
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA

**EFEITOS DE POLÍMEROS NÃO IÔNICOS
ADICIONADOS A SURFACTANTE *IN*
VITRO E EM MODELO EXPERIMENTAL
DE ASPIRAÇÃO DE MECÔNIO**

JORGE HECKER LUZ

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do Título de Doutor em Saúde da Criança.

Orientador: Renato Machado Fiori

Co-orientador: Humberto Holmer Fiori

Porto Alegre, 2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

L979e Luz, Jorge Hecker

Efeitos de polímeros não iônicos adicionados a surfactante *in vitro* e em modelo experimental de aspiração de mecônio / Jorge Hecker Luz. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

128 f.: il. tab.

Orientação: Prof. Dr. Renato Machado Fiori.

Co-orientação: Prof. Dr. Humberto Holmer Fiori.

Tese (Doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. SÍNDROME DE ASPIRAÇÃO DE MECÔNIO. 2. SURFACTANTES PULMONARES. 3. TENSOATIVOS. 4. POLÍMEROS. 5. DEXTRANOS. 6. POLIETILENOGLICÓIS. 7. MODELOS ANIMAIS. 8. ANIMAIS RECÉM-NASCIDOS. 9. SUINOS. 10. IN VITRO. 11. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. I. Fiori, Renato Machado. II. Fiori, Humberto Holmer. III. Título.

C.D.D. 616.23
C.D.U. 616.24:636.4(043.2)
N.L.M. WQ 210.5

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

DOUTORANDO: Jorge Hecker Luz

ENDEREÇO: Avenida Ipiranga, 6690 - 5º andar – UTI Neonatal.

Porto Alegre – RS

TELEFONE: 51-33154188

E-mail: jluz@pucri.br

CONFLITO DE INTERESSE: NENHUM

Dedicatória

À Anette, Tatiana e Patricia.

Agradecimento Especial

Ao meu pai, Prof. Dr. Nilo Pereira Luz, que me ensinou a ser Médico. Seu entusiasmo e dedicação aos seus pacientes, sua procura interminável do conhecimento científico são modelos para mim e para todos os demais colegas que tiveram o privilégio de usufruir de sua sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Renato Machado Fiori** pela confiança e a amizade ao longo destes anos todos, e o incentivo indispensável para a realização deste doutorado.

Ao Prof. **Dr. Humberto Holmer Fiori** pela amizade, pelo companheirismo constante na busca do aprimoramento de nossa prática médica e pela cooperação em todos os aspectos desta pesquisa.

Ao **Dr. Manuel Ruttkay Pereira** amigo e colaborador direto nesta pesquisa.

Ao **Dr. Mauricio Obal Colvero** amigo e colaborador essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Dr. Alexandre Fiori** amigo e parceiro que participou ativamente na elaboração deste projeto.

Aos médicos e ex-bolsistas **Carolina Menna Barreto Silveira, André Valiente Nectoux** e **Fabiane Palma Bisinela** pela participação efetiva e o interesse na pesquisa.

Ao **Dr. Jéferson Braga Silva** e à equipe do Laboratