RODRIGO SÁNCHEZ-VÉLIZ

Efeitos imediatos da circulação extracorpórea sobre o sistema mucociliar

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

Programa de: Anestesiologia Orientador: Dr. Luiz Marcelo Sá Malbouisson

São Paulo 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sánchez-Véliz, Rodrigo Efeitos imediatos da circulação extracorpórea sobre o sistema mucociliar / Rodrigo Sánchez-Véliz. -- São Paulo, 2011. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Anestesiologia. Orientador: Luiz Marcelo Sá Malbouisson.

Descritores: 1.Depuração mucociliar 2.Circulação extracorpórea 3.Anestesia cardiotorácica 4.Cirurgia torácica

USP/FM/DBD-047/11

DEDICATÓRIA

A meus pais, Tuto e Dalel,

A minha avó, Octaviza Delgado de Sánchez (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta etapa de minha vida cumprida.

"Tomai, senhor, e recebei, tomai, senhor, e recebei, toda minha liberdade e a minha memória também o meu entendimento e toda a minha vontade tudo o que tenho e possuo, vós me destes com amor. Todos os dons que me destes, Com gratidão vos devolvo, disponde deles, senhor, segundo a vossa vontade Dai-me somente o Vosso amor, Vossa Graça, isto me basta, nada mais quero pedir"

Santo Ignácio de Loyola

Ao meu querido Brasil, por me acolher como mais um filho nesta terra maravilhosa, cheia de alegria, paz e amor!

Ao Dr. Luiz Marcelo Sá Malbouisson, orientador, que sempre esteve a meu lado, mostrando qual direção seguir e contribuindo para minha formação profissional.

A Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona, por acreditar em mim, obrigado pela oportunidade de realizar o Doutorado em uma instituição, como a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. José Otávio Costa Auler Jr, pelos conselhos e palavras de incentivo durante minha formação profissional no Brasil. A meus amigos que são os ângeles que o céu manda, tesouros do coração, que nos momentos em que tenho estado mal, têm se ocupado de me fazer bem, amigos verdadeiros, por isso, agradeço por tudo.

Aos amigos do Grupo de Defesa Pulmonar do Laboratório de Poluição Ambiental, com quem tive a oportunidade de conviver todos estes anos, obrigado pelo seus conhecimentos e conselhos e por me permitirem considerá-los como a minha verdadeira família.

Aos Professores Doutores Elnara M. Negri, Paulo H. Nascimento Saldiva e Elia G. Caldini.

Aos Doutores Claudia Simeire Yagi, Regiane C. Oliveira, Dolores Helena Rivero, Mariângela Macchione, Nilsa Damaceno-Rodrigues, Vivien Schemeling Piccin, Rogério Pazetti, Naomi K. Nakagawa e Márcia Hage.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Doutores Claudia Regina Freitas, Anderson Benício, Denise Aya Otsuki, Filipe Bini e Gilberto Nascimento, obrigado pelo apoio e paciência durante todo esse período.

Aos amigos da Disciplina de Anestesiologia do Hospital Das Clinicas da FMUSP, que direta e indiretamente tornaram possível a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros concedidos - Processo 478485/2004-2.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela Bolsa concedida: DD-1 - Processo 07/52127-3. Esta tese está de acordo com as normas em vigor no momento da publicação:

Referência: adaptado de International Commitee of Medical Journals Editors (Vancouver)

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas Lista de figuras Lista de tabelas Resumo *Summary*

1	INTI	RODUÇİ	40				1	
2	OB.	JETIVO					5	
3	REV	VISÃO DA LITERATURA						
	3.1	Sistema	ι mucocilia	ar respiratório	D		8	
	3.2	Efeitos	da anestes	sia geral sob	ore a transport	abilidade do muco	. 13	
	3.3	Efeitos	da cirurgia	torácica sol	ore a transpor	tabilidade do muco	. 14	
	3.4	Papel of	la circulaç	ção extraco	rpórea na dis	sfunção do sistema		
		respirat	ório				. 15	
4	MÉ٦	TODOS					. 18	
	4.1	Populaç	ão estuda	ıda			. 19	
	4.2	Desenh	o do estuc	do ot			. 20	
	4.3	Prepara	ção e inst	rumentação	dos animais .		. 22	
	4.4	Esternotomia25					. 25	
	4.5	Técnica da instalação da CEC25					. 25	
	4.6	Avaliaçã	io hemodi	nâmica e da	mecânica res	spiratória	. 26	
	4.7	Avaliaçã sanguí	io dos p nea	parâmetros	metabólicos	e da oxigenação	. 29	
		4.7.1	Relação e	entre a pres	são arterial de	oxigênio e a fração	~~	
		172	Gradiente	de oxigenio	(PaO ₂ /FIO ₂) . arial de ovigêr	$(GA_{-2}O_{-})$. 29	
		4.7.3	Shunt pul	monar			. 30	
	4.8	Coletas	do fragme	ento da traqu	iéia		. 32	
	4.9	Coletas	do muco .				. 32	
	4.10	Método	s de anális	se do epitélio	o respiratório.		. 33	
		4.10.1	Avaliação	o da frequên	cia de batimer	nto ciliar (FBC)	. 33	
		4.10.2	Transport	te mucociliai	[.] da traqueia <i>il</i>	n situ (TMC)	. 34	
		4.10.3	Análise h	istológica qu	alitativa do ep	pitélio da traqueia	. 35	

	4.11	Métodos	de análise do muco respiratório	35
		4.11.1	Transportabilidade do muco <i>in vitro</i> pelo palato de rã (VTM)	. 35
		4.11.2	Ângulo de contacto (AC)	38
		4.11.3	Transporte do muco respiratório <i>in vitro</i> pela tosse (TMT)	. 40
		4.11.4	Viscosidade do muco respiratório através do viscosímetro Cone-Plate® (VM)	. 41
	4.12	Análise	estatística	45
5	RES	ULTADO)S	. 46
	5.1	Caracte	rísticas dos animais estudados	. 47
	5.2	Dados h	emodinâmicos	. 48
	5.3	Variávei	s ventilatórias	. 49
	5.4	Variávei	s de oxigenação sanguínea e metabólicas	. 50
	5.5	Avaliaçã	io da função mucociliar	. 52
		5.5.1	Frequência de batimento ciliar (FBC) em fragmento de traqueia	52
		5.5.2	Transporte mucociliar <i>in situ</i> em fragmento de tragueia	. 54
		5.5.3	Transportabilidade do muco <i>in vitro</i> pelo palato de rã (VTM)	. 55
		5.5.4	Ângulo de Contato (AC)	56
		5.5.5	Transporte do muco respiratório pela tosse (TMT)	57
		5.5.6	Avaliação da viscosidade do muco respiratório pelo viscosímetro Cone-Plate® (VM)	. 58
	5.6	Análises	s histológicas do epitélio da traqueia (qualitativa)	60
6	DISC	CUSSÃO		62
	6.1	Compoi	rtamento do epitélio	65
	6.2	Compor	rtamento do muco respiratório	.71
7	CON	ICLUSÃ	Ο	. 75
8	ANE	XOS		. 77
9	REF	ERÊNCI	AS	. 81

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg.kg⁻¹.h	microgramas por quilogramas por hora
μΙ	microlitros
μm	micrômetro
AC	ângulo de contato
ASC	área de superfície corporal
ATP	adenosina trifosfato
CaO ₂	conteúdo arterial de oxigênio
CC	cirurgia cardíaca
CcO ₂	conteúdo capilar de oxigênio
CEC	circulação extracorpórea
CI-	cloro
cm	centímetros
cmH ₂ O	centímetros de água
ср	centipouse
CvO ₂	conteúdo venoso de oxigênio
DP	desvio padrão
EB	excesso de base
EP	erro padrão da média
ETCO ₂	concentração de dióxido de carbono ao fim da expiração
F'/S	relação esforço constante e velocidade de corte
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBC	freqüência de batimento ciliar
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fr	French
G	Gauge
GA-aO ₂	gradiente alvéolo-arterial de oxigênio
H ₂ O	água
HCO3 - HE	bicarbonato Hematoxilina-Eosina

HME	trocadores de calor e umidade
Hz	hertz
IC	índice cardíaca
LIM	laboratório de investigação medica
mEq.kg⁻¹	miliequivalentes por quilogramas
mg	miligramas
mg.kg ⁻¹	miligrama por quilogramas
MKS	sistema de unidades metro, quilograma, segundo
mL	mililitros
mL.cmH ₂ O ⁻¹	mililitros por centímetro de água
mL.kg⁻¹	mililitros por quilograma
mm.seg ⁻¹	milímetros entre segundos
mPa.s	miliPascal por segundos
Na⁺	sódio
°C	graus Celsius
PaCO ₂	pressão arterial de dióxido de carbono
PAO ₂	pressão alveolar de oxigênio
PaO ₂	pressão arterial de oxigênio
PaO ₂ /FiO ₂	relação entre a pressão arterial de oxigênio e a fração
	inspirada de oxigênio
PB	pressão barométrica
PC	computador pessoal
PETCO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono
рН	potencial de hidrogênio
PH ₂ O	pressão de água
P _{media}	pressão ao fim da inspiração
PMVA	pressão media da via aérea
P _{pico}	pressão pico
PvO ₂	pressão venosa de oxigênio
RPM	revoluções por minutos
s ⁻¹	segundos inverso ou segundos recíproco
Sat _{O2}	saturação de oxigênio

TMC	transporte mucociliar
ТМТ	transporte mucociliar pela maquina simuladora da tosse
UI	Unidades Internacionais
UI.kg⁻¹	Unidades Internacionais por quilogramas
VTM	transportabilidade in vitro pelo palato de rã

FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental 21
Figura 2 -	Representação esquemática do transporte mucociliar em palato de rã
Figura 3 -	Representação esquemática do equipamento utilizado para a medida do ângulo de contato
Figura 4 -	Representação esquemática do modelo utilizado para a análise da transportabilidade do muco pela tosse
Figura 5 -	Representação esquemática do viscosímetro Brookfield DV-II+Pro®
Figura 6 -	Frequência de batimento ciliar no grupo controle e no grupo CEC
Figura 7 -	Transporte mucociliar <i>in situ</i> em fragmento de traquéia no grupo controle e no grupo CEC
Figura 8 -	Transporte mucociliar <i>in situ</i> em fragmento de traquéia no grupo controle e no grupo CEC
Figura 9 -	Avaliação do angulo de contato no grupo controle e no grupo CEC
Figura 10 -	Transporte do muco respiratório pela tosse no grupo controle e no grupo CEC
Figura 11 -	Avaliação da viscosidade aparente nos grupos Controle e CEC nos momentos T0 (painel A), T90 (painel B) e T180 (painel C)

Figura 12	Avaliação da Viscosidade do muco na velocidade de 100	
	RPM nos grupos Controle e CEC, nos momentos: T0 (A),	
	T90 (B) e T180 (C)	59

Figura 13 -	Fotomicrografias	do	epitélio	respiratório	da	traquéia	nos	
	grupos Controle e	e CE	C corad	os com HE				61

TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos métodos para o estudo do sistema mucociliar 12	2
Tabela 2 -	Características dos animais estudados4	7
Tabela 3 -	Variáveis hemodinâmicas ao longo do estudo4	8
Tabela 4 -	Variáveis respiratórias ao longo do estudo 4	9
Tabela 5 -	Variáveis de oxigenação sanguínea e metabólicas 5	1
Tabela 6 -	Análise da frequência de batimento ciliar (ANOVA)5	3
Tabela 7 -	Análise do TMC (ANOVA)5	4
Tabela 8 -	Análise do transporte mucociliar in situ (ANOVA)	5
Tabela 9 -	Análise do ângulo de contato (ANOVA) 5	6
Tabela 10 -	Análise do transporte do muco respiratório pela tosse (ANOVA)	7

RESUMO

Sánchez-Véliz R. *Efeitos imediatos da circulação extracorpórea no sistema mucociliar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 91p.

INTRODUÇÃO: A circulação extracorpórea (CEC) é um fator etiológico importante para a lesão pulmonar, observada após cirurgia cardíaca. No entanto, o impacto da CEC na função mucociliar respiratória é desconhecido. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos imediatos da CEC sobre o sistema de transporte mucociliar. MÉTODOS: 22 porcos mestiços das raças Large White e Landrace com peso entre 33 a 47 kg alocados nos grupos controle (n = 10) e CEC (n = 12) completaram o estudo. As técnicas de anestesia e ventilação mecânica foram padronizadas. Após a indução da anestesia, foi realizada traqueostomia e uma amostra do tecido traqueal foi excisado (T0) em ambos os grupos. Todos os animais foram submetidos a toracotomia e CEC aorto-bicaval foi instalada no grupo CEC e mantida durante 90 minutos. Após o desmame da CEC (T90), uma segunda amostra do tecido traqueal foi obtida 180 minutos após a traqueostomia (T180). Amostras de muco foram coletadas na traquéia por meio de broncoscopia em T0, T90 e T180. Frequência de batimento ciliar (FBC) e transporte mucociliar in situ (TMC) foram estudados em epitélio tragueal ex vivo. As características do muco respiratório in vitro foram estudadas por transportabilidade ciliar no palato de rã (VTM), Transporte do muco respiratório in vitro pela tosse (TMT), Ângulo de contato (AC) e da viscosidade do muco por viscosímetro Cone-Plate (VM). RESULTADOS: A FBC diminuiu no grupo CEC (13,09 \pm 1,91 Hz vs 11,06 \pm 2,1 Hz, p <0,05), mas não no grupo controle (13,42 ± 0,96 Hz vs 12, 98 ± 2,84 Hz). No momento T90, a viscosidade aparente avaliado em 100 RPM estava aumentada no grupo CEC em relação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas no TMC, VTM, TMT e AC. No grupo de CEC, foi percebida a perda do epitélio ciliado, edema submucoso e infiltração de células inflamatórias na avaliação histológica da traqueia. CONCLUSÃO: A CEC compromete agudamente o sistema de transporte mucociliar traqueal. Novos estudos são necessários para avaliar se esse comportamento tem implicações clínicas.

Descritores: 1-Depuração mucociliar 2-Circulação extracorpórea 3-Anestesia cardiotorácica 4-Cirurgia torácica

SUMMARY

Sánchez-Véliz R. *Immediate effects of cardiopulmonary bypass on mucociliary system* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 91p.

BACKGROUND: Cardiopulmonary bypass (CPB) is an important etiologic factor for lung injury observed after cardiac surgery. However, the impact of CPB on respiratory mucociliary function is unknown. The objective of this study was to assess the immediate effects of CPB on mucociliary transport system. METHODS: Twenty-two mixed breed of Large White and Landrace pigs with weight between 33 to 47kg assigned to control (n=10) and CPB groups (n=12) completed the study. The techniques of anesthesia and mechanical ventilation were standardized. After anesthesia induction, tracheotomy was performed and a tracheal tissue sample was excised (T0) in both groups. All animals underwent thoracotomy and aorto-bicaval CPB was installed in CPB group and maintained during 90 minutes. After weaning from CPB (T90), a second tracheal tissue sample was obtained 180 minutes after tracheotomy (T180). Mucus samples were collected from the trachea using a bronchoscope at T0, T90 and T180. Ciliary beat frequency (CBF) and in situ mucociliary transport (MCT) were studied in ex vivo tracheal epithelium. In vitro respiratory mucus characteristics were studied by mucociliary transportability in frog palate (MT), Cough clearance (CC), Contact angle (CA) and the mucus viscosity by Cone-Plate viscometer (MV). RESULTS: CBF decreased in CPB group (13.09 ± 1.91 Hz vs. 11.06 ± 2.1 Hz, p < 0.05) but not in control group (13.42 ± 0.96 Hz vs. 12.98 ± 2.84 Hz). At T90 Apparent viscosity evaluated at 100 RPM increased in CPB group compared to control. No significant differences were observed in MCT, MT, CA and CC. In CPB group, it was observed loss of ciliated epithelia, submucosal edema and inflammatory cells infiltration in tracheal histology. CONCLUSION: CPB acutely compromise the tracheal mucociliary transport system. New studies are necessary to investigate if this behavior has any clinical implication.

