al., 2005b). Cabe notar que, além de os estudos utilizarem espécies animais, modos de inibição, tipo de surfactante, tempo e estratégia ventilatória diferentes, as doses de surfactante utilizadas foram bem menores do que as habitualmente utilizadas. Por exemplo, no estudo de Lu et al. (2000) a melhora dos valores de volume pulmonar ocorreu quando se comparou um grupo tratado com surfactante (50 mg/kg) adicionado de PEG com um grupo tratado apenas com surfactante na mesma dose. Quando se compara com o grupo que recebeu surfactante (sem PEG) na dose de 100 mg/kg, não se observa essa diferença.

A avaliação histopatológica dos pulmões mostrou que os dois grupos que receberam tratamento com surfactante independentemente da adição de PEG apresentaram maior homogeneidade no padrão de expansão pulmonar, com menos áreas de atelectasia e hiperinsuflação, comparados ao grupo sem tratamento, o que foi evidenciado pelo cálculo do índice de distorção. Nenhum dos estudos “in vivo” com PEG realizou a avaliação do Lm e do ID. Lu et al. (2000) observaram menor presença de membranas hialinas no grupo de animais tratados com surfactante e PEG, comparados ao grupo tratado com surfactante apenas. Outros experimentos avaliaram a presença de hemorragia, atelectasia e leucócitos por meio de microscopia óptica em pulmões de animais com SDRA ou SAM tratados com surfactante ou surfactante com PEG, e não encontraram diferenças entre esses dois grupos (Dehority et al., 2005; Lu et al., 2005b). Diversos estudos (Sun et al., 1993a,b; Sun et al., 1994; Sun et al., 1996; Lyra et al., 2004) mostram que o mecônio tem uma distribuição não-uniforme pelos segmentos

pulmonares, alternando áreas de atelectasia e hiperinsuflação com áreas de diâmetro alveolar normal. Essa característica torna a simples avaliação do diâmetro alveolar médio insuficiente para se estudar histologicamente um pulmão tão heterogêneo, sendo importante a análise do índice de distorção. Esse índice detecta mudanças na morfologia tecidual e é utilizado para avaliar o padrão de atelectasia e hiperinsuflação, e a variação campo-a-campo do tamanho alveolar (Eidelman et al., 1993; Dolhnikoff et al., 1997).

Nossos resultados mostraram que, no modelo proposto, a adição de PEG ao surfactante não trouxe qualquer vantagem no que se refere à melhora da atividade deste sobre os parâmetros avaliados. Analisando-se especificamente os efeitos dos dois tipos de tratamento sobre a complacência pulmonar, observamos valores mais baixos quando se adicionou PEG ao surfactante. Esses resultados devem ser avaliados sob a luz de algumas limitações presentes no nosso estudo. O primeiro ponto a ser considerado refere-se ao tempo de ventilação. Optamos por um tempo curto, que é suficiente para avaliar os efeitos imediatos dos tratamentos propostos sobre a inativação do surfactante, sem perda dos animais, mas não permite observar se esses efeitos obtidos se sustentam ou não ao longo do tempo. Outro ponto importante que não avaliamos foi o efeito dos tratamentos sobre os gases sanguíneos, o que é objeto de grande controvérsia na literatura. No estudo de Lu et al. (2000) observou-se melhora da oxigenação nos animais com SAM após a administração de surfactante e PEG. O mesmo não ocorreu após dose de surfactante puro. Interessantemente, Campbell et al. (2002) encontraram resultados opostos: após a administração de surfactante (100 mg/kg + PEG) houve deterioração da oxigenação em coelhos adultos com SDRA. Já no estudo de Dehority et al. (2005) ratos com SDRA tiveram melhora da oxigenação sanguínea, utilizando Survanta[®] ou com

Survanta[®] com PEG, sem diferenças entre os dois grupos. No modelo utilizado por nós a gasometria poderia ter sido feita por meio da coleta de sangue da cavidade intracardíaca no momento do sacrifício, porém nosso laboratório não dispunha de condições técnicas para realização do exame com alíquotas reduzidas de sangue.

Os resultados do nosso estudo podem ter sido influenciados pelo peso dos animais nos 3 diferentes grupos. Embora a análise estatística tenha mostrado que os grupos são homogêneos quanto ao peso de nascimento, houve uma tendência de animais menores no grupo S100. Dados da literatura corroboram que a restrição de crescimento intra-uterina pode causar repercussões sobre a produção e a qualidade final do surfactante, principalmente no que se refere ao conteúdo lipídico (Chen et al., 2004). Cabe ressaltar que nós excluimos os animais com peso de nascimento inferior a 30g. Segundo dados da literatura, o peso de nascimento de coelhos recém-nascidos varia de 30 a 70 g (média de 40 a 50 g), sendo considerado o valor de 45 g como um desvio-padrão abaixo da média, e o valor de 30 g como dois desvios-padrão abaixo da média. Sendo assim, animais com peso de nascimento maior ou igual a 30 g são considerados adequados para a gestação a termo (Kozma et al., 1974).

Estudos experimentais mostram que o tipo de surfactante utilizado interfere na ação do PEG (Seeger et al., 1993; Herting et al., 2000). Estudos “in vitro” sugerem que o PEG é mais efetivo quando misturado ao Survanta[®] do que ao Curosurf[®] (Lu e Taeusch, 2001). Lu et al. (2005b) compararam a resposta à terapia do PEG adicionado ao Curosurf[®] após lesão pulmonar pelo mecônio, observando que houve melhora inicial dos valores de PV, capacidade pulmonar total e oxigenação, porém esse efeito não se sustentou até o final do período de ventilação. Nós utilizamos o surfactante Butantan,

que é um surfactante de origem suína e com composição semelhante ao Curosurf[®], o que pode ter contribuído para a resposta que obtivemos.

Outra possível explicação para a falta de efeito do PEG pode estar relacionada à viscosidade da mistura surfactante/PEG. Dependendo da concentração de PEG, pode-se obter uma mistura com elevada viscosidade, o que dificultaria a distribuição efetiva do surfactante na via aérea distal (Dargaville e Morley, 2000). Yu et al. (2004) observaram que, quanto maior a concentração de PEG, maior a viscosidade da mistura, o que diminui a ação do PEG e dificulta a instilação na via aérea do animal. No nosso estudo utilizamos uma concentração previamente testada “in vitro”, porém não existe na literatura informação precisa sobre o valor da viscosidade da solução de surfactante adicionado a PEG a 5%. Com relação ao peso molecular do PEG também nesse aspecto há controvérsias na literatura. De acordo com alguns estudos, o PEG com peso molecular de até 10 kDa mostrou-se efetivo (Taeusch et al., 1999). Já o PEG com peso molecular de 20 kDa não induz agregação de lipídios, pois moléculas grandes tendem a favorecer ligações entre os próprios polímeros, deixando de interagir com as moléculas de água e de lipídios (Ruppert et al., 2003). Porém o PEG de 15 kDa, que foi por nós utilizado, nunca foi avaliado de forma específica em estudos “in vitro” ou em animais. Desta forma existe a possibilidade desse fator ter interferido nos nossos resultados.

Outro dado a ser considerado na interpretação dos nossos resultados se refere à técnica de preparo e adição do PEG ao surfactante. Utilizamos o procedimento onde o polímero, na forma de cristal, é adicionado diretamente na solução de surfactante. Esse processo foi utilizado em outros estudos, resultando uma mistura final com propriedades adequadas e função testada tanto “in vitro” como “in vivo” (Taeusch et al., 1999; Lu et

al., 2001b). Porém recentemente outros autores sugerem que o PEG seja diluído previamente em solução fisiológica antes da mistura com o surfactante, na tentativa de otimizar sua função no alvéolo (Dehority et al., 2005).

Por fim não julgamos necessária a inclusão de um grupo de estudo que recebesse apenas o PEG, pois diversos estudos mostram que o polímero administrado de forma isolada no alvéolo não tem nenhum efeito, com comportamento igual à salina (Lu et al., 2000; 2001a; 2005b).

5.1) Considerações finais

A avaliação dos nossos resultados, juntamente com uma avaliação criteriosa dos poucos estudos da literatura, permitem a conclusão de que a ação do PEG como adjuvante na terapia de doenças com deficiência secundária do surfactante requer ainda muitos esclarecimentos. Um questionamento importante diz respeito ao tempo de ação do PEG no alvéolo, que pode ser limitado pelo seu clareamento pelo epitélio pulmonar. Esse processo depende do peso molecular do polímero estudado, sendo muito mais fácil para as moléculas pequenas atravessarem o epitélio por difusão passiva. Porém deve ser levado em conta que, diante de uma doença pulmonar grave, pode haver lesão da barreira alveolar, o que permite o trânsito de moléculas com peso molecular mais elevado (Dargaville e Morley, 2000). Outra questão a ser considerada refere-se à osmolaridade do polímero utilizado, que pode por si só aumentar o conteúdo de água alveolar. Estima-se que a osmolaridade do PEG a 5% seja em torno de 2 a 3 vezes maior

que a pressão colóido-osmótica do plasma. Portanto, dependendo de uma variedade de fatores, como o PEEP, a pressão oncótica e hidrostática do plasma, a tensão de superfície alveolar, o grau de dano epitelial e endotelial, a efetividade dos mecanismos de clareamento de água das células alveolares e da quantidade de água ligada ao PEG, a quantidade de água intra-alveolar pode estar aumentada. A esses fatores deve-se acrescentar que a própria lesão pulmonar de base (no caso a SAM) já altera por si só a capacidade das células em promover o clareamento do excesso de fluidos alveolares.

Nesse contexto o uso de diurético parece ser uma possibilidade na tentativa de diminuir o efeito do excesso de líquido alveolar. Dehority et al. (2005) avaliaram os efeitos do surfactante com e sem PEG em ratos adultos com SDRA induzida por lavagem. Foram avaliados parâmetros de oxigenação, mecânica pulmonar (curva P-V), histologia pulmonar (hemorragia, atelectasia e aumento de leucócitos), além do aspecto ultra-estrutural do surfactante por meio de microscopia eletrônica. Os animais dos dois grupos receberam furosemida no início da ventilação e não apresentaram diferenças entre eles quanto à oxigenação nem quanto às variáveis histológicas avaliadas. O grupo tratado com surfactante e PEG apresentou volumes pulmonares maiores e a administração de furosemida diminuiu a quantidade de líquido pulmonar neste grupo. Os autores sugerem que esses efeitos possam ter ocorrido devido às peculiaridades da metodologia: uso do surfactante diluído em uma solução hiposmolar (cloreto de sódio a 0,45%), uso de diurético, uso de PEEP (4 cmH₂O) e o procedimento de aspiração traqueal feito de forma sistemática.

Esses dados sugerem que a furosemida poderia ser utilizada como um fator coadjuvante que melhoraria a atividade do PEG, pelo menos no que se refere ao

conteúdo de líquido alveolar. Contrariando esta idéia, no estudo de Lu et al. (2005b) observou-se que a piora da oxigenação dos animais tratados com Curosurf[®] e PEG foi concomitante com o aumento do líquido pulmonar, mesmo tendo os animais recebido uma dose de furosemida no início do experimento. Deve-se lembrar ainda de que esta droga não é isenta de efeitos colaterais, sendo que seu uso deve ser mais bem avaliado em estudos experimentais.

Ainda que o uso de polímeros fosse bem determinado e seus mecanismos de ação bem estabelecidos, os estudos até o momento restringem-se ao âmbito experimental. Sendo assim, sua segurança e eficácia em humanos com doenças pulmonares não pode ser garantida, havendo necessidade de mais estudos para que se chegue a conclusões mais definitivas.

O entendimento dos mecanismos de disfunção do surfactante e a busca de alternativas que evitem sua inativação continuam sendo um grande desafio para a ciência e mantém aberto um amplo campo para as pesquisas na área do surfactante pulmonar.

Discussão



6.

1. A adição de polietilenoglicol ao surfactante não proporcionou benefícios, em relação ao surfactante puro, no que se refere à complacência pulmonar dinâmica, pressão ventilatória e volumes pulmonares.

2. A análise histológica dos pulmões mostrou que os animais dos grupos tratados com surfactante (S100 e PEG) apresentaram maior homogeneidade na expansão alveolar, comparados ao grupo sem tratamento (MEC), mas não houve influência da adição de polietilenoglicol em relação ao padrão de expansão do parênquima pulmonar.

7.

ANEXO A - VALORES DE PRESSÃO VENTILATÓRIA (cm H₂O) E COMPLACÊNCIA PULMONAR DINÂMICA (ml/kg. cm H₂O) DO GRUPO MECÔNIO, NOS QUATRO MOMENTOS DE AFERIÇÃO DURANTE A VENTILAÇÃO MECÂNICA

	TEMPO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA (min)							
	5		10		15		20	
	PV	CD	PV	CD	PV	CD	PV	CD
Animal								
1	21,30	0,37	19,40	0,45	17,00	0,44	16,90	0,46
2	23,30	0,36	18,90	0,44	17,10	0,50	15,30	0,54
3	24,40	0,31	23,50	0,34	22,80	0,35	22,00	0,38
4	20,60	0,41	18,50	0,44	18,50	0,45	17,60	0,51
5	23,50	0,34	22,20	0,36	22,20	0,36	20,60	0,39
6	19,60	0,40	18,20	0,42	17,90	0,44	17,10	0,46
7	22,70	0,35	20,90	0,38	19,30	0,41	19,40	0,41
8	20,70	0,38	19,30	0,41	18,40	0,43	17,70	0,45
9	18,80	0,42	17,90	0,44	17,10	0,47	17,00	0,47
10	21,80	0,36	21,80	0,36	21,20	0,37	21,20	0,37
11	19,70	0,39	20,70	0,38	19,10	0,41	18,90	0,42
12	18,40	0,43	18,30	0,44	17,20	0,46	17,20	0,46
Média	21,23	0,37	19,96	0,40	18,98	0,42	18,40	0,44
(dp)	(1,94)	(0,03)	(1,82)	(0,03)	(2,04)	(0,04)	(2,02)	(0,05)

PV: pressão ventilatória; CD: complacência dinâmica; dp: desvio padrão

ANEXO B - VALORES DE PRESSÃO VENTILATÓRIA (cm H₂O) E COMPLACÊNCIA PULMONAR DINÂMICA (ml/kg. cm H₂O) DO GRUPO S100, NOS QUATRO MOMENTOS DE AFERIÇÃO DURANTE A VENTILAÇÃO MECÂNICA

	TEMPO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA (min)							
	5		10		15		20	
	PV	CD	PV	CD	PV	CD	PV	CD
Animal								
1	21,20	0,40	20,30	0,42	12,40	0,60	12,70	0,62
2	19,10	0,48	15,10	0,54	9,80	0,87	8,70	0,95
3	21,70	0,37	18,40	0,47	13,10	0,62	13,10	0,58
4	20,30	0,39	16,90	0,43	13,10	0,63	12,70	0,60
5	17,00	0,47	16,10	0,52	11,20	0,71	11,30	0,69
6	17,00	0,48	16,00	0,51	10,90	0,75	10,90	0,73
7	16,00	0,50	15,50	0,52	10,70	0,74	10,70	0,74
8	18,10	0,44	18,00	0,44	9,40	0,85	9,60	0,84
9	21,50	0,47	18,70	0,47	11,50	0,62	11,00	0,60
10	17,80	0,51	17,00	0,55	12,80	0,71	13,20	0,71
11	25,20	0,31	24,20	0,33	15,70	0,52	15,40	0,53
12	17,00	0,47	16,90	0,48	13,30	0,60	12,80	0,62
Média	19,32	0,44	17,75	0,47	11,99	0,68	11,84	0,68
(dp)	(2,70)	(0,06)	(2,51)	(0,06)	(1,75)	(0,10)	(1,82)	(0,12)

PV: pressão ventilatória; CD: complacência dinâmica; dp: desvio padrão

**ANEXO C - VALORES DE PRESSÃO VENTILATÓRIA (cm H₂O) E
COMPLACÊNCIA PULMONAR DINÂMICA (ml/kg. cm H₂O) DO
GRUPO PEG, NOS QUATRO MOMENTOS DE AFERIÇÃO DURANTE
A VENTILAÇÃO MECÂNICA**

	TEMPO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA (min)							
	5		10		15		20	
	PV	CD	PV	CD	PV	CD	PV	CD
Animal								
1	20,70	0,39	19,50	0,41	14,30	0,51	14,80	0,54
2	19,00	0,43	16,90	0,49	11,80	0,67	11,80	0,67
3	20,00	0,40	20,10	0,42	12,90	0,58	13,00	0,60
4	18,30	0,43	17,90	0,44	14,30	0,58	14,30	0,58
5	18,90	0,42	17,70	0,48	12,30	0,61	13,20	0,59
6	21,50	0,39	18,60	0,43	15,90	0,50	15,50	0,51
7	19,80	0,40	19,80	0,40	14,60	0,54	14,40	0,56
8	19,30	0,43	18,60	0,44	12,70	0,60	12,40	0,63
9	20,40	0,39	19,20	0,44	13,10	0,61	13,00	0,61
10	20,40	0,39	19,10	0,42	16,40	0,49	15,50	0,52
11	18,60	0,43	16,50	0,49	11,20	0,72	11,20	0,71
12	18,20	0,43	18,20	0,43	14,20	0,56	14,20	0,56
Média	19,59	0,41	18,50	0,44	13,64	0,58	13,60	0,59
(dp)	(1,04)	(0,01)	(1,11)	(0,03)	(1,58)	(0,06)	(1,39)	(0,05)