Descriptors: 1- Mucociliary clearance 2- cardiopulmonary bypass 3- cardiothoracic anesthesia 4- thoracic surgery.

1 INTRODUÇÃO

O transporte mecânico em direção à glote de partículas e de contaminantes inalados são considerados os principais mecanismos de defesa das vias aéreas, sendo a integridade do epitélio respiratório de fundamental importância para sua eficiência ⁽¹⁾. A depuração adequada das partículas inaladas que se depositam nas vias aéreas, depende de uma sequência coordenada de batimentos ciliares, adequada quantidade e viscosidade de muco e da composição do fluido periciliar ⁽²⁾.

O muco respiratório representa o produto derivado da secreção das glândulas da submucosa traqueobrônquica e das células caliciformes epiteliais das vias aéreas. Outros fluidos e solutos provenientes da superfície alveolar e da circulação em associação com o muco constituem habitualmente a secreção traqueobrônquica. Apropriada avaliação das propriedades físicas e químicas do muco é essencial para melhor compreensão de sua transportabilidade, tanto em situações fisiológicas como em condições patológicas. Entretanto, pela complexidade de sua composição e de seu comportamento físico, o muco respiratório permanece sendo um dos fluidos menos compreendidos do corpo humano ⁽³⁾.

Alguns fatores sabidamente interferem no adequado funcionamento do sistema mucociliar, seja por lesão direta e disfunção das células ciliadas do trato respiratório responsáveis pelo transporte ou por alteração nos mecanismos que controlam a produção e composição do muco, tais como; a inalação de fumaça, as infecções, a poluição, alguns fármacos, doenças respiratórias obstrutivas de origem genética, crônica ou idiopática ⁽⁴⁾. Em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos sob anestesia geral, as vias aéreas são manipuladas por meio do uso de dispositivos, como cânula de intubação traqueal e submetidas a regimes de ventilação mecânica por pressão positiva ⁽³⁾ que alteram a atividade do sistema mucociliar. Ocorre também alteração da humidificação das vias aéreas decorrente de ventilação artificial assim como a variação da temperatura dos gases inalados que poderia contribuir para a diminuição da eficiência do sistema mucociliar ^(5, 6).

Na população de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, a disfunção pós-operatória do sistema respiratório é uma complicação frequentemente observada. A magnitude destas alterações respiratórias manifestas no pós-operatório varia de alterações funcionais subclínicas, que ocorrem na maioria dos pacientes, até a síndrome de angústia respiratória aguda (SARA), que se verifica em 2% dos casos, após CEC ⁽⁷⁾. Apesar da disfunção pulmonar, após cirurgia cardíaca ser um fenômeno bastante estudado na literatura específica, pouco se sabe sobre o impacto da cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea sobre a função do sistema mucociliar.

Neste grupo particular de pacientes, não apenas a anestesia geral, mas também a cirurgia com a abertura da caixa torácica e a instalação de dispositivos, como a circulação extracorpórea (CEC), utilizados para permitir manipulação do coração e estruturas vasculares enquanto mantêm a perfusão orgânica, podem comprometer a integridade do funcionamento do sistema respiratório ^(8, 9). A circulação extracorpórea é um importante fator contribuinte para as alterações pulmonares observadas na unidade de terapia intensiva, após cirurgia cardíaca (CC) ⁽¹⁰⁾. A lesão pulmonar que ocorre após a CEC é secundária às alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas ^(11, 12) que, em ultima instancia estão associadas à hipoxemia persistente, edema pulmonar de alta permeabilidade, cuja resolução pode levar de horas a dias ^(9, 13).

Durante a circulação extracorpórea, alguns eventos poderiam contribuir teoricamente para a disfunção do sistema mucociliar. Ao inicio da circulação extracorpórea, a ventilação mecânica é interrompida, e os pulmões são desinflados para permitir uma adequada visualização do campo cirúrgico. Além disto, durante a CEC, o padrão de distribuição da circulação é modificado, passando de fluxo pulsátil para fluxo contínuo com pressão constante e a temperatura do sangue é reduzida de acordo com a técnica de proteção miocárdica utilizada. Também durante a assistência circulatória artificial, a intensa resposta inflamatória secundária à exposição dos elementos do sangue nos tubos e membranas não endotelizadas do circuito extracorpóreo poderia levar a edema de estruturas relacionadas ao sistema mucociliar .

Uma vez que o aparelho respiratório é afetado por procedimentos anestésicos e cirúrgicos, hipotetizamos que a função mucociliar também poderia ser afetada de maneira imediata pela instituição da CEC.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos imediatos da CEC sobre o sistema de transporte mucociliar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema mucociliar respiratório

A mucosa das vias aéreas, desde as cavidades nasais até os bronquíolos respiratórios, é constituída de um epitélio pseudoestratificado, cilíndrico ciliado, entremeado por glândulas submucosas e células caliciformes, que são os elementos celulares responsáveis pela produção do muco respiratório ⁽¹⁴⁾.

O aparelho mucociliar tem como principal função a remoção de partículas ou substâncias potencialmente agressivas ao trato respiratório por meio de transporte pelos cílios, ou alternativamente, pela tosse e espirro, nos quadros de hiperprodução de muco, como rinite alérgica, rinossinusites, bronquite crônica, fibrose cística e asma ⁽¹⁵⁾.

Os cílios são os propulsores do transporte mucociliar (TMC); e seu número por célula varia de 50 a 100, sofrendo influência da idade e posição no trato respiratório ⁽¹⁶⁾.

São compostos de um axonema clássico de nove pares de microtúbulos periféricos (A) e uma central (B). Os pares periféricos são conectados aos pares vizinhos por dois braços de dineína, um interno e outro externo e conectados ao par central, também por meio de proteínas contráteis. A conexão entre os microtúbulos A e B, através dos braços internos e externos, mediada por ATP, provoca o deslocamento dos cílios e

consequentemente, o batimento ciliar. Em condições normais, os cílios da mucosa septal e dos cornetos inferiores batem a uma frequência de 12-15 Hz (batimentos/segundo).

O batimento ciliar apresenta uma sequência coordenada, produzindo uma onda metacrônica, cujo mecanismo de controle permanece desconhecido, esta onda metacrônica dirige o fluxo do muco nas cavidades nasais em direção à nasofaringe, posteriormente à orofaringe e hipofaringe, onde as secreções são deglutidas ⁽¹⁷⁾. No trato respiratório inferior, o fluxo do muco se faz em direção à orofaringe. A frequência de batimento ciliar (FBC) é influenciada e dependente das propriedades viscoelásticas e de transporte do muco respiratório.

O tapete que reveste o epitélio ciliado é composto pelo muco respiratório e fluido periciliar. O muco possui duas camadas: fase sol (aquosa) inferior e fase gel (viscosa) superior, com espessura variando entre 0,5 e 2,0µm. O fluido periciliar basicamente é composto por água, cuja concentração é determinada por transporte ativo de Na e CI pelo epitélio respiratório. O batimento ciliar em sua fase inicial possui o componente de ação, onde o cílio passa pela fase sol com certa facilidade e posteriormente, com a ponta do cílio, existe uma interação com fase gel, em que é proporcionado o estímulo mecânico para o transporte da camada do muco. Na fase de recuperação, o cílio dobra-se lateralmente voltando à sua posição original pela fase sol a fim de reiniciar um novo ciclo de batimento ciliar ⁽¹⁵⁾.

O muco respiratório é uma complexa mistura de secreções provenientes das células caliciformes, glândulas submucosas, lacrimais e água. É ainda composto por células inflamatórias como macrófagos, basófilos, mastócitos e eosinófilos, cujas concentrações variam nos diferentes estados patológicos ⁽¹⁷⁾.

Em condições fisiológicas, a coleta do muco respiratório é extremamente difícil e sua análise envolve problemas metodológicos devido à pequena quantidade de muco obtida. Desta forma, a grande maioria dos estudos sobre o muco respiratório humano são desenvolvidos em condições de hipersecreção brônquica onde a coleta da amostra é feita através da expectoração espontânea ^(18, 19).

Como alternativa à broncoscopia, a coleta do muco respiratório pode ser realizada através do tubo orotraqueal, durante anestesia geral, utilizando-se uma escova citológica para acessar a amostra ⁽²⁰⁾.

Em condições patológicas, existe uma intensa modificação na composição do muco, afetando de forma direta e indireta a função mucociliar, sobretudo devido a alterações nas propriedades viscoelásticas do muco respiratório ⁽¹⁷⁾.

O muco respiratório é um fluido não newtoniano com características viscoelásticas, ou seja, possui propriedades físicas de matéria sólida, componente elástico e de líquido, componente viscoso ⁽²¹⁾. Como sólido é capaz de responder a força a ele aplicada e como líquido, absorve energia e responde com uma defasagem de 90° a esta força. Trata-se de uma

característica essencial para o deslocamento do muco frente à força aplicada pelo cílio durante o batimento ciliar. A tensão de superfície induz fluxos dentro do fluido e pode causar fechamento das vias aéreas pulmonares em razão das formações de tampão de muco se a capa do liquido for suficientemente espessa. A estabilidade da capa liquida também é influenciada pela natureza viscoelástica do fluido ⁽²¹⁾.

Este comportamento pode-se encontrar nos mais comuns dos tipos de fluidos não newtonianos, é chamado comportamento pseudoplástico, na qual existe uma diminuição na viscosidade ao aplicar em aumento a tensão de corte ou de cisalhamento.

O muco respiratório é um material biológico bastante complexo. Além das propriedades reológicas, outras características são importantes para seu transporte, tanto pelo cílio como pela tosse. A adesividade corresponde à força necessária para se alcançar a separação entre o fluido adesivo (muco) e a superfície aderente (epitélio respiratório). A hidrofobicidade caracteriza a habilidade do fluido em se espalhar em uma superfície plana sólida e lisa e isenta de cargas eletrostáticas. O fenômeno ocorre em razão da existência de uma interação finita entre a superfície sólida e as moléculas do fluido. O grau de hidrofobicidade pode ser determinado pela medida do "ângulo de contato" entre a tangente da interface líquido/ar e o plano horizontal ⁽²²⁻²⁵⁾.

A eficiência do transporte mucociliar é dependente da perfeita interação entre o cílio e o muco, dependendo, portanto, da integridade do epitélio das vias aéreas, com células ciliadas funcionais e da manutenção do muco, com propriedades químicas e físicas que permitam o adequado acoplamento entre o muco e o cílio. O estudo do transporte mucociliar pode ser realizado *in vitro*, método que proporciona a observação direta, por exemplo, utilizando-se o palato de rã ou traqueia bovina, ou *in vivo*, com o uso de marcadores radioisótopos, ou *ex vivo* em epitélio respiratório extraído durante cirurgia, ou ainda, para a avaliação do transporte mucociliar nasal, o teste da sacarina.

Quando o TMC está deficiente, seja por alterações das propriedades físicas e ou químicas do muco ou por alteração ciliar, entra em ação o segundo mecanismo, o transporte do muco por meio da tosse ou de outras interações do muco com o fluxo de ar.

Atualmente há uma série de métodos e técnicas que estudam o sistema mucociliar, sendo de relevância clinica e experimental ⁽²⁶⁾, permitem averiguar o comportamento do sistema mucociliar e sua resposta a diversos insultos em seu funcionamento normal.

Um resumo dos métodos para o estudo do sistema mucociliar encontra-se nos dados da Tabela 1:

MÉTODO	APLICAÇÃO
Frequência de Batimento Ciliar	Avaliar a eficiência do batimento ciliar
TMC na Traquéia	Avaliar o transporte mucociliar in situ
TMC em Palato de rã	Avaliar o transporte mucociliar in vitro
Ângulo de Contato	Avaliar a "hidrofobicidade" da secreção
Máquina Simuladora da Tosse	Avaliar a transportabilidade do muco in vitro
Viscosidade no muco respiratório	Avaliar a viscosidade de fluidos Newtonianos e não Newtonianos

 Tabela 1 Resumo dos métodos para o estudo do sistema mucociliar
3.2 Efeitos da anestesia geral sobre a transportabilidade do muco

A anestesia geral com bloqueio neuromuscular é responsável por uma série de alterações na mecânica respiratória, nos volumes pulmonares e na troca de gases pelos pulmões. Pode ocorrer uma diminuição de até 20% na capacidade residual funcional ⁽²⁷⁾, conseqüente à perda da atividade muscular do diafragma e da parede torácica ⁽²⁸⁾, o fluxo de gás é preferencialmente distribuído nas regiões menos dependentes dos pulmões formando atelectasias após a indução anestésica e intubação traqueal ^(29, 30).

A intubação traqueal é o método mais utilizado para a manutenção das vias aéreas. Sob anestesia geral, o sistema de transporte mucociliar mantém-se como único sistema mecânico de defesa. É frequentemente deprimido pela localização do tubo endotraqueal e pelos estímulos mecânicos da ventilação controlada ⁽³¹⁾.

Durante a anestesia geral, muitos fatores podem alterar a velocidade do muco traqueal e o aclaramento mucociliar, tais como: drogas inalatórias e endovenosas, concentrações altas de oxigênio, trauma no epitélio respiratório, a umidificação inadequada dos gases inspirados e a ativação dos mediadores inflamatórios ⁽³²⁾.

Anestésicos voláteis alteram a transportabilidade do muco: primeiro, por um aumento temporário da atividade mucociliar como mecanismo de defesa e depois, diminui ao longo do tempo anestésico ⁽³³⁾.

O aumento no tempo anestésico e cirúrgico predispõe à diminuição da atividade mucociliar provocada pelo aumento de secreção, inflamação e edema com complicações pós-operatórias, como retenção de secreções, infecção pulmonar e atelectasias, sobretudo associadas às doenças pulmonares inflamatórias e obstrutivas crônicas ⁽³⁴⁾.

A ventilação com gases secos pode levar a perda de calor e umidade causando disfunção progressiva do trato respiratório, sendo o transporte mucociliar o mais afetado ⁽³⁵⁾, pelo ressecamento da mucosa e pela desidratação do muco. A adição dos trocadores de calor e umidade (HME) aos sistemas de anestesia parecem reverter às alterações do sistema mucociliar, reduzindo a perda de água no epitélio respiratório e manutenção das propriedades do muco ⁽⁶⁾.

3.3 Efeitos da cirurgia torácica sobre a transportabilidade do muco

Os mecanismos envolvidos no dano da função mucociliar após cirurgia torácica ainda não são bem estabelecidos e podem estar associadas como uma serie de fatores, tais como: esternotomia, trauma cirúrgico, denervação, desvascularização, abertura da cavidade pleural, número de enxertos ou transplante, tempo de duração da cirurgia, desidratação, hipotermia e imunossupressão ⁽³⁶⁾.