PV: pressão ventilatória; CD: complacência dinâmica; dp: desvio padrão

ANEXO D – VALORES DO DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO (Lm) E ÍNDICE DE DISTORÇÃO (ID) DOS ANIMAIS DO GRUPO MECÔNIO

	ANIMAIS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	dp
Lm*	91,46	81,58	91,53	85,08	80,99	81,73	98,69	86,50	87,19	6,25
ID	24,51	24,17	22,09	12,94	18,30	14,94	18,39	12,96	18,53	4,71

* valor em μm ; dp: desvio padrão

ANEXO E – VALORES DO DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO (Lm) E ÍNDICE DE DISTORÇÃO (ID) DOS ANIMAIS DO GRUPO S100

	ANIMAIS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	dp
Lm*	72,80	70,45	72,69	70,92	71,12	65,34	80,24	72,56	72,01	4,10
ID	12,30	6,57	9,60	7,68	7,25	6,92	11,22	5,77	8,41	2,35

* valor em μm ; dp: desvio padrão

ANEXO F – VALORES DO DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO (Lm) E ÍNDICE DE DISTORÇÃO (ID) DOS ANIMAIS DO GRUPO PEG

	ANIMAIS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	dp
Lm*	64,45	65,99	65,48	78,31	89,97	66,62	73,82	79,57	73,02	9,09
ID	9,09	6,44	8,20	11,65	18,38	16,54	9,16	14,38	11,73	4,28

* valor em μm ; dp: desvio padrão

FICHA PARA COLETA DE DADOS

ANIMAL Nº:

DATA: _____ PESO: _____ Hora nasc.: _____

GRUPO:

Volume Corrente: _____

Administração do mecônio – Hora: _____ Volume: _____

Início da ventilação: _____ Início do “saving”: _____

TEMPO (min)	5	10	15	20
Relógio				
Rec Time				
VC				
PIP				
PEEP				
P VENT				
Compl.				

Administração do surfactante:

Volume: _____ ml

Hora: _____

Final da ventilação: _____

Sacrifício: _____

CURVA P-V ()

5	10	15	20	25	30	25	20	15	10	5	0

OBS.:



HOSPITAL DAS CLÍNICAS

L.A.
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 3671
SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.10.00, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 793/00 intitulado: **"Estudo dos efeitos da adição de polietilenoglicol ao surfactante exógeno no tratamento da síndrome de aspiração de mecônio em coelhos recém-nascidos"**, apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Dr. João César Lyra**, do Departamento de Pediatria.

CAPPesq, 26 de outubro de 2000.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão de Ética Para
Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").



*Protocolo
assinado
10/11*

8. Referênci

* *De acordo com:*

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese C. da Cunha, Maria Júlia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Almaas R, Robertson B, Linderholm B, Lundberg E, Saugstad OD, Moen A. Reversal of meconium inhibition of pulmonary surfactant by ferric chloride, copper chloride, and acetic acid. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 1789-94.

Anzueto A. Surfactant supplementation in the lung. *Respir Care Clin.* 2002; 8: 211-36.

Arcas RM, Chang CY, Proença RM, Reyes AMA, Lyra JC, Gibeli MAC, Vaz FAC, Okay Y, Rebello CM. In vivo testing of a new low cost surfactant compared to surfactant using the preterm rabbit model: Lung mechanics and morphometric analysis [abstract]. *Pediatr Res.* 2000; 47 (Suppl): 386A.

Auten R, Vozzelli M, Clark R. Volutrauma: What is it and how do we avoid it? *Clin Perinatol.* 2001; 28: 505-15.

Bae CW, Takahashi A, Chida S, Sasaki M. Morphology and function of pulmonary surfactant inhibited by meconium. *Pediatr Res.* 1998; 44: 187-91.

Bauman LA, Willson DF. Surfactant in pediatric respiratory failure. *New Horizons.* 1997; 3: 399-413.

Brown DL, Pattishal EN. Other uses of surfactant. *Clin Perinatol.* 1993; 20: 761-89.

Bruni R, Fan BR, David-Cu R, Taeusch HW, Walther FJ. Inactivation of surfactant in rat lungs. *Pediatr Res.* 1996; 39: 236-40.