Estudos experimentais recentes com ratos que foram expostos à transecção bronquial e reanastomose demonstraram que, tanto a FBC como a velocidade de transporte mucociliar, após o procedimento e após 30 dias, foram prejudicadas, assim como as alterações nas propriedades superficiais do muco ^(37, 38).

3.4 Papel da circulação extracorpórea na disfunção do sistema respiratório

O uso de circulação extracorpórea durante a realização de cirurgia cardíaca vem sendo descrito como fator isolado relacionado à piora da função pulmonar no pós-operatório ⁽⁹⁾. A etiologia desta disfunção é de natureza multifatorial e pode ocorrer mesmo em pacientes sem doença pulmonar pré-operatória ⁽⁹⁻¹¹⁾. A apresentação da disfunção pulmonar pós-operatória vai desde de hipoxemia pós-operatória detectada na maior parte dos pacientes até o aparecimento de síndrome do desconforto respiratório agudo em 2 % dos pacientes ⁽³⁹⁾. Em estudo envolvendo uma coorte de 400 pacientes submetidos a diversos tipos de cirurgias cardíacas, Gott et al. observaram redução de 40% na complacência pulmonar dinâmica e aumento no gradiente alvéolo-arterial de oxigênio nas primeiras 24 horas de pós-operatório em todos os pacientes ⁽⁴⁰⁾. Szeles et al. observaram que o *odds ratio* para o desenvolvimento de hipoxemia pós-operatória foi de 2,3

para CEC de até 120 minutos, e 3,1 para CEC superior a 120 minutos, em relação-as operações sem CEC.

Durante a CEC, ocorre a exposição de elementos celulares do sangue, de componentes dos diversos sistemas inflamatórios e do sistema da coagulação à superfície não endotelizada do circuito extracorpóreo e oxigenador de membrana ^(41, 42). Neutrófilos, monócitos, macrófagos, assim como as células do endotélio são ativados na circulação, resultando em secreção local e sistêmica de mediadores inflamatórios na circulação. Estes elementos figurados circulantes são subsequentemente aprisionados na circulação pulmonar (43, 44). O processo inflamatório é agravado pelo fenômeno de isquemia e reperfusão associado à pausa ventilatória e o desvio do fluxo sanguíneo da circulação pulmonar por meio do circuito extracorpóreo, que resulta em aumento adicional na permeabilidade endotelial pulmonar⁽⁴⁵⁾. Esta resposta inflamatória pode causar o acúmulo de fluidos no interstício pulmonar causando um aumento da distância do espaço entre o capilar e o alvéolo ventilado em um determinado segmento pulmonar, piorando as trocas gasosas. Além disto, em razão de inflamação pulmonar pode ocorrer alteração nos mecanismos de vasorregulação pulmonar devido ao processo inflamatório, o que poderia piorar o desacoplamento da ventilação e da perfusão pulmonar.

Em associação ao colapso pulmonar já iniciado com a indução da anestesia geral necessária para a cirurgia ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾, o edema pulmonar inflamatório pode contribuir para a gênese da hipoxemia pós-operatória por meio do aumento da tendência à atelectasia das regiões pulmonares

dependentes que ocorre em uma parte significativa dos pacientes. De fato, Magnunsson et al. observaram experimental que o desenvolvimento de atelectasias é significativamente mais importante em sujeitos submetidos à circulação extracorpórea do que nos submetidos apenas à toracotomia ⁽¹⁰⁾.

Apesar da correlação entre o uso da circulação extracorpórea e o desenvolvimento da disfunção do sistema respiratório estar bem descrita desde os primórdios da cirurgia cardíaca, pouco se sabe sobre o impacto do suporte circulatório artificial necessário para a realização de procedimentos cardíacos sobre a atividade do sistema mucociliar.

4 MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética para pesquisas em animais da FMUSP, o estudo foi realizado nos laboratórios de investigação médica da Disciplina de Anestesiologia (LIM-08) e de poluição atmosférica experimental do Departamento de Patologia (LIM-05) da FMUSP. Os recursos financeiros para o estudo foram obtidos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo 478485/2004-2.

4.1 População estudada

Vinte e dois porcos da mistura das raças Large White e Landrace com idade de 3 a 4 meses, provenientes de criadouro referenciado completaram o estudo. Os animais foram submetidos a exame clínico completo por médico veterinário, assim que chegaram ao laboratório e foram tratados respeitando-se as normas éticas para experimentos em animais propostas pelo Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA). Foram excluídos do estudo oito animais (cinco animais no grupo controle e três no grupo CEC) que apresentavam alterações na ausculta pulmonar e cardíaca, doenças cardiopulmonares prévias e sinais de infecção na avaliação préoperatória ou instabilidade hemodinâmica e anormalidades ventilatórias durante a fase de coleta de dados.

4.2 Desenho do estudo

Estudo experimental prospectivo de curta duração desenvolvido para observar os efeitos agudos da CEC sobre o sistema mucociliar em animais de grande porte com características do sistema respiratório semelhante a humanos e divididos em dois grupos de maneira aleatória:

Grupo Controle (n=10): Ventilação mecânica com toracotomia sem CEC, durante o período de 180 minutos após a preparação dos animais.

Grupo CEC (n=12): Ventilação mecânica com toracotomia e instalação de CEC por um período de 90 minutos, seguido de 90 minutos de observação, após a saída da CEC.



A figura abaixo mostra o delineamento do estudo:

Figura 1 - Delineamento experimental

A alocação dos animais nos grupos Controle e CEC foi feita por meio de sorteio na manhã do dia do experimento, antes da chegada do animal ao laboratório.

Após a preparação do animal, conforme descrito nas seções seguintes, foram realizadas coletas dos parâmetros hemodinâmicos, das variáveis de mecânica respiratória, amostras de muco e de sangue arterial e venoso nos momentos T0 (basal), T90 (90 minutos, após o início do experimento no grupo controle ou ao final da CEC no grupo CEC) e T180, após o início do experimento. Em ambos os grupos, foram colhidos fragmentos de traqueia nos momentos T0 e T180.

4.3 Preparação e instrumentação dos animais

Após admissão à sala de experimentos, os animais foram sedados com cetamina 5 mg.kg⁻¹ associada à midazolam 0,25 mg.kg⁻¹ pela via intramuscular. Uma vez estabelecido o acesso venoso na veia marginal na orelha com cateter de calibre 20G (Abbocath Tplus – Abbott, São Paulo, Brasil), realizou-se a indução anestésica que constituiu na aplicação de propofol 3 a 5 mg.kg⁻¹.

Após a intubação orotraqueal com cânula traqueal de diâmetro apropriado (6,5 ou 7,0 mm), a manutenção da anestesia foi realizada através da infusão contínua de fentanil 3 µg.kg.h⁻¹ e pancurônio 5 µg.kg.min⁻¹ e isoflurano em concentrações de 1,2 % em circuito circular semifechado no aparelho de anestesia Primus® (Dräger; Lubeck, Alemanha) equipado com duplo canister preenchido com cal sodada.

A ventilação mecânica foi iniciada na modalidade volume controlado, ajustando-se o volume corrente em 10 mL.kg⁻¹, pausa inspiratória de 10 % do tempo inspiratório, frequência respiratória entre 15 a 20 ciclos por minuto para obtenção de um PETCO₂ entre 35 e 45 mmHg e PEEP de 5 cm de H₂O. Foi utilizado trocador de calor e umidade (HME) do tipo higroscópio e bacteristático Humid-Vent Compact-S® (Gibeck, Sweden) com espaço morto de 38 ml. Este dispositivo foi conectado entre a peça em Y do circuito respiratório e o tubo endotraqueal, com intuito de manter a temperatura e humidade constantes durante o período de ventilação mecânica. Após a indução anestésica, os animais foram monitorados com oxímetro de pulso posicionado na língua, eletrocardioscópio com duas derivações simultâneas e temperatura esofagiana, usando um monitor multiparamétrico (Viridia Modelo 885, Hewlett Packard) e analisador de gases (Criticare analisador de gases anestésicos e capnógrafo – Criticare Systems INC, EUA), que fornecia de forma contínua a concentração de oxigênio e dióxido de carbono (ETCO₂) e as concentrações de isoflurano inspirado e expirado. Os valores das variáveis da mecânica respiratória foram colhidos do respirador microprocessado do equipamento de anestesia, após a calibração automática a cada vez que o equipamento era ligado.

Um cateter de polietileno de calibre 18G foi introduzido após dissecção na artéria femoral esquerda e acoplado a um transdutor de pressão para monitoração da pressão arterial sistêmica e obtenção de amostras de sangue arterial.

A veia jugular direita foi dissecada para a passagem do cateter de artéria pulmonar 7,5 F (Swan-Ganz thermodilution catheter model 131HF7-Baxter Healthcare Coorporation, CA, USA), o qual foi inserido até se observar curva característica de posicionamento no átrio direito. Em seguida, insuflou-se o balonete distal com 0,5 ml de ar. Seu trajeto pelo ventrículo direito e artéria pulmonar com suas curvas características foi observado no monitor. Ao verificar sua impactação, a partir do traçado com "achatamento da curva", o balonete foi desinsuflado, o cateter foi considerado adequadamente posicionado e, por fim, fixado nesta posição. Os transdutores de pressão (Ventcheck modelo 101 – Novametrix Medical Systems INC. Connecticut, USA) foram preenchidos com solução salina heparinizada (Liquemine® – Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA) e zerados à pressão atmosférica no nível da linha axilar média.

Após o término da monitorização hemodinâmica, foi realizada uma traqueostomia para permitir a coleta de fragmento da traqueia para avaliação da atividade do sistema ciliar respiratório e facilitar a coleta de muco da traqueia. Os parâmetros do respirador não foram alterados ao longo do procedimento experimental.

Ao término das manipulações experimentais iniciais, foi realizada a manobra de expansão pulmonar, conforme descrito por Magnusson et al., com intuito de reverter o colapso pulmonar relacionado à indução anestésica ⁽⁴⁹⁾. A manobra de expansão pulmonar foi feita por meio de ventilação manual, mantendo um pico da pressão das vias aéreas de 30 cm de H₂O, durante 30 segundos, esse procedimento foi repetido por três vezes.

A infusão de líquidos foi feita da seguinte forma: 400 ml/h de solução de ringer lactato durante todo o experimento. Para controle da diurese, os animais foram submetidos à sondagem vesical com utilização de sonda Foley 10 Fr previamente lubrificada com gel de cloridrato de lidocaína a 2%.

Após a fase de monitorização os animais foram submetidos à esternotomia mediana e instalação do circuito da CEC (grupo CEC) conforme descrito nas seções seguintes.

Após as coletas dos parâmetros estudados no momento T180, foi realizada excisão do segundo fragmento de traqueia, e os animais foram

eutanaziados com injecção de 2,5 mEq.kg⁻¹ de cloreto de potássio e encaminhados ao setor de coleta de lixo infectante da FMUSP.

4.4 Esternotomia

Todos os animais dos dois grupos (Controle e CEC) foram submetidos à esternotomia mediana. Após a realização da esternotomia, todos os animais do grupo Controle foram cobertos com campos cirúrgicos ao longo do período do experimento, para prevenir hipotermia e reduzir as perdas hídricas por evaporação.

4.5 Técnica de instalação da CEC

Após o termino da fase de indução anestésica, instrumentação e esternotomia, os animais do grupo CEC foram submetidos à instalação de circulação extracorpórea átrio direito aorta, de acordo com as etapas descritas a seguir: 1) abertura do pericárdio, 2) confecção de bolsas para instalação das cânulas de CEC em aorta e átrio direito, 3) administração de heparina intravenosa na dose de 500 UI.kg⁻¹, 4) canulação da aorta e do átrio direito, 5) entrada na CEC, mantida por 90 minutos. Durante a CEC, os animais foram submetidos a uma hipotermia leve de 36°C (10% abaixo da

temperatura normal do animal, que é em torno de 39-40°C). Para a CEC, foram utilizados equipamentos adequados ao tamanho dos animais: oxigenador de membrana, reservatório venoso, hemoconcentrador, máguina da CEC, misturador de gases, circuitos de tubos e cânulas arteriais e venosas, de acordo com o tamanho das estruturas anatômicas dos animais. O circuito extracorpóreo foi preenchido com 1.500 mL de solução de Ringer lactato, 250 mL de solução de manitol 10% e 10.000 UI de heparina sódica. O fluxo da assistência circulatória utilizado durante a CEC foi de 100 mL/kg e uma vez que este valor fosse atingido, era realizada a interrupção da ventilação mecânica. Ao final do período de 90 minutos de observação, a ventilação mecânica foi restabelecida e o fluxo da circulação extracorpórea foi diminuído gradualmente e interrompido, assim que a pressão arterial média estivesse acima de 60 mmHg. Não foram utilizados fármacos inotrópicos ou vasopressores O efeito da heparina sódica foi revertida com protamina (1mg por cada 100 UI usadas) no grupo CEC, ao final da circulação extracorpórea.

4.6 Avaliação hemodinâmica e da mecânica respiratória

Os seguintes parâmetros hemodinâmicos e ventilatórios foram avaliados nos tempos de coleta, conforme descritos no desenho experimental:

Frequência Cardíaca (FC): no decorrer do procedimento, freqüência e ritmo cardíacos foram avaliados pelo monitor cardíaco (Viridia Model 885 -Hewlett Packard). Pressão Arterial (PA): a pressão arterial foi mensurada diretamente, a partir do cateter da artéria femoral, acoplado ao transdutor de pressão do monitor de pressão, obtendo-se a pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Pressão de Artéria Pulmonar: as pressões das artérias pulmonares sistólicas, diastólicas e médias (PAPmed) foram obtidas pelo cateter da artéria pulmonar, conectando a via distal a um transdutor de pressão. Pressão de Oclusão da Artéria Pulmonar (PoAP): foi obtida por insuflação do balão localizado na extremidade distal do cateter da artéria pulmonar. Pressão Venosa Central (PVC): a pressão venosa central foi obtida, colocando a via proximal da cateter de artéria pulmonar no átrio direito, e conectando-a ao transdutor de pressão. Débito Cardíaco (DC): foi medido pelo método de termodiluição, utilizando computador de débito cardíaco (Viridia Model 885 – Hewlett Packard). A constante usada para os cálculos do aparelho foi de 0,287, própria para a marca e o modelo do cateter. Com a extremidade do cateter posicionada na artéria pulmonar, a medida do débito cardíaco foi realizada por meio da injeção de 5 ml de solução fisiológica a 0,9% em temperatura ambiente (23°C a 25°C), pela porção proximal do cateter. Houve três medidas consecutivas do DC, e seu valor médio foi utilizado em (L.min⁻¹). O índice cardíaco foi calculado a partir da seguinte fórmula:

IC = DC/SC

sendo:

IC = índice cardíaco em L.min.m⁻²

DC = débito cardíaco em L.min⁻¹

SC = superfície corpórea em m^2

Para o cálculo da superfície corpórea, empregou-se a seguinte equação ⁽⁵⁰⁾:

$$SC = K.p^{2/3}$$

Em que:

K =constante igual a 0,122 para cães acima de 4 kg;

p =peso do cão em quilogramas.

A partir dos dados obtidos, foram calculados:

Índice da Resistência Vascular Sistêmica - IRVS (V.N.= 1.970 a 2.390 din.s.cm⁵.m⁻²). Índice da Resistência Vascular Pulmonar - IRVP (V.N.= 225 a 315

din.s.cm⁵.m⁻²).

Os valores do volume corrente expirado, frequência respiratória, pressão de pico, pressão de *plateau* e pressão média das vias aéreas foram coletadas. Com estas variáveis e a PEEP utilizada, foi possível calcular a complacência estática (C_{stat}) do sistema respiratório, utilizando a fórmula C_{stat} (mL.cmH₂O⁻¹) = volume corrente/(pressão de *plateau* – PEEP).

4.7 Avaliação dos parâmetros metabólicos e da oxigenação sanguínea

Amostras sanguíneas arteriais e venosas foram obtidas de todos os animais para dosagem de hemoglobina, hematócrito e análise dos gases sanguíneos. As gasometrias arteriais e venosas foram analisadas no hemogasímetro ABL Radiometer 90 (Copenhagen, Dinamarca), e foram obtidos os valores de pH, PaCO₂ e PaO₂. Os valores de SaO₂, HCO₃ e EB foram calculados pelo hemogasímetro utilizando equações padrão. A partir das dosagens dos parâmetros laboratoriais e dos valores das pressões parciais dos gases inspirados, foram obtidos os cálculos dos seguintes parâmetros:

4.7.1 Relação entre a pressão arterial de oxigênio e a fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂)

Obtido diretamente pela relação entre:

PaO₂/FiO₂

Valor normal: acima de 200.

Este atributo foi calculado nos seguintes momentos:

4.7.2 Gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (GA-aO₂)

A gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (GA-aO₂) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$GAaO_2 = PAO_2 - PaO_2$$

Sendo:

PAO₂ = pressão alveolar de oxigênio

PaO₂ = pressão arterial de oxigênio

A pressão alveolar de oxigênio (PAO₂) foi calculada pela fórmula

Sendo:

PB = pressão barométrica PH₂O = pressão de vapor de água FiO₂ = fração inspirada de oxigênio PaCO₂ = pressão arterial de CO₂ Valores normais para FiO₂ de 21%: 10 a 15 mmHg. Valores normais para FIO2 de 60%: abaixo de 300 mmHg

4.7.3 Shunt pulmonar

Foi calculado pela da seguinte fórmula:

$Shunt = (CcO_2 - CaO_2)/(CcO_2 - CvO_2)$

Sendo:

CcO₂ = conteúdo capilar de oxigênio

CaO₂ = conteúdo arterial de oxigênio

CvO₂ = conteúdo venoso de oxigênio

O conteúdo capilar de oxigênio é calculado pela seguinte fórmula:

$$CcO_2 = (Hb . 1, 34) + (PAO_2 . 0, 0031)$$

Sendo: Hb = hemoglobina PAO₂ = pressão alveolar de oxigênio

O conteúdo arterial de oxigênio (CaO₂) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$CaO_2 = (1,34 . Hb . SaO_2/100) + (PaO_2 . 0,0031)$$

Sendo: Hb = hemoglobina SaO₂ = saturação arterial de oxigênio PaO₂ = pressão arterial de oxigênio

O conteúdo venoso de oxigênio (CvO₂) foi calculado pela seguinte fórmula:

 $CvO_2 = (1,34 . Hb . SvO_2/100) + (PvO_2 . 0,0031)$

Sendo:

Hb = hemoglobina SvO₂ = saturação venosa de oxigênio PvO₂ = pressão venosa de oxigênio Valores normais de 3 a 5%.

4.8 Coletas do fragmento da traquéia

Durante a traqueostomia, foi dissecado fragmento da parede anterior da traqueia de 0,5 cm, acima da cânula de traqueostomia em ambos os grupos. Ao final do estudo, após 180 minutos da obtenção do primeiro fragmento traqueal, foi colhido um segundo fragmento da traqueia distal, região que não havia sido previamente manipulada. No grupo CEC, o momento da coleta da segunda amostra de traquéia na região distal que correspondeu a um período de 90 minutos, após a saída da circulação extracorpórea. As amostras foram acondicionadas em recipientes com solução fisiológica a 0,9% à temperatura de 2ºC e foram transportadas ao Laboratório de Poluição Atmosférica- LIM05 da FMUSP para análise.

4.9 Coletas do muco

Amostras do muco foram coletadas por meio do broncoscópio (PENTAX FB-I5bs, JAPAN). Este procedimento foi realizado através da introdução do broncoscópio pelo brônquio superior direito e em segundo momento, o cateter escova foi progredido e foi obtido um escovado da mucosa desta região das vias aéreas. A coleta das amostras de muco foram realizadas em três momentos: o primeiro tempo (T0), após a traqueostomia nos dois grupos; o segundo tempo (T90), 90 minutos após a traqueostomia

no grupo Controle e ao final da CEC no grupo CEC; e o terceiro tempo (T180) aos 180 minutos após traqueostomia.

As amostras foram retiradas de forma cuidadosa e colocadas em tubos identificados, tipo "eppendorf" com vaselina para prevenir a desidratação do muco e foram congeladas em uma temperatura de -70°C para posterior análise.

4.10 Métodos de análise do epitélio respiratório

4.10.1 Avaliação da frequência de batimento ciliar (FBC)

Após a chegada das amostras do fragmento das traqueias ao Laboratório de Poluição Atmosférica- LIM05 da FMUSP, a FBC foi mensurada com o auxílio de microscopia óptica: microscópio ótico (Olympus BX 50®), câmera filmadora de alta velocidade (Sony -3CCD-color® vídeocâmara) acoplada ao microscópio e luz estroboscópica que emite flashes em velocidades que variam entre 0 e 30 Hz. Após o fragmento da traqueia ter sido focado no campo do microscópio e sua imagem obtida no monitor, ligou-se o estroboscópio na frequência máxima (30 Hz), sendo depois diminuída lentamente até não ser possível distinguir o movimento dos cílios de uma determinada área. O processo foi repetido três vezes por fragmento, no final obtive-se a média aritmética da frequência de batimento ciliar.

4.10.2 Transporte mucociliar da traqueia *in situ* (TMC)

Depois de ser avaliada a FBC, as amostras foram visualizadas numa lupa estereoscópica com aumento de 0,8 vezes acoplada ao microscópio ótico. Ao microscópio, também estava acoplada uma lente ocular reticulada que permite visualizar áreas em milímetros. Manteve-se um fluxo de solução salina nebulizada acima das amostras para fornecer umidade. Foi mensurado o aclaramento do muco *in situ* por observação direta da ponta de uma gota de solução de nanquim, colocada na superfície das amostras e que se deslocavam em sentido caudal-cefálico, que foi cronometrado e expresso, como velocidade (mm/s). O processo foi repetido três vezes por fragmento, no final obtive-se a média aritmética da frequência de batimento ciliar.

4.10.3 Análise histológica qualitativa do epitélio da traqueia

Após a última mensuração do TMC e FBC, foi coletada uma amostra do epitélio de fragmentos da traqueia que foi fixada em solução a 4% de formalina tamponada para processamento em rotina histológica.

Estes fragmentos foram desidratados em gradiente alcoólica (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes de 5 μ m (em micrótomo Leica RM2065®). Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólica (100° a 70°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes lavados em água corrente e contracorados com eosina

durante 15 minutos. A seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólica (95º a 100º), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise das alterações histopatológicas. As amostras foram analisadas à microscopia ótica de maneira qualitativa.

4.11 Métodos de análise do muco respiratório

4.11.1 Transportabilidade do muco in vitro pelo palato da rã (VTM)

O epitélio do palato da rã é pseudoestratificado, ciliado e secretor, com várias características similares ao das vias aéreas dos mamíferos ^(5, 20, 51). Apresenta ainda a vantagem de constituir uma superfície plana, passível de observação direta por microscópio. Dadas estas características, este modelo é classicamente aceito como *in vitro* para avaliar o TMC, sendo utilizado por vários autores tanto para o estudo do transporte de diferentes amostras do muco como para avaliar a inibição e ativação ciliar ^(20, 22, 24, 52) ^(5, 25, 53, 54). O palato é removido e, então, colocado sobre uma gaze embebida com uma solução de ringer diluída em água na proporção de 1:2, solução apropriada para a manutenção do epitélio de anfíbios, colocado em um recipiente de vidro, vedado com um filme plástico e armazenado em refrigerador a 4°C, por um período que pode variar de 12 a 48 horas. Nestas condições, a integridade da atividade ciliar será mantida ^(36, 53, 54). No terceiro dia, uma amostra do muco é coletada com estilete através da extremidade posterior do palato e imediatamente, imersa em óleo mineral para prevenir a desidratação. Este muco autólogo será utilizado como muco-teste, em estudos em que se deseja avaliar a transportabilidade de mucos exógenos, por exemplo, coletados de pacientes ou de outros animais experimentais ou para avaliar a integridade do aparelho mucociliar. Durante a avaliação do TMC, o palato da rã é mantido à temperatura ambiente, dentro de uma câmara de acrílico, com 100% de umidade, garantido por uma nebulização ultrassônica com ringer de anfíbio. A velocidade de transporte ciliar é aferida, colocando-se uma amostra do muco (cerca de 5µl) sobre o epitélio na região anterior do palato da rã. O deslocamento é visualizado através de uma lupa estereoscópica (Zeiss), em aumento de 0,8 vezes, ao qual está acoplada uma ocular reticulada (Figura 2).



Figura 2 - Representação esquemática do transporte mucociliar no palato da rã (com permissão de Nakagawa, 1997). 1: lupa estereoscópica com objetiva e ocular reticulada; 2: fonte de luz externa; 3: suporte de vidro para o palato e rã; 4: nebulizador ultrassônico; 5: câmara de acrílico; 6: palato da rã

Através da ocular reticulada, cronometra-se o tempo que a amostra do muco gasta para percorrer 6 mm do epitélio do palato ^(19, 55); foram cronometrados cinco deslocamentos para cada amostra, intercalando-se as medidas do muco dos porcos com o da rã. A velocidade de transporte das amostras do muco dos dois grupos e a velocidade de transporte do muco da rã foram comparadas entre si e os cálculos foram expressados em termos de velocidade relativa (muco porco/muco rã)⁽¹⁾.

4.11.2 Ângulo de contato (AC)

O aparelho que permite a mensuração do ângulo de contato é formado por uma lupa com braço articulado que permite movê-la no sentido lateral, para frente e para trás. A lupa tem capacidade de aumento de 25 vezes e sua ocular possui um goniômetro com escala de zero a 180 graus. Uma pequena amostra do muco de, aproximadamente, 5 μL, após ser lavada em éter de petróleo, é colocada sobre a lâmina, tratada com solução sulfocrômica, para retirada das cargas elétricas que interferem na medida do ângulo. A lâmina é posicionada sobre um suporte de ferro temperado, com furos e, por sua vez, este em banho-maria à temperatura de 37°C. A amostra do muco é protegida com uma pequena câmara de acrílico para impedir sua desidratação por exposição ao ar ambiente e à luz artificial. Amostras do muco com um baixo ângulo de contato tendem a apresentar um melhor transporte pela tosse ⁽⁵⁶⁾.

A mensuração é efetuada, utilizando-se o goniômetro, sendo medido o ângulo formado entre a gota do muco e a superfície da lâmina (Figura 3).



Figura 3 - Representação esquemática do equipamento utilizado para a medida do ângulo de contato (com permissão de Nakagawa, 1997). 1: lupa com goniômetro e braço articulado; 2: fonte de luz externa; 3: câmara de acrílico; 4: suporte de ferro temperado perfurado; 5: reservatório de água em banho-maria; 6: amostra do muco e medida do ângulo de contato

Uma pequena amostra do muco de cada um dos grupos de, aproximadamente, 5 µL, após ser lavada em éter de petróleo, foi colocada sobre a lâmina, tratada com solução sulfocrômica. A lâmina foi posicionada sobre um suporte de ferro temperado, com furos, e este, por sua vez, em banho-maria à temperatura de 37 °C. A amostra do muco foi protegida com uma pequena câmara de acrílico para impedir sua desidratação por exposição ao ar ambiente e à luz artificial. A mensuração foi efetuada, utilizando-se o goniômetro, sendo medido o ângulo formado entre a gota do muco e a superfície da lâmina. Todas as amostras de muco foram analisadas.

4.11.3 Transporte do muco respiratório *in vitro* pela tosse (TMT)

Para avaliar o TMT, foi utilizada a máquina simuladora da tosse, adaptada de King et al. ⁽²²⁾. Este simulador consiste de um cilindro de ar de 49,5 litros, que, sob pressão de 40 polegadas/libra, o gás é enviado a um solenoide que, por sua vez, oclui o ar em intervalos de 2 segundos e mantém-se aberto durante 0,5 segundo. O ar é então, transmitido a um tubo de acrílico de 4 mm de diâmetro interno por 133 mm de comprimento. O fluxo aéreo obtido é de, quase, 235 litros/minuto (Figura 4). Determinou-se o TMT da seguinte forma: colocou-se uma pequena quantidade de amostra do muco respiratório (de, aproximadamente, 5 µL) em éter de petróleo para remoção da vaselina. Posicionou-se a amostra com um estilete no tubo de acrílico, onde se efetuou a tosse artificial. O deslocamento do muco foi observado e registrado por meio de uma régua milímetrada, todas as amostras do muco foram analisadas.



Figura 4 - Representação esquemática do modelo utilizado para a análise da transportabilidade do muco pela tosse (com permissão de Nakagawa, 1997). 1: cilindro de ar sintético; 2: válvula solenoide; 3: controlador da válvula solenoide; 4: régua milimetrada; 5: tubo de acrílico

4.11.4 Viscosidade do muco respiratório através do viscosímetro Cone-Plate® (VM)

Uma alternativa para avaliar as propriedades reológicas de amostras de muco respiratório é a mensuração da viscosidade que é representada pela letra grega η , é a medida do atrito interno de um fluido. A viscosidade de um fluido indica sua resistência ao escoamento, sendo o inverso da viscosidade, a fluidez.

Encontram-se equipamentos que podem ser utilizados para a mensuração de pequenas quantidades de amostra, aproximadamente, 5 µl ideais para a mensuração dos fluidos corporais, tais como sangue e muco respiratório. São instrumentos digitais, de grande precisão, que permitem a determinação do coeficiente de viscosidade dos fluidos newtonianos ou não newtonianos, com base no princípio rotacional. Registram a força (torque), que é necessária para girar um eixo de dimensões conhecidas a uma velocidade preestabelecida, enquanto este estiver em contato com a amostra do fluido. Com a utilização de um arranjo do tipo "spindle" - prato (também conhecido como "cone-plate"), que permite a mensuração da viscosidade em quantidades reduzidas de fluido.

As coletas dos dados são realizadas por um software comercializado com o equipamento, que permite programar o número de coleta de dados durante um período de análise preestabelecido para uma determinada velocidade rotacional, escolhida no painel de controle do equipamento. Os resultados obtidos do valor da viscosidade pelo viscosímetro são chamados de viscosidade aparente, são expressos em Poise ou centipoise (cp), dados por: um cp= 10⁻² poise (CGS)= mPascal x segundo (10⁻³Pa.s) no sistema MKS.