Campbell H, Bosma K, Brackenbury A, McCaig L, Yao L, Veldhuizen R, Lewis J. Polyethylene glycol (PEG) attenuates exogenous surfactant in lung-injured adult rabbits. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 475-80.

Cardoso WV. Relações volume-pressão no sistema respiratório. *J Pneumol.* 1987; 13 (Supl 1): 27-38.

Chen CM, Wang LF, Su B. Effects of maternal undernutrition during later gestation on the lung surfactant system and morphometry in rats. *Pediatr Res.* 2004; 56: 329-35.

Chinese Collaborative study Group for Neonatal Respiratory Diseases. Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant: a multicentre randomized controlled trial. *Acta Paediatr.* 2005; 94: 896-902.

Clark RH, Slutsky AS, Gertsmann DR. Lung protective strategies of ventilation in the neonate. What are they? *Pediatrics.* 2000; 105: 112-4.

Cleary GM, Antunes MJ, Ciesielka DA, Higgins ST, Spitzer AR, Chander A. Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration. *Pediatrics.* 1997; 100: 998-1003.

Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Ann Rev Physiol.* 1986; 48: 721-31.

Curley AE, Halliday HL. The present status of exogenous surfactant for the newborn. *Early Hum Dev.* 2001; 6: 67-83.

Dargaville PA, Mills JF. Surfactant therapy for meconium aspiration syndrome. *Drugs.* 2005; 65: 2569-91.

Dargaville PA, Morley CJ. Overcoming surfactant inhibition with polymers. *Acta Paediatr.* 2000; 89: 1397-400.

Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr.* 2001; 138: 113-5.

Davey AM, Becker JD, Davis JM. Meconium aspiration syndrome: physiological and inflammatory changes in a newborn piglet model. *Pediatr Pulmonol.* 1993; 16: 101-8.

Dehority W, Lu KW, Clements JA, Goerke J, Pittet JF, Allen L, Taeusch HW. Polyethylene glycol-surfactant for lavage lung injury in rats. *Pediatr Res.* 2005; 58: 913-8.

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

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

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

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

Freddi NA. *Avaliação dos efeitos da adição do polietilenoglicol ao surfactante pulmonar exógeno na função pulmonar, em um modelo experimental de síndrome de desconforto respiratório tipo agudo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Greenough A. Expanded use of surfactant replacement therapy. *Eur J Pediatr*. 2000; 159: 635-40.

Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res*. 2001; 2: 353-64.

Halliday HL, Speer CP, Robertson B. Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant. *Eur J Pediatr*. 1996; 155: 1047-51.

Henry MD, Ikegami M, Jobe AH. Testing surfactant treatment responses: A comparison of two models. *Biol Neonate*. 1997; 71: 181-9.

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

Hite RD. Surfactant deficiency in adults. *Clin Pulm Med*. 2002; 9: 39-45.

Holm BA, Enhorning G, Notter RH. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids*. 1988; 49: 49-55.

Holm BA, Wang Z, Notter RH. Multiple mechanisms of lung surfactant inhibition. *Pediatr Res*. 1999; 46: 85-93.

Jobe AH, Ikegami M. Biology of surfactant. *Clin Perinatol*. 2001;28: 655-69.

Kääpä P, Kytölä J, Soukka H, Ahotupa M. Human meconium has potent antioxidative properties. *Biol Neonate*. 1997; 72: 71-5.

Kattwinkel J. Surfactant lavage for meconium aspiration: A word of caution. *Pediatrics*. 2002; 109: 1167-8.

Kattwinkel J. Surfactant: Evolving issues. *Clín Perinatol*. 1998; 25: 17-32.

Khammash H, Perlman M, Wojtulewicz J, Dunn M. Surfactant therapy in full-term neonates with severe respiratory failure. *Pediatrics*. 1993; 92: 135-9.

Kobayashi T, Ohta K, Tashiro K, Nishizuka K, Chen WM, Ohmura S, Yamamoto K. Dextran restores albumin-inhibited surface activity of pulmonary surfactant extract. *J Appl Physiol*. 1999; 86: 1778-84.

Kozma C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R. Anatomy, physiology and biochemistry of the rabbit. In: Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL, editors. *The biology of the rabbit*. New York: Academic Press; 1974. p.49-72.

Kubrusly FS, Netto SL, Iourtov V, Raw I, Araujo PS. A natural surfactant from pig lungs. *Biotechnology Letters*. 2000; 22: 1251-3.