Estes são arquivados no computador para análise posterior. O procedimento para cada alíquota de muco não é único, permitindo várias análises de cada amostra, em diferentes velocidades aparentes. Nos dados da figura abaixo, observa-se a representação esquemática do viscosímetro

utilizado pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Figura 5 - Representação esquemática do viscosímetro Brookfield DV-II+Pro®

No laboratório de Poluição Experimental, as análises foram realizadas com o "spindle" tipo CP-40, coligado ao viscosímetro Brookfield DV-II+Pro® (Brookfield; Middleboro, MA) e ao programa de software Brookfield WINGATHER®, compatível com a plataforma Windows® que realiza a aquisição dos dados e geração de curvas múltiplas de viscosidade.

Para utilização do Brookfield DV-II+Pro®, após a verificação do adequado posicionamento do viscosímetro pelo nível de bolha e ajustes dos pés, tanto o viscosímetro como computador PC foram ligados à rede elétrica. No computador, acionou-se o programa WINGATHER® e no viscosímetro, após a realização do procedimento de calibração convencional, iniciou-se a análise do muco da seguinte forma: colocou-se uma pequena quantidade de amostra do muco respiratório (de, aproximadamente, 5µl) em éter de petróleo para remoção do óleo de vaselina, posicionando a amostra no prato com o auxílio de um estilete. Fechou-se o prato com a trava delicadamente, tomando cuidado para não esbarrar as bordas do prato no spindle. Valores de viscosidade aparente foram obtidas nas seguintes velocidades 1, 5, 10, 20, 50 e 100 em revoluções por minuto (RPM) nas setas do mostrador de funções que corresponde às taxas de cisalhamento ou de corte seguintes: 8, 38, 75, 150, 375 e 750, respectivamente, expressados em segundos inverso ou segundos recíproco (s⁻¹). Os resultados de viscosidade aparente obtidos foram arquivados no computador.

A taxa de cisalhamento de 750 s⁻¹ (100 RPM) foi escolhida e que permitiu medir a viscosidade aparente de todas as amostras sem exceder as limitações de torque (%) do aparelho (57).

A viscosidade aparente foi expressa em pascal x segundo x 10⁻³ (mPa.s). Todo o procedimento foi realizado à temperatura constante de 21°C, mantidos por banho-maria.

4.12 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas estatísticos SPSS 15 (SPSS Inc., EUA) e Aabel 3.0.5 (Gigawiz Ltd. Co., EUA). Todas as variáveis quantitativas estão apresentadas como média e desvio padrão, mediana (25% - 75%) ou como valor percentual. Os dados demográficos (peso e área da superfície corporal) foram comparados entre os grupos usando o teste T de Student para amostras não pareadas. A distribuição de gênero entre os grupos foi comparada utilizando o Teste exato de Fischer. Os resultados dos parâmetros hemodinâmicos, ventilatórios, de oxigenação sanguínea, metabólicos e de avaliação da função mucociliar foram comparados entre os diferentes grupos, por meio da análise de variância de duas vias para medidas repetidas, considerando-se como fator intergrupos, a variável grupo; como fator intragrupo, a variável momento e a presença de interação entre os fatores grupo e momento. Quando necessário, foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para detectar diferenças entre os momentos e/ou grupos. Para análise de comparação da viscosidade nas diferentes velocidades entre os grupos, utilizou-se o teste ANOVA com nível de significância fixado em 5%. Para avaliar as diferencias entre as viscosidades nos distintos tempos, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, dado que as amostras mostraram distribuição não paramétrica. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Características dos animais estudados

Vinte e dois animais dos grupos controle e CEC completaram o estudo. Como pode ser observado nos dados da tabela 2 não houve diferenças significativas entre distribuição de gênero, peso e superfície corpórea dos animais estudados.

	Controle CEC (n=10) (n=12)		Valor p	
Gênero (M/F; n)	7/3	11/1	ns	
Peso (kg)	39,4 ± 3,9	41,3 ± 2,8	ns	
ASC (m ²)	1,04 ± 0,09	1,07 ± 0,05	ns	

 Tabela 2 –
 Características dos animais estudados

Legenda: M – macho; F – fêmea; ASC – área de superfície corporal.

5.2 Dados hemodinâmicos

Os dados da tabela 3 mostram os parâmetros hemodinâmicos nos grupos controle e CEC. Como pode ser observado, não houve diferença estatística entre os grupos no que concerne aos parâmetros hemodinâmicos estudados.

	Grupo	Т0	Т90	T180	Valor p	
FC (bpm)	CEC	98,4 ± 17,1	125,5 ± 16,4	121,4 ± 20,4	20	
	Controle	109,4 ± 18,0	116,2 ± 18,1	123,6 ± 18,7	115	
PAM (mmHg)	CEC	$65,9 \pm 8,4$	65,0 ± 13,1	60,0 ± 4,8	ns	
	Controle	$69,8 \pm 5,6$	79,7 ± 9,2	76,2 ± 7,8		
PAPM (mmHg)	CEC	17,2 ± 2,3	17,2 ± 2,1	17,5 ± 1,7	20	
	Controle	17,8 ± 1,6	19,1 ± 2,4	19,4 ± 4,3	115	
PVC (mmHg)	CEC	7,4 ± 1,7	7,4 ± 1,1	7,4 ± 1,2	ns	
	Controle	7,6 ± 2,2	7,5 ± 2,3	7,5 ± 2,1		
POAP (mmHg)	CEC	10 ± 2,9	8,9 ± 3,5	9,3 ± 2,9	ns	
	Controle	11 ± 3,4	10,5 ± 2,3	11 ± 2,2		
IC (L.min.m ⁻²)	CEC	$4,0 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,4$	ns	
	Controle	$3,9 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,9$		
RVSI (din.s.cm ⁵ .m ⁻²)	CEC	1179 ± 205	1308 ± 358	1312 ± 214	20	
	Controle	1345 ± 367	1355 ± 180	1252 ± 218	115	
RVPI (din.s.cm ⁵ .m ⁻²)	CEC	145 ± 77	192 ± 60	209 ± 59		
	Controle	144 ± 57	159 ± 59	147 ± 57	115	

Tabela 3 Variáveis hemodinâmicas ao longo do estudo
5.3 Variáveis ventilatórias

Como pode ser observado nos dados da tabela 4, não houve alterações significativas nos parâmetros ventilatórios durante o estudo. Em ambos os grupos, as variáveis ventilatórias apresentaram comportamento semelhante. A complacência estática mostrou uma tendência à queda no grupo CEC, sendo 23 % e 24 % menor nos momentos T90 e T 180, quando comparados ao momento T0, contudo sem significância estatística. É importante ressaltar que as variáveis ventilatórias no momento T0 foram colhidas, após a realização da traqueostomia.

	Grupo	Т0	Т90	T180	Valor p
	CEC	8,4 ± 0,9	9,0 ± 0,8	9,3 ± 0,9	20
P_{mva} (CMH ₂ O)	Controle	8,4 ± 1,3	8,7 ± 0,8	8,7 ± 1,6	115
\mathbf{P} (cmH ₂ O)	CEC	16,4 ± 1,7	19,3 ± 2,5	$20,0 \pm 2,4$	20
	Controle	18,6 ± 2,9	19,4 ± 3,1	19,4 ± 3,6	115
	CEC	15,3 ± 2,2	18,5 ± 3,3	18,0 ± 1,3	20
F plateau (CITII 12O)	Controle	16,7 ± 3,2	17,7 ± 2,9	17,4 ± 3,6	115
$C_{\rm ml}$ (ml cmH O^{-1})	CEC	45,9 ± 13,3	35,3 ± 7,7	34,7 ± 4,8	20
	Controle	42,9 ± 7	46,0 ± 10,7	44,3 ± 11,3	115

Tabela 4 – Variáveis respiratórias ao longo do estudo

5.4 Variáveis de oxigenação sanguínea e metabólicas

Os dados da tabela 5 mostram o comportamento temporal das variáveis de oxigenação sanguínea e metabólicas ao longo do estudo. Como pode ser observado, houve uma significativa redução da relação PaO₂/FiO₂ no grupo CEC, imediatamente, após a circulação extracorpórea para 49 % do valor de T0, com recuperação parcial no momento T180, retornando à 77% do valor basal. Não foram observadas alterações significativas no grupo Controle. No grupo CEC, for também percebido um significativo aumento 135% no gradiente alvéolo-arterial de oxigênio, imediatamente, após a saída da circulação extracorpórea, parcialmente revertida no momento T180, porém não retornando aos valores normais. No grupo Controle, não foram observadas variações no gradiente alvéolo-arterial ao longo do estudo. O *shunt* pulmonar apresentou aumento significativo imediatamente, após a saída da CEC, retornando aos valores basais no momento T180 no grupo CEC. Não foram observadas alterações significativas no grupo CEC. Não foram observadas alterações significativos no grupo CetC. Não foram observadas alterações significativos no grupo CetC.

Não houve alterações significativas nas variáveis metabólicas estudadas. Os valores de PaCO₂, bicarbonato arterial, excesso de bases, pH ou hematócrito mantiveram-se constante em ambos os grupos, durante todo o período de coleta, assim como a temperatura central dos animais.

	Grupo	Т0	T90	T180	Valor p	
PoO /EiO (mmHa)	CEC	427,8 ± 4	213,7 ± 96 ^{*#}	333,4 ± 111 ^{*†#}	0 003	
	Controle	392,8 ± 8	438,5 ± 49,6	426,3 ± 57,8	0,000	
	CEC	94,6 ± 25	223,5 ± 59,3 ^{*#}	152,8 ± 68,4 ^{*†#}	0.000	
GA-aO ₂ (mmng)	Controle	108,2 ± 27,9	96,8 ± 37,6	107 ± 44,4	0,009	
Supt $(9/)$	CEC	8,5 ± 2,3	21,4 ± 9,8 ^{*#}	10,4 ± 6,9	0.001	
Sunt (%)	Controle	10,0 ± 5,5	$8,9 \pm 4,4$	9,0 ± 5,4	0,091	
	CEC	41,2 ± 2,6	$44,9 \pm 4,5$	40,5 ± 3,9	200	
	Controle	38,2 ± 5,1	38,8 ± 1,6	39,2 ± 3,9	ns	
HCO (mEq. l^{-1})	CEC	28,7 ± 1,8	26,2 ± 1,4	27,6 ± 2,0	200	
	Controle	28 ± 1,7	28,3 ± 1,5	29,3 ± 1,6	115	
SatO(%)	CEC	99,6 ± 0,6	96,7 ± 3,0	98,6 ± 2,8	200	
$Sato_2(76)$	Controle	99,5 ± 9,3	99,7 ± 0,2	99,8 ± 0,1	115	
	CEC	63 ± 1,8	62,3 ± 3,2	62,6 ±2,4	200	
	Controle	$63,5 \pm 2,6$	63,4 ± 2,5	62,8 ± 2,5	115	
$EP (mEq l^{-1})$	CEC	-5,1 ± 1,6	-1,6 ± 1,0	-3,9 ± 2,0	200	
	Controle	-3,9 ± 1,8	-4,6 ± 1,4	-5,4 ± 1,8	115	
	CEC	7,45 ± 0,03	7,38 ± 0,04	7,45 ± 0,04	20	
рп	Controle	7,46 ± 0,05	7,17 ± 0,95	7,47 ± 0,05	115	
Homotéorite (9/)	CEC	28,4 ± 3,5	26,5 ± 2,5	26,3 ± 4,1	20	
Hemalochio (%)	Controle	28 ± 1,7	27,8 ± 2,6	28,8 ± 1,7	115	
Tomporatura (%C)	CEC	37,9 ± 0,8	37,7 ± 0,6	38,1 ± 0,7	22	
	Controle	37,9 ± 0,8	38,0 ± 0,6	38,0 ± 1,1	IIS	

Tabela 5 Variáveis de oxigenação sanguínea e metabólicas

Legenda: * significa diferente de T0 (p <0,05). † significa diferente de T90 (p <0,05). # significa diferente do grupo controle no mesmo momento (P <0,05).

5.5 Avaliação da função mucociliar

5.5.1 Frequência de batimento ciliar (FBC) em fragmento de traqueia

Os dados da Figura abaixo mostram o comportamento da frequência de batimento ciliar analisado nos fragmento da traqueia obtida nos momentos T0 e T180. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas não mostrou diferença entre os grupos (p = ns) ou interação entre o fator grupo e o fator momento (p = ns). Contudo, observou-se diferença significativa entre os momentos estudados (p = 0,041). Na análise *posthoc* do fator intragrupo (momento), comparando-se os momentos T0 e T180 no momento, observou-se uma significativa redução de valores de FBC no grupo CEC de 12,9 % (p < 0,05). Não foi observada redução significativa no grupo Controle (Figura 6)



Figura 6 - Frequência de batimento ciliar no grupo controle (círculos fechados) e no grupo CEC (círculos abertos). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Tabela 6 Análise da frequência de batimento ciliar (ANOVA)

	Controle	CEC	valor p grupo	Valor p momento	Valor p interação	
Т0	13,42 ± 0,96	12,98 ± 2,84	20	0.041	20	
T180	13,09 ± 1,91	11,06 ± 2,1 *		0,041	115	

Legenda: * significa diferente de T0 (p < 0,05)

5.5.2 Transporte mucociliar in situ em fragmento de traqueia

Os dados da Figura abaixo mostram o comportamento da velocidade do transporte mucociliar em fragmento de traquéia *in situ* (TMC). Apesar da aparente diferença inicial entre os grupos Controle e CEC, não foram observadas diferenças significativas no fator intergrupo (p = ns), fator intragrupo (p = ns) ou interação (p = ns).



Figura 7 - Transporte mucociliar *in situ* em fragmento de traqueia no grupo controle (círculos fechados) e no grupo CEC (círculos abertos). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Tabela 7 - Análise do TMC (ANOVA)

	Controle	CEC	valor p grupo	Valor p momento	Valor p interação	
Т0	0,011 ± 0,003	0,013 ± 0,005	20	20	20	
T180	0,01 ± 0,002	0,011 ± 0,003	115	115	115	

5.5.3 Transportabilidade do muco in vitro pelo palato de rã (VTM)

Os dados da Figura abaixo mostram o comportamento ao longo do tempo da velocidade de transporte do muco *in vitro* pelo palato de rã. Como pode ser observado, não foram detectadas alteração em nenhum dos grupos.



Figura 8 - Transporte mucociliar *in situ* em fragmento de traquéia no grupo controle (círculos fechados) e no grupo CEC (círculos abertos). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Tabela 8 Análise do transporte mucociliar in situ (ANOVA)

	Controle	CEC	valor p grupo	Valor p momento	Valor p interação
Т0	0,748 ± 0,211	0,832 ± 0,365			
Т90	0,736 ± 0,28	0,806 ± 0,302	ns	ns	ns
T180	0,835 ± 0,261	0,748 ± 0,316			

5.5.4 Ângulo de Contato (AC)

Os dados da Figura abaixo mostram o comportamento do ângulo de contato do muco sobre a lâmina de análise que foi semelhante nas amostras colhidas nos momentos T0, T90 e T180, em ambos os grupos.



Figura 9 - Avaliação do ângulo de contato no grupo controle (círculos fechados) e no grupo CEC (círculos abertos). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Tabela 9 -	Análise do	angulo de	contato	(ANOVA))
------------	------------	-----------	---------	---------	---

	Controle	CEC	valor p grupo	Valor p momento	Valor p interação
Т0	28 ± 6,8	29,3 ± 5,1			
Т90	$30,9 \pm 6,4$	29,5 ± 8,9	ns	ns	ns
T180	29,6 ± 7,4	26,7 ± 8,6	_		

5.5.5 Transporte do muco respiratório pela tosse (TMT)

Não foram detectadas alterações significativas do transporte do muco respiratório pela máquina simuladora da tosse, ao longo do tempo em nenhum dos grupos estudados.



Figura 10 - Transporte do muco respiratório pela tosse no grupo controle (círculos fechados) e no grupo CEC (círculos abertos). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Tabela 10 -	Análise	do	Transporte	do	muco	respiratório	pela	tosse
	(ANOVA)						

	Controle	CEC	valor p grupo	Valor p momento	Valor p interação
Т0	17,4 ± 12,6	17,5 ± 17,5			
Т90	26,7 ± 11	26 ± 26	ns	ns	ns
T180	27,6 ± 18,8	21,1 ± 22,1	_		

5.5.6 Avaliação da viscosidade do muco respiratório pelo viscosímetro Cone-Plate (VM)

Nos dados da Figura abaixo, observa-se uma representação gráfica da viscosidade do muco testado pelo viscosímetro Cone-Plate, ao aplicar diferentes velocidades de corte 1, 5, 10, 20, 50 e 100 em revoluções por minuto (RPM) que, respectivamente, representam as taxas de cisalhamento de 8, 38, 75, 150, 375 e 750 em segundos recíproco ou inverso (s⁻¹) nos grupos Controle e CEC, nos momentos T0 (painel A), T90 (painel B) e T180 (painel C).



Figura 11 - Avaliação da viscosidade aparente nos grupos Controle e CEC nos momentos T0 (painel A), T90 (painel B) e T180 (painel C).

Nota-se a diminuição da viscosidade aparente ao aumento das velocidades de corte, que é similar em ambos os grupos e nos momentos estudados. Após obter-se os resultados da viscosidade aparente, escolheuse a velocidade de 100 RPM.

Nos dados da Figura 12, observa-se a avaliação da viscosidade na velocidade de 100 RPM nos grupos Controle e CEC nos tempos: T0 (A), T90 (B) e T180 (C). No momento T90, a viscosidade aparente estava aumentada no grupo CEC em comparação, mostrando diferenças entre os grupos (p=0,024). Sem diferenças entre os grupos nos momentos T0 e T180.



Figura 12. Avaliação da Viscosidade do muco na velocidade de 100 RPM nos grupos Controle e CEC, nos momentos: T0 (A), T90 (B) e T180 (C). * significa p<0,05. Dados apresentados como mediana (linha interna do gráfico em caixa), interquartil 25% - 75% (linhas superiores e inferiores do gráfico em caixa) e as barras de erro representam os limites de 5% e 95% dos dados.</p>

5.6 Análises histológicas do epitélio da traqueia (qualitativa)

Nos dados da Figura 13, observam-se as fotomicrografias representativas do epitélio respiratório da traqueia dos grupos Controle e CEC. Nota-se o epitélio ciliado está integro no grupo Controle, apontado pela flecha sem outras alterações importantes da submucosa (painel A), ocorre uma redução da densidade de cílios e zonas de perda da camada ciliar no epitélio do grupo CEC indicado pelas flechas vermelhas, como pode ser observado no painel B. Ainda se visualiza grande número de neutrófilos infiltrando a submucosa indicados pelas flechas negras no grupo CEC (painel B). Observam-se nos painéis C e D, zonas de extensa descamação dos cílios indicadas pelas flechas negras e zonas de congestão da submucosa indicado pelas negras e zonas de congestão da



Figura 13 - Fotomicrografias do epitélio respiratório da traquéia nos grupos Controle (A) e CEC (B) corados com HE (aumento de 400x). Barra= 25 μm. Os painéis C e D são fotomicrografias com aumento de 200x. Barra= 50 μm

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo foram: 1) transitória piora nas trocas gasosas, após a saída da circulação extracorpórea no grupo CEC, melhorando no final do experimento; 2) redução na frequência de batimento ciliar no grupo CEC, porém não no grupo Controle; 3) Aumento da viscosidade do muco no T90 no grupo CEC e 4) aparecimento de zonas caracterizadas por perda dos cílios no epitélio respiratório, aparecimento de zonas de congestão e infiltrado intersticial na submucosa.

A introdução da circulação extracorpórea na prática clínica possivelmente representou o avanço mais importante ocorrido desde os primórdios da cirurgia cardíaca por permitir manutenção da perfusão tecidual com sangue oxigenado durante a manipulação do coração e grandes estruturas vasculares. Esta modalidade de suporte circulatório permite a correção de lesões intracardíacas que necessitam de abertura das câmaras cardíacas, posicionamento de afastadores que distorcem a anatomia das câmaras cardíaco. Apesar de fundamental para a cirurgia cardíaca, o uso da CEC tem sido consistentemente associada à disfunção pós-operatória de diversos órgãos e tecidos do corpo, sendo o sistema respiratório o mais frequentemente acometido ⁽⁷⁾.

64

Como se esperava, neste modelo experimental foi observada uma piora das trocas gasosas representadas por uma redução transitória da relação PaO₂/FiO₂, aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e do shunt pulmonar imediatamente, após a saída da CEC no grupo experimental, retornando aos valores basais ao final do experimento. É de amplo conhecimento que ocorre piora da função pulmonar após cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea, caracterizada por desenvolvimento de hipoxemia pós-operatória ⁽⁵⁸⁾, mesmo em sujeitos sem alterações prévias da função pulmonar, tanto em estudos experimentais como clínicos (9-11). Aumento da fração de shunt intrapulmonar, secundário às atelectasias tem sido implicado como um dos principais mecanismos causadores de hipoxemia após cirurgia cardíaca com CEC (10, 59, 60). De acordo com diversas publicações, áreas pulmonares colapsadas podem estas corresponder a 20 % do parênguima pulmonar. Além disto, é também sabido que ocorre inflamação sistêmica em razão da exposição dos elementos do sangue à superfície não endotelizada do circuito extracorpóreo e oxigenador de membrana ⁽⁴²⁾, seguido de subsequente aprisionamento de leucócitos na circulação pulmonar (43, 44). O processo inflamatório é agravado pelo fenômeno de isquemia e reperfusão associado à pausa ventilatória e ao desvio do fluxo sanguíneo da circulação pulmonar por meio do circuito extracorpóreo, que resulta em aumento adicional na permeabilidade endotelial pulmonar e edema alvéolo-intersticial, contribuindo para a disfunção respiratória pós-operatória ⁽⁴⁵⁾.

Contudo, existem poucos dados disponíveis na literatura especializada sobre o efeito da utilização da CEC sobre a atividade do sistema mucociliar em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e sua possível contribuição para a disfunção respiratória observada no período pós-operatório. A diminuição da eficiência do sistema de transporte mucociliar respiratório poderia ser um dos componentes de uma disfunção global do sistema respiratório após cirurgia cardíaca.

Neste estudo, foi observada uma redução isolada nos valores da frequência do batimento ciliar no grupo CEC, imediatamente após a saída do suporte circulatório extracorpóreo, associado a aumento da viscosidade do muco traqueal, sem outras alterações significativas nos parâmetros do transporte mucociliar.

6.1 Comportamento do epitélio

Quando se consideram os valores de FBC no grupo CEC no momento 180, observa-se que estes valores encontravam-se abaixo dos valores normalmente observados em seres humanos em condições normais e na maioria dos modelos experimentais em porcos, vacas e cães, descritos acima de 11,3 Hz em todas as partes do trato respiratório. Joki e cols. em 1994, compararam em seis espécies animais (vacas, porcos, cães, coelhos, cobaias e ratos) as FBC em seis regiões do trato respiratório (inferior,

66

nasofaringe, traqueia superior e inferior, brônquio principal e brônquio subsegmentado). Neste estudo, não houve diferenças significativas entre os valores de FBC entre as vacas, porcos e cães onde a atividade ciliar foi similar (11,3 – 16,9 Hz) ⁽⁶¹⁾. Diversos fatores podem estar relacionados com a diminuição da FBC. A manipulação da traqueia, o uso de determinados fármacos, a ventilação artificial e as alterações nas condições de temperatura e humidificação das vias aéreas têm sido apontados, como fatores relacionados à redução da FBC em modelos experimentais. Pazetti e cols. observaram redução na frequência de batimento ciliar em ratos submetidos à transecção brônquica ⁽³⁷⁾. Diversos fármacos estão também associados à redução do transporte mucociliar, como anestésicos halogenados (62) e diuréticos, como furosemida (24). É importante citar que não existe consenso sobre o efeito de corticoesteroides sobre a frequência de batimento ciliar das mucosas do sistema respiratório. Mesmo não tendo sido aplicados aos animais durante o presente estudo, os corticoesteroides são utilizados de maneira rotineira em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Hofmann e cols. observaram que os corticoides parecem diminuir a atividade ciliar da mucosa nasal de maneira dose dependente ⁽⁶³⁾. Outros autores observaram que os corticoesteroides aumentam a atividade dos cílios epiteliais respiratórios (64, 65).

Como os resultados apresentados na literatura são controversos, não sendo possível extrapolar o papel interação dos corticoides e CEC sobre a FBC a partir dos dados existentes, são necessários estudos específicos para

investigar este fármaco no contexto de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.

Neste estudo, como as oportunidades de manipulações da traqueia foram semelhantes em ambos os grupos (intubação orotraqueal, realização de traqueostomia, coleta de muco por broncoscopia e ressecção do fragmento traqueal), é pouco provável que este mecanismo tenha contribuído para a redução da FBC observada no grupo CEC. Como o mesmo protocolo foi aplicado a ambos os grupos, o papel dos fármacos também pode ser descartado como causa das alterações observadas. Outro fator relacionado à redução da frequência de batimento ciliar é a utilização de ventilação mecânica com pressões elevadas nas vias aéreas ⁽⁶⁶⁾. Como neste estudo foi utilizada a estratégia ventilatória com baixas pressões de insuflação, caracterizadas por pressões de *plateau* abaixo de 20 cmH₂0 em ambos os grupos durante todo o período experimental, é também pouco provável que a ventilação mecânica possa explicar a redução da FBC observada no grupo CEC ao final do experimento.

Neste modelo experimental, para simular de maneira adequada e avaliar o impacto do uso da circulação extracorpórea sobre a atividade do sistema mucociliar em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, foi interrompida a ventilação mecânica durante o período em que os animais do grupo experimental encontravam-se em assistência circulatória com o fluxo total. A suspensão da ventilação mecânica e desconexão do tubo traqueal durante a CEC com fluxo total promove queda da temperatura e da humidificação por interrupção do fluxo de gases aquecidos e humídificados. Em 1965, Ewert descreveu em pacientes traqueostomizados, que quando a temperatura dos gases inspirados estava próxima à temperatura central e sua umidade relativa estava em 100%, que a velocidade de transporte mucociliar era máxima ⁽⁶⁷⁾. Alterações nestas características ideais, segundo o autor, estavam associadas à diminuição na velocidade do transporte mucociliar. Em 1998, Branson e colaboradores descreveram redução no comprimento dos cílios traqueais e na velocidade do fluxo do muco traqueal, em consequência à exposição do epitélio traqueal de cães a gases não humidificados, o que era amplificado pela duração da exposição ⁽³⁾. Estes autores ainda sugerem que uma concentração mínima de 12 a 15 ml de água por litro de gás, como sendo necessária para prevenir estas alterações. Apesar das alterações na temperatura e humidificação dos gases nas vias aéreas secundárias à interrupção da ventilação mecânica, durante a CEC poderem ter contribuído para redução da atividade ciliar, seu impacto mais importante se faz sobre as propriedades viscoelásticas do muco respiratório

discutidos na seção abaixo.

A análise dos cortes da seção da traqueia analisados de maneira qualitativa mostra que, além do esperado edema inflamatório observado no grupo CEC, houve aparecimento de zonas de perda dos cílios no epitélio traqueal. Estes achados da histologia, apesar de avaliados de maneira qualitativa, podem explicar a redução da diminuição da frequência de batimento mucociliar. Alguns fenômenos podem explicar as alterações histológicas observadas nas amostras de traqueia obtidas ao final do experimento no grupo CEC. A resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela circulação extracorpórea promove aumento da permeabilidade endotelial e, consequente, edema celular. Este processo é amplificado pela alteração do regime de perfusão das estruturas do sistema respiratório durante a CEC.

Durante a CEC, quando o fluxo sanguíneo está total e a aorta se encontra pinçada, a perfusão dos pulmões é dependente do fluxo sanguíneo proveniente das artérias brônquicas. Em estudo experimental com porcos, Schlensak e cols. observaram redução significativa do fluxo sanguíneo arterial bronquial durante a CEC, apesar da manutenção da pressão de perfusão adequada e do fluxo sanguíneo total ⁽⁶⁸⁾. Estes autores observaram que o fluxo sanguíneo nas artérias brônguicas, antes da CEC, representava 4,8% do fluxo sanguíneo total e, durante a CEC, houve uma queda do fluxo sanguíneo nas artérias brônguicas para valores em torno de 1% do fluxo sanguíneo total. Esta redução foi associada ao aparecimento do aumento da espessura do septo interalveolar e da diminuição da superfície alveolar. Dodd-o e cols. observaram que a redução do fluxo sanguíneo pela circulação brônquica durante a CEC normotérmica em porcos estava associada a aumento da permeabilidade pulmonar, produção de citocinas inflamatórias, formação de edema e piora na oxigenação sanguínea ⁽⁶⁹⁾. Neste estudo, a possível redução do fluxo nas artérias brônquicas durante a CEC e o processo de reperfusão podem ter contribuído para magnificar o dano alveolar relacionado ao processo inflamatório, visto que estas alterações não foram detectadas no grupo controle. Esta hipótese é plausível, pois a movimentação ciliar é um processo dependente de energia e no evento de isquemia e reperfusão, como no observado durante a CEC, espera-se que ocorra uma redução da atividade ciliar e ou perda dos cílios epiteliais.

Por outro lado, a avaliação do transporte mucociliar in situ, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Seria esperado que houvesse uma redução no TMC secundária à redução na frequência do batimento ciliar. Contudo, alguns fatores devem ser levados em conta para o entendimento deste resultado. O primeiro fator a ser considerado é que, nesta análise, o fluido utilizado para mensurar o tempo do percurso durante a avaliação do TMC *in situ* apresenta viscosidade muito menor que o muco respiratório propriamente dito, próximo à da água. O trabalho realizado para o transporte deste fluido é consequentemente menor e a pequena extensão de tragueia na gual o TMC in situ foi avaliado pode contribuir, para que não sejam observadas diferenças. Outro fato a ser levado em consideração é que foi observada grande variabilidade das medidas entre as amostras, e associado ao fato do número total de amostras ser pequeno, isto pode causar aumento do erro tipo 2 e incapacidade para detectar uma diferença estatística significativa entre os grupos.

6.2 Comportamento do muco respiratório

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando foi estudada a velocidade do transporte mucociliar *in vitro* através do palato de rã (VTM), do ângulo de contato (AC), e da transportabilidade do muco *in vitro* pela máquina simuladora da tosse (TMT). Contudo, foi observado que houve alteração das características viscoelástica do muco traqueal após a saída de circulação extracorpórea, detectado pelo aumento da viscosidade aparente do muco coletado imediatamente, após a saída da CEC no grupo experimental em relação ao grupo controle.