Lam BCC, Yeung CY, Fu KH, Wong KY, Chan FL. Surfactant tracheobronchial lavage for management of a rabbit model of meconium aspiration syndrome. *Biol Neonate*. 2000; 78: 129-38.

Lewis JF, Veldhuizen RAW. Factors affecting the efficacy of exogenous surfactant in acute lung injury. *Biol Neonate*. 1995; 67: 48-60.

Long WA, Zeng G, Henry GW. Pharmacologic adjuncts II: exogenous surfactants. In: Goldsmith and Karotkin, editors. *Assisted ventilation of the neonate*. 3a ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. p.305-25.

Lotze A, Mitchell BR, Bulas DI, Zola EM, Shalwitz RA, Gunkel JH. Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with severe respiratory failure. *J Pediatr*. 1998; 132: 40-7.

Lu KW, Goerke J, Clements JA, Taeusch HW. Hyaluronan decreases surfactant inactivation in vitro. *Pediatr Res*. 2005a; 57: 237-41.

Lu KW, Robertson B, Taeusch HW. Dextran or polyethylene glycol added to Curosurf for treatment of meconium lung injury in rats. *Biol Neonate*. 2005b; 88: 46-53.

Lu KW, Taeusch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polyethylene glycol/surfactant mixtures improve lung function after HCl and endotoxin lung injuries. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001a; 164: 1531-6.

Lu KW, Taeusch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polymer-surfactant treatment of meconium-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 623-8.

Lu KW, Taeusch HW. Polymer effects differs with Survanta, Curosurf and Infasurf [abstract]. *J Invest Med*. 2001b;49 (Suppl): 28A.

Lyra JC, Mascaretti RS, Precioso AR, Chia CY, Costa MTZ, Okay Y, Vaz FAC, Rebello CM. Effects of different doses of exogenous surfactant for the treatment of meconium aspiration syndrome in newborn rabbits. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004; 59: 104-12.

Martínez-Burnes J, López A, Wright GM, Ireland WP, Wadowska DW, Dobbin GV. Microscopic changes induced by the intratracheal inoculation of amniotic fluid and meconium in the lung of neonatal rats. *Histol Histopathol*. 2002; 17: 1067-76.

Meyer KC, Zimmerman JJ. Inflammation and surfactant. *Pediatr Respir Rev*. 2002; 3: 308-14.

Meyuhas D, Lichtenberg D. Effect of water-soluble polymers on the state of aggregation, vesicle size, and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate. *Biophys J*. 1996; 71: 2613-22.

Miyoshi M, Ribeiro AM. Terapia com surfactante exógeno. In: KOPELMAN BI, SANTOS AMN, GOULART AL, ALMEIDA MFB, MIYOSHI M, GUINSBURG R. *Diagnóstico e tratamento em neonatologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 187-96.

Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu M, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 164: 477-81.

Ochs M, Schuttler M, Stichtenoth G, Herting E. Morphological alterations of exogenous surfactant inhibited by meconium can be prevented by dextran. *Respir Res.* 2006; 7: 86-93.

Ohama Y, Ogawa Y. Treatment of meconium aspiration syndrome with surfactant lavage in an experimental rabbit model. *Pediatr Pulmonol.* 1999; 28: 18-23.

Puligandla PS, Gill T, Mccaig LA, Yao L, Veldhuizen RAW, Possmayer F, Lewis JF. Alveolar environment influences the metabolic and biophysical properties of exogenous surfactants. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1061-71.

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

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

Robertson B, Lachmann B. Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung Res.* 1988; 14: 279-310.

Robertson B. Animal models of neonatal surfactant dysfunction. In: Robertson B, Van Gold LMG, Batenburg JJ, editors. *Pulmonary surfactant. From molecular biology to clinical practice.* Amsterdam: Elsevier; 1992. p.459-84.

Rubin BK. The surface and transport properties of meconium and reconstituted meconium solutions. *Pediatr Res.* 1996; 40: 834-8.

Ruppert C, Pucker C, Markart P, Seibold K, Bagheri A, Grimminger F, Seeger W, Gunther A. Impact of surface tension on the conversion rate of large to small surfactant aggregates. *Biophys Chem.* 2003; 104: 229-38.

Seeger W, Grube C, Gunther A. Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J.* 1993; 6: 971-7.

Seegerer H, Scheid A, Wagner MH, Lekka M, Obladen M. Rapid tracheal infusion of surfactant versus bolus instillation in rabbits: effects on oxygenation, blood pressure and surfactant distribution. *Biol Neonate.* 1996; 69: 119-27.