O muco respiratório é constituído por uma mistura de sais (1%), proteínas e glicoproteínas (2% – 3%) e água (95%). A presença do muco na superfície do epitélio da traqueia funciona como uma barreira físico-química sobre a qual partículas e micro-organismos aderem ⁽¹⁶⁾. Entre a camada do muco e o epitélio da traquéia, existe uma camada de 5 a 10 µm de fluido periciliar, que é moderadamente hipotônico em relação ao plasma ^(70, 71). A regulação da composição deste fluído é essencial para o adequado funcionamento das proteínas com propriedades antimicrobianas ⁽⁷²⁾ e para a adequada propulsão do muco em direção à glote. Em conjunção com um batimento ciliar funcionando de maneira coordenada, o muco traqueal é impulsionado em direção à glote onde será expectorado ou deglutido. O estado de umidificação dos gases presentes nas vias aéreas desempenha papel central no transporte mucociliar. Se a espessura da camada de fluído ficar aderidos à camada do muco respiratório ⁽⁷²⁾. Além disso, a desidratação das vias aéreas irá promover aumento da viscosidade do muco que, em conjunção com a redução do fluído periciliar, irá aumentar o atrito decorrente do transporte do muco e, por consequência, irá contribuir para a menor eficiência do sistema mucocilar ao defender as vias aéreas.

Foi observada redução da viscosidade aparente do muco traqueal ao se aplicar velocidades de corte crescente (1, 5, 10, 20, 50 e 100 RPM) nos momentos T0, T90 e T180 em ambos os grupos. Este comportamento pseudoplástico, ou seja, diminuição da viscosidade como o aumento da tensão de corte, mostra que em ambos os grupos o comportamento do muco, caracteriza-se por uma viscosidade não constante.

Neste estudo, utilizou-se a mesma metodologia descrita por Haidekker e cols., na qual foi escolhida a velocidade de 100 RPM para comparar as viscosidades aparentes de todas as amostras entre os grupos, sem exceder as limitações de torque (%) do aparelho ⁽⁵⁷⁾. No T90, observouse que a viscosidade aparente no grupo CEC aumentou em comparação com o grupo Controle. Quando se considera este fenômeno, pode-se hipotetizar que a interrupção da ventilação mecânica durante a CEC pode ter promovida pela redução da umidade relativa dos gases e da temperatura das vias aéreas, o que pode ter contribuído para a desidratação do muco respiratório, detectado pelo aumento na viscosidade do muco no grupo CEC, retornando a seu comportamento original ao final do estudo, após um período de ventilação mecânica com gases umidificados e aquecidos. Mudanças histológicas foram observadas no epitélio da traqueia ao grupo exposto à CEC, com escassez de cílios e perda de epitélio, assim como aparente número maior de neutrófilos infiltrados. Também foram observadas, congestão da submucosa, dados que confirmariam o possível dano estrutural do pulmão. É possível que as alterações no epitélio traqueal contribuam para o aumento da viscosidade do muco. O muco respiratório é derivado de uma coleção de secreções provenientes de varias áreas do trato respiratório, inclusive dos alvéolos. A mucina, um dos principais componentes do muco respiratório, é produzida pelas células caliciformes e pelas glândulas submucosas ao longo de todo o tato respiratório ⁽³⁴⁾. Além da participação na produção do muco respiratório, o epitélio respiratório regula a formação e manutenção da camada do fluido periciliar que existe entre o muco e os cílios da traqueia.

Alterações na estrutura do epitélio observadas nos cortes histológicos do grupo podem estar relacionadas, em associação com a alteração da umidade e temperatura dos gases inalados, durante a CEC, com modificações nas propriedades viscoelásticas do muco e da composição e espessura da camada do fluido periciliar, portanto, contribuindo para uma piora na função do sistema mucociliar.

Nenhum dos outros parâmetros estudados relacionados ao transporte do muco *in vitro*, como ângulo de contato, transporte no muco por efeito da tosse e transporte mucociliar *in situ* em palato de rã, apresentou diferenças entre o grupo CEC e o grupo controle. A avaliação da viscoelasticidade do muco por meio do viscosímetro de Cone-Plate® é mais sensível para detectar alterações características físico-químicas do muco quando

comparado com técnicas indiretas. Uma vez que as alterações do muco durante um período curto não foram detectadas por técnicas menos sensíveis, é possível que o impacto dessas alterações quando observadas isoladamente não seja fator que possa diminuir a eficiência do sistema de transporte mucociliar.

A função perfeita do TMC depende da interação entre vários fatores, como um epitélio ciliado intacto com batimento ciliar sincronizado, uma quantidade adequada do muco com propriedades viscoelásticas ideais, e composição e espessura adequados da camada fluida periciliar. Neste estudo, observou-se que uma conjunção de fatores inerentes à circulação extracorpórea, assim como a aplicação de estratégias ventilatórias necessárias a permitir a realização de cirurgias cardíacas estão associadas à disfunção do sistema de transporte mucociliar e defesa das vias aéreas. Certamente, o processo inflamatório sistêmico induzido pelo fenômeno de isquemia e reperfusão associado à CEC e pela exposição dos elementos do sangue a circuitos extracorpóreos está implicado na disfunção do sistema de transporte muco ciliar no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Contudo o papel relativo de interrupção da ventilação mecânica nesse fenômeno ainda precisa ser investigado. Estudos também são necessários para avaliar a implicação clínica da disfunção do sistema de transporte mucociliar no contexto da disfunção do sistema respiratório frequentemente observado no pós-operatório de cirurgias cardíacas.

7 CONCLUSÃO

A circulação extracorpórea promoveu agudamente disfunção do sistema de transporte mucociliar.

8 ANEXOS



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 24.08.06, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 756/06, intitulado: "Efeitos da circulação extracorpórea sobre o transporte mucociliar estudo experimental" apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

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")

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona Pesquisador (a) Executante: Dr. Rodrigo Sanchez Véliz

CAPPesq, 24 deAgosto de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : <u>cappesq@hcnet.usp.br</u> / <u>secretariacappesq2@hcnet.usp.br</u> tms



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE BOLSAS NO PAÍS

Outorgante : Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Outorgado(a) : RODRIGO SANCHEZ VELIZ

CPF: 229.126.618-70

Endereço :

R SIRIUS, 17 JD ANTARES

09606-100 SAO BERNARDO DO CAMPO-SP

Processo : 07/52127-3

Bolsa de DD-1

Orientador(a) : LUIZ MARCELO SA MALBOUISSON

Instituição : FAC MEDICINA/USP

Área : MEDICINA

Projeto :

EFEITOS DA CIRCULACAO EXTRACORPOREA SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR: ESTUDO EXPERIMENTAL.

Início da bolsa : 01fev08

Término : 31jan10

Duração : 24 meses

Forma de pagamento : Depósito mensal em conta corrente até o dia 05, a partir do segundo mês.

Valor mensal : Conforme tabela em vigor.

Relatórios: 10jan09 10jul09 10jan10

Obs.:

ATENÇÃO ! Se houver pedido de renovação da bolsa, a entrega do último relatório deve ser antecipada em dois meses. A não observância deste prazo poderá acarretar a descontinuidade no pagamento da bolsa, caso ela venha a ser renovada.

RUA PIO XI, 1500 - CEP 05468-901 - SÃO PAULO - SP - TEL: 11 3838.4000 - FAX: 11 3645.2421

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE BOLSA NO PAÍS CONDIÇÕES GERAIS DE CONCESSÃO DOS BENEFÍCIOS

- nsalidade será creditada em conta bancária em nome do OUTORGADO, até o dia 5 do mês seguinte ao início da vigência da bolsa. II - O OUTORGADO obriga-se a apresentar à OUTORGANTE, dentro dos prazos estipulados, para apreciação pela Diretoria cilentífica, os relatórios do desenvolvimento de seus trabalhos, em uma via, sob pena de, não o fazendo, ser o pagamento suspenso. No caso das bolsas de Mestrado ou Doutorado, no final da vigência da bolsa deverá ser apresentado um exemplar da dissertação ou tese aprovada, que poderá substituir o relatório final.
- Nas bolsas de Mestrado ou Doutorado, além da mensalidade a que se refere a Cláusula anterior, será concedida ao OUTORGADO ajuda de custo a título de Reserva Técnica, que deverá ser utilizada de acordo com as normas vigentes, que independente de transcrição, integram este Termo de Outorga. - Decorridos três meses do não cumprimento dos prazos estabelecidos neste Termo, para apresentação de relatório científico, as bolsas, já suspensas
- IV na forma prevista na Cláusula II acima, serão canceladas retroativamente, a partir da data de sua suspensão, ou mesmo a partir da data de seu inicio, a critério da OUTORGANTE. Nessa situação, caberá o reembolso das mensalidades recebidas, em valores atualizados, No caso de Bolsa de Mestrado ou de Doutorado, ao término do primeiro ano de bolsa, esta passará do Nível I para o Nivel II.
- O OUTORGADO desenvolverá o projeto sob a responsabilidade do ORIENTADOR, por intermédio do qual remeterá os relatórios a que se referem VI
- VII Nas bolsas de pós-doutoramento, a responsabilidade pelo desenvolvimento do projeto é conjunta, BOLSISTA e SUPERVISOR. Os relatórios a que se referem as Cláusulas anteriores, serão encaminhados por intermédio do SUPERVISOR.
- O OUTORGADO fica obrigado a comunicar imediatamente à OUTORGANTE a efetivação de qualquer contrato, nomeação para preenchimento de cargo ou designação para exercício de função gratificada ou não, eventual mudança de residência, bem como qualquer interrupção das atividades de pesquisa, com ciência do ORIENTADOR ou SUPERVISOR. VIII
- Double de la contractiona de originationa de origination de la contractiva de la IX
- Arvuigação dependerá de autorização previa da OUTORGANTE.
 Patente de Invenção, Modelo de Utilidade, Desenho Industrial ou qualquer outra forma de registro de propriedade intelectual de inventos decorrentes da execução do projeto deverão ter o nome da OUTORGANTE como co-titular. O registro, a pedido do OUTORGADO e seu ORIENTADOR, poderá ser financiado pela OUTORGANTE, se esta julgar a medida conveniente, caso em que será a única titular. Em qualquer caso, os rendimentos líquidos decorrentes de vende ou licenciamento serão compartilhados na seguinte proporção: 1/3 para a OUTORGANTE, 1/3 para os inventores e 1/3 para as instituições onde foi desenvolvido o projeto. x
- No caso de titularidade exclusiva da OUTORGANTE, esta terá direitos ilimitados sobre a concessão parcial ou total, onerosa ou gratuita, dos direitos resultantes, podendo, a qualquer momento deles desistir. A OUTORGANTE manterá informados os inventores e instituições que compartilham os rendimentos líguidos. No caso de co-titularidade, qualquer concessão, parcial ou total, onerosa ou gratuita, dos direitos resultantes, ou desistência destes, deverá ser previamente apreciada pelas partes, vedadas decisões unilaterais. XI
- O OUTORGADO obriga-se a fazer referência ao apoio da OUTORGANTE nas teses, dissertações, artigos, livros, resumos de trabalhos apresentados em reuniões e qualquer outra publicação ou forma de divulgação de atividades que resultem, total ou parcialmente, de auxilios ou bolsas da OUTORGANTE. XII -
- ca OUTORGANTE. Em se tratando de bolsa de iniciação científica, o OUTORGADO, na vigência deste termo, obriga-se a desenvolver projeto de pesquisa em ritmo conveniente durante os períodos letivos, e de forma intensificada nos períodos de férias sempre em comum acordo com o ORIENTADOR.
- XIV Na bolsa de Treinamento Técnico Nivel I, o bolsista deverá dedicar no mínimo, 15 horas semanais às altividades de treinamento e de apoio ao deservolvimento do projeto, que serão realizadas sem prejuízo de seu desempenho académico; nos niveis II, III, VI, V-A e V, submete-se o bolsista a regime de dedicação mínima de 16 e no máximo 40 horas semanais às atividades de treinamento e de apoio a deservolvimento do projeto.
- a regime de dedicação mínima de 16 e no máximo 40 horas semanais às atividades de treinamento e de apoio ao desenvolvimento do projeio. As bolasa de mestrado, doutorado, pós-doutorado serão concedidas em regime de dedicação integral. Os bolistas de Mestrado, Doutorado e Pós-Doutorado poderão ser autorizados pela Fapesp a dedicar um máximo de 8 horas semanais à realização de atividades científicas e profissionais, remuneradas ou não, que contribuam para a sua formação profissional, e que sejam compatíveis com o seu projeto de bolsa na FAPESP. 1 Essa autorização deversá es reolicitada à Fapesp a de correspondência, assinada pelo bolisita e por seu ORIENTADOR ou SUPERVISOR, que descreva as atividades a serem realizadas, especifique o número de horas semanais de dedicação a tais atividades e faça ver a importância de sua realização para a formação profissional do bolisita 2 Essa correspondência, desversa de ver se acompanhada de declaração do ADIENTADOR ou SUPERVISOR ou gara sua formação portosismal do bolisita 2 Essa correspondência deve ser acompanhad a de declaração da do RIENTADOR ou SUPERVISOR de que a realização des atividades em causa não acarretará nenhum prejuto para o desenvolvimento do projeto de pesquisa do bolista e para sua formação acádêmica e roficisional. 3 No caso de abividades treuma reação para a fonder á ministra, no máximo, a horas-auta semanais, 4 Sendo concedida a autorização, os relatórios científicos do bolista deverão conter uma seção que descreva as atividades realizadas no período, com a indicação de a sua carga horária. 5 Tratando-se de atividades remuneradas, deverã ser anexada ao relatório declaração do do se serviços e a remuneração percebida, para fins de acompanhamento. Em se tratando de bolsa de mestrado ou de doutorado, no caso em que o exame da dissertação ou a defesa de tese ocorrer antes do mazo final XV
- XVI Em se tratando de bolsa de mestrado ou de doutorado, no caso em que o exame da dissertação ou a defesa de tese ocorrer antes do prazo final da bolsa, esta será encerrada no mês em que ocorrer o referido exame ou defesa.
- O OUTORGADO não poderá acumular a bolsa de que trata este Termo com outra bolsa de outras instituições nem prestar quaisquer tipos de serviços remunerados ou não, ressalvado o caso de expressa autorização da OUTORGANTE conforme disposto na cláusula XV e parágrafos.
- XVIII O presente Termo não corresponde a qualquer espécie de relação de emprego entre o OUTORGADO e a OUTORGANTE, porque não configura vínculo trabalhista nem objetiva pagamento de salario, não se estendendo ao OUTORGADO beneficios exclusivos dos servidores da OUTORGANTE. Em particular, a OUTORGANTE não se responsabilizará por cobrir despesas de assistência médica de qualquer natureza.
- XIX O OUTORGADO, o ORIENTADOR e o SUPERVISOR comprometem-se a emitir pareceres, gratuitamente, quando solicitado pela FAPESP, em assunto
- XX O OUTORGADO declara que aceita a bolsa que neste ato lhe é concedida, comprometendo-se a cumprir o disposto neste instrumento, em todos os seus termos, cláusulas e condições.
- XXI A OUTORGANTE poderá, a qualquer tempo e a seu exclusivo critério, cancelar ou suspender a bolsa, se o OUTORGADO não cumprir o disposto neste Termo, não tendo o OUTORGADO direito a qualquer reclamação ou indenização.
- XXII O período de duração da bolsa estipulado neste Termo de Outorga é o máximo previsto pelas normas da OUTORGANTE para os casos ordinários. O usufruto da bolsa por todo esse período não constitui um direito do OUTORGADO. Em quaisquer circunstâncias, prevalecerá a duração recomendada pela assessoria científica da OUTORGANTE, com base na natureza do projeto de pesquisa em questão e no andamento de sua execução, como evidenciado nos relabírios científicos parciais do outorgado.

OBS.: Em toda correspondência do OUTORGADO à OUTORGANTE, referente ao objeto do presente Termo, deverá o OUTORGADO explicitar o número do processo correspondente, para agilização do respectivo excediente.

DE MARGE DE 1007 São Paulo, 2 Pelo Conselho Técnico Administrativo

9 REFERÊNCIAS

1. Albertini-Yagi CS, Oliveira RC, Vieira JE, Negri EM, de Oliveira LR, Saldiva PH, et al. Sputum induction as a research tool for the study of human respiratory mucus. Respir Physiol Neurobiol. 2005 Jan 15;145(1):101-10.

2. Lopez-Vidriero MT, Reid L. Respiratory tract fluid--chemical and physical properties of airway mucus. Eur J Respir Dis Suppl. 1980;110:21-6.

3. Branson RD, Campbell RS, Davis K, Porembka DT. Anaesthesia circuits, humidity output, and mucociliary structure and function. Anaesth Intensive Care. 1998 Apr;26(2):178-83.

4. Kim WD. Lung mucus: a clinician's view. Eur Respir J. 1997 Aug;10(8):1914-7.

5. Nakagawa NK, Macchione M, Petrolino HM, Guimaraes ET, King M, Saldiva PH, et al. Effects of a heat and moisture exchanger and a heated humidifier on respiratory mucus in patients undergoing mechanical ventilation. Crit Care Med. 2000 Feb;28(2):312-7.

6. Rathgeber J. Devices used to humidify respired gases. Respir Care Clin N Am. 2006 Jun;12(2):165-82.

7. Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1999 Sep;68(3):1107-15.

8. Cox CM, Ascione R, Cohen AM, Davies IM, Ryder IG, Angelini GD. Effect of cardiopulmonary bypass on pulmonary gas exchange: a prospective randomized study. Ann Thorac Surg. 2000 Jan;69(1):140-5.

9. Szeles TF, Yoshinaga EM, Alenca W, Brudniewski M, Ferreira FS, Auler JO, et al. Hypoxemia after myocardial revascularization: analysis of risk factors. Rev Bras Anestesiol. 2008 Mar-Apr;58(2):124-36.

10. Magnusson L, Zemgulis V, Wicky S, Tyden H, Thelin S, Hedenstierna G. Atelectasis is a major cause of hypoxemia and shunt after cardiopulmonary bypass: an experimental study. Anesthesiology. 1997 Nov;87(5):1153-63.

11. Auler-Junior JO, Saldiva PH. Pulmonary structure and extravascular lung water after cardiopulmonary bypass. Braz J Med Biol Res. 1986;19(6):707-14.

12. Serrano CV, Jr., Souza JA, Lopes NH, Fernandes JL, Nicolau JC, Blotta MH, et al. Reduced expression of systemic proinflammatory and myocardial biomarkers after off-pump versus on-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. J Crit Care. 2010 Jun;25(2):305-12.

13. Vargas FS, Terra-Filho M, Hueb W, Teixeira LR, Cukier A, Light RW. Pulmonary function after coronary artery bypass surgery. Respir Med. 1997 Nov;91(10):629-33.

14. Jeffery PK, Gaillard D, Moret S. Human airway secretory cells during development and in mature airway epithelium. Eur Respir J. 1992 Jan;5(1):93-104.

15. Macchione M, Guimaraes ET, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. Braz J Med Biol Res. 1995 Nov-Dec;28(11-12):1347-55.

16. Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. Paediatr Respir Rev. 2000 Mar;1(1):27-34.

17. Lund VJ. Nasal physiology: neurochemical receptors, nasal cycle, and ciliary action. Allergy Asthma Proc. 1996 Jul-Aug;17(4):179-84.

18. Cantrell ET, Warr GA, Busbee DL, Martin RR. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in human pulmonary alveolar macrophages by cigarette smoking. J Clin Invest. 1973 Aug;52(8):1881-4.

19. Bueno-Guimaraes HM, Ferreira CM, Garcia ML, Saldiva PH. Tadpole epithelium test: potential use of Rana catesbeiana histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. Bull Environ Contam Toxicol. 2001 Aug;67(2):202-9.

20. Chilvers MA, O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. Thorax. 2000 Apr;55(4):314-7.

21. Halpern D, Fujioka H, Grotberg JB. The effect of viscoelasticity on the stability of a pulmonary airway liquid layer. Phys Fluids (1994). 2010 Jan;22(1):11901.

22. King M, Brock G, Lundell C. Clearance of mucus by simulated cough. J Appl Physiol. 1985 Jun;58(6):1776-82.
23. Konrad F, Schreiber T, Grunert A, Clausen M, Ahnefeld FW. Measurement of mucociliary transport velocity in ventilated patients. Short-term effect of general anesthesia on mucociliary transport. Chest. 1992 Nov;102(5):1377-83.

24. Kondo CS, Macchionne M, Nakagawa NK, de Carvalho CR, King M, Saldiva PH, et al. Effects of intravenous furosemide on mucociliary transport and rheological properties of patients under mechanical ventilation. Crit Care. 2002 Feb;6(1):81-7.

25. Liu Y, Wang Q, Zhu X, Liu D, Pan S, Ruan Y, et al. Pulmonary artery perfusion with protective solution reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2000 May;69(5):1402-7.

26. Trindade SH, de Mello JF, Jr., Mion Ode G, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Guimaraes ET, et al. Methods for studying mucociliary transport. Braz J Otorhinolaryngol. 2007 Sep-Oct;73(5):704-12.

27. Hedenstierna G, Strandberg A, Brismar B, Lundquist H, Svensson L, Tokics L. Functional residual capacity, thoracoabdominal dimensions, and central blood volume during general anesthesia with muscle paralysis and mechanical ventilation. Anesthesiology. 1985 Mar;62(3):247-54.

28. Froese AB, Bryan AC. Effects of anesthesia and paralysis on diaphragmatic mechanics in man. Anesthesiology. 1974;41:242-54.

29. Rothen HU, Sporre B, Engberg G, Wegenius G, Hogman M, Hedenstierna G. Influence of gas composition on recurrence of atelectasis after a reexpansion maneuver during general anesthesia. Anesthesiology. 1995 Apr;82(4):832-42.

30. Rothen HU, Sporre B, Engberg G, Wegenius G, Reber A, Hedenstierna G. Atelectasis and pulmonary shunting during induction of general anaesthesia--can they be avoided? Acta Anaesthesiol Scand. 1996 May;40(5):524-9.

31. Bisinotto FM, Cardoso Rde P, Abud TM. Acute pulmonary edema associated with obstruction of the airways. Case report. Rev Bras Anestesiol. 2008 Mar-Apr;58(2):165-71.

32. Trawoger R, Kolobow T, Cereda M, Sparacino ME. Tracheal mucus velocity remains normal in healthy sheep intubated with a new endotracheal tube with a novel laryngeal seal. Anesthesiology. 1997 May;86(5):1140-4.

33. Cervin A, Lindberg S. Changes in mucociliary activity may be used to investigate the airway-irritating potency of volatile anaesthetics. Br J Anaesth. 1998 Apr;80(4):475-80.

34. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. Eur Respir J. 1999 May;13(5):1177-88.

35. Williams R, Rankin N, Smith T, Galler D, Seakins P. Relationship between the humidity and temperature of inspired gas and the function of the airway mucosa. Crit Care Med. 1996 Nov;24(11):1920-9.

36. Rivero DH, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. Chest. 2001 May;119(5):1510-5.

37. Pazetti R, Pego-Fernandes PM, Lorenzi-Filho G, Saldiva PH, Moreira LF, Jatene FB. Effects of cyclosporine A and bronchial transection on mucociliary transport in rats. Ann Thorac Surg. 2008 Jun;85(6):1925-9; discussion 9.

38. Fernandes PM, Said MM, Pazetti R, Moreira LF, Jatene FB. Effects of azathioprine on mucociliary clearance after bronchial section and anastomosis in a rat experimental model. J Bras Pneumol. 2008 May;34(5):273-9.

39. Asimakopoulos G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. Perfusion. 1999 Jul;14(4):269-77.

40. Gott JP, Cooper WA, Schmidt FE, Jr., Brown WM, 3rd, Wright CE, Merlino JD, et al. Modifying risk for extracorporeal circulation: trial of four antiinflammatory strategies. Ann Thorac Surg. 1998 Sep;66(3):747-53; discussion 53-4.

41. Moore FD, Jr., Warner KG, Assousa S, Valeri CR, Khuri SF. The effects of complement activation during cardiopulmonary bypass. Attenuation by hypothermia, heparin, and hemodilution. Ann Surg. 1988 Jul;208(1):95-103.

42. de Vroege R, Rutten PM, Kalkman C, Out TA, Jansen PG, Eijsman L, et al. Biocompatibility of three different membrane oxygenators: effects on complement, neutrophil and monocyte activation. Perfusion. 1997 Nov;12(6):369-75.

43. Massoudy P, Zahler S, Becker BF, Braun SL, Barankay A, Richter JA, et al. Significant leukocyte and platelet retention during pulmonary passage after declamping of the aorta in CABG patients. Eur J Med Res. 1999 May 26;4(5):178-82.

44. Massoudy P, Zahler S, Becker BF, Braun SL, Barankay A, Meisner H. Evidence for inflammatory responses of the lungs during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. Chest. 2001 Jan;119(1):31-6.

45. Schlensak C, Doenst T, Beyersdorf F. Lung ischemia during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2000 Jul;70(1):337-8.

46. Brismar B, Hedenstierna G, Lundquist H, Strandberg A, Svensson L, Tokics L. Pulmonary densities during anesthesia with muscular relaxation--a proposal of atelectasis. Anesthesiology. 1985 Apr;62(4):422-8.

47. Hachenberg T, Lundquist H, Tokics L, Brismar B, Hedenstierna G. Analysis of lung density by computed tomography before and during general anaesthesia. Acta Anaesthesiol Scand. 1993 Aug;37(6):549-55.

48. Hedenstierna G, Rothen HU. Atelectasis formation during anesthesia: causes and measures to prevent it. J Clin Monit Comput. 2000;16(5-6):329-35.

49. Magnusson L, Zemgulis V, Tenling A, Wernlund J, Tyden H, Thelin S, et al. Use of a vital capacity maneuver to prevent atelectasis after cardiopulmonary bypass: an experimental study. Anesthesiology. 1998;88(1):134-42.

50. Guyton AC, Jones CE. Central venous pressure: physiological significance and clinical implications. Am Heart J. 1973 Oct;86(4):431-7.

51. Ng CS, Wan S, Yim AP, Arifi AA. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. Chest. 2002 Apr;121(4):1269-77.

52. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest. 2002 Mar;109(5):571-7.

53. Ng CS, Arifi AA, Wan S, Ho AM, Wan IY, Wong EM, et al. Ventilation during cardiopulmonary bypass: impact on cytokine response and cardiopulmonary function. Ann Thorac Surg. 2008 Jan;85(1):154-62.

54. Pedersen M. Ciliary activity and pollution. Lung. 1990;168 Suppl:368-76.

55. Menon-Miyake MA, Carvalho de Oliveira R, Lorenzi-Filho G, Saldiva PH, Butugan O. Luffa operculata affects mucociliary function of the isolated frog palate. Am J Rhinol. 2005 Jul-Aug;19(4):353-7.

56. Albers GM, Tomkiewicz RP, May MK, Ramirez OE, Rubin BK. Ring distraction technique for measuring surface tension of sputum: relationship to sputum clearability. J Appl Physiol. 1996 Dec;81(6):2690-5.

57. Haidekker MA, Tsai AG, Brady T, Stevens HY, Frangos JA, Theodorakis E, et al. A novel approach to blood plasma viscosity measurement using fluorescent molecular rotors. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 May;282(5):H1609-14.

58. Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR, Mc CL. Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance. Cleve Clin Q. 1958 Apr;25(2):65-83.

59. Hachenberg T, Brussel T, Roos N, Lenzen H, Mollhoff T, Gockel B, et al. Gas exchange impairment and pulmonary densities after cardiac surgery. Acta Anaesthesiol Scand. 1992 Nov;36(8):800-5.

60. Tenling A, Hachenberg T, Tyden H, Wegenius G, Hedenstierna G. Atelectasis and gas exchange after cardiac surgery. Anesthesiology. 1998 Aug;89(2):371-8.

61. Joki S, Saano V. Ciliary beat frequency at six levels of the respiratory tract in cow, dog, guinea-pig, pig, rabbit and rat. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1994 May;21(5):427-34.

62. Matsuura S, Shirakami G, Iida H, Tanimoto K, Fukuda K. The effect of sevoflurane on ciliary motility in rat cultured tracheal epithelial cells: a comparison with isoflurane and halothane. Anesth Analg. 2006 Jun;102(6):1703-8.

63. Hofmann T, Gugatschga M, Koidl B, Wolf G. Influence of preservatives and topical steroids on ciliary beat frequency in vitro. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Apr;130(4):440-5.

64. Melville GN, Iravani J. Factors affecting ciliary beat frequency in the intrapulmonary airways of rats. Can J Physiol Pharmacol. 1975 Dec;53(6): 1122-8.

65. Stanley PJ, Griffin WM, Wilson R, Greenstone MA, Mackay IS, Cole PJ. Effect of betamethasone and betamethasone with neomycin nasal drops on human nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. Thorax. 1985 Aug;40(8):607-12.

66. Piccin VS, Calciolari C, Yoshizaki K, Gomes S, Albertini-Yagi C, Dolhnikoff M, et al. Effects of different mechanical ventilation strategies on the mucociliary system. Intensive Care Med. 2010 Oct 28;37(1):132-40.

67. Ewert G. On the Mucus Flow Rate in the Human Nose. Acta Otolaryngol Suppl. 1965;200:SUPPL 200:1-62.

68. Schlensak C, Doenst T, Preusser S, Wunderlich M, Kleinschmidt M, Beyersdorf F. Bronchial artery perfusion during cardiopulmonary bypass does not prevent ischemia of the lung in piglets: assessment of bronchial artery blood flow with fluorescent microspheres. Eur J Cardiothorac Surg. 2001 Mar;19(3):326-31; discussion 31-2.

69. Dodd-o JM, Welsh LE, Salazar JD, Walinsky PL, Peck EA, Shake JG, et al. Effect of bronchial artery blood flow on cardiopulmonary bypassinduced lung injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Feb;286(2):H693-700.

70. Boucher RC. Human airway ion transport. Part two. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Aug;150(2):581-93.

71. Boucher RC. Human airway ion transport. Part one. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Jul;150(1):271-81.

72. Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. Am Rev Respir Dis. 1988 Mar;137(3):726-41.