Seegerer H, Van Gelder W, Angenent FW, Van Woerkens LJ, Curstedt T, Obladen M, Lachmann B. Pulmonary distribution and efficacy of exogenous surfactant in lung-lavaged rabbits are influenced by the instillation technique. *Pediatr Res.* 1993; 34: 490-4.

Soll RF, Dargaville P. Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term infants (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2006. Oxford: Update Software.

Soll RF. Multiple versus single dose natural surfactant extract for severe neonatal respiratory distress syndrome (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2006. Oxford: Update Software.

Strohmaier W, Trupka A, Pfeiler C, Thurnher M, Khakpour Z, Gippner-Steppert C, Jochum M, Redl H. Bilateral lavage with diluted surfactant improves lung function after unilateral lung contusion in pigs. *Crit Care Med.* 2005; 33: 2286-93.

Sun B, Cursted T, Robertson B. Exogenous surfactant improves ventilation efficiency and alveolar expansion in rats with meconium aspiration. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 764-70.

Sun B, Cursted T, Robertson B. Surfactant inhibition in experimental meconium aspiration. *Acta Paediatr.* 1993a; 82: 182-9.

Sun B, Cursted T, Song GW, Robertson B. Surfactant improves lung function and morphology in newborn rabbits with meconium aspiration. *Biol Neonate.* 1993b; 63: 96-104.

Sun B, Herting E, Cursted T, Robertson B. Exogenous surfactant improves lung compliance and oxygenation in adult rats with meconium aspiration. *J Appl Physiol.* 1994; 77: 1961-71.

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

Suresh GK, Soll RF. Current surfactant use in premature infants. *Clin Perinatol*. 2001; 28: 671-94.

Taeusch HW, Lu KW, Goerke J, Clements JA. Polyethylene Glycol (PEG) enhances surfactant treatment of acute lung injury from meconium [abstract]. *Pediatr Res*. 1999; 45 (Supl): 322 A.

Tashiro K, Cui XG, Kobayashi T, Curstedt T, Robertson B. Modified protocols for surfactant therapy in experimental meconium aspiration syndrome. *Biol Neonate*. 2003; 83: 49-56.

Tashiro K, Kobayashi T, Robertson B. Dextran reduces surfactant inhibition by meconium. *Acta Paediatr*. 2000; 89: 1439-45.

The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1301-8.

Tollofsrud PA, Lindenskov PH, Drevon CA, Speer CP, Seidenspinner S, Saugstad OD. Comparison of pulmonary and inflammatory effects of lipid-and water-soluble components in meconium in newborn piglets. *Biol Neonate*. 2003; 84: 330-7.

Winterhauer M, Bürner H, Marzinka S, Benz R, Kasianowicz JJ. Interaction of polyethyleneglycols with air-water interfaces and lipid monolayers: Investigations on surface pressure surface potential. *Biophys J*. 1995; 69: 1371-81.

Wiswell TE, Foster NH, Slayter MV, Hachey WE. Management of a piglet model of the meconium aspiration syndrome with high frequency or conventional ventilation. *Am Journal of Dis Child*. 1992; 146: 1287-93.

Wiswell TE, Knight GR, Finer NN, Donn SM, Desai H, Walsh WF, Sekar KC, Bernstein G, Keszler M, Visser VE, Merrit TA, Mannino FL, Mastroianni L, Marcy B, Revak SD, Tsai H, Cochrane CG. A multicenter, randomized, controlled trial comparing Surfaxin (Lucinactant) lavage with standard care for treatment of meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 2002; 109: 1081-7.

Wiswell TE. Expanded uses of surfactant therapy. *Clin Perinatol*. 2001; 28: 695-711.

Yu LM, Lu JJ, Chiu IWY, Leung KS, Chan YW, Zhang L, Policova Z, Hair ML, Neumann AW. Poly(ethylene glycol) (PEG) enhances dynamic surface activity of a pulmonary surfactant. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2004; 36: 167-76.

Zasadzinski JA, Alig TF, Alonso C, de la Serna JB, Perez-Gil J, Tausch HW. Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: Theory. *Biophysical Journal* 2005; 89: 1621-9.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Grande Dicionário Larousse Cultural da Língua Portuguesa: Regras Ortográficas e Gramaticais. São Paulo: Nova Cultural; 1999.

Oxford Advanced Learner's Dictionary of Current English. 5a ed. Oxford: Oxford University Press; 1995.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese C. da Cunha, Maria Júlia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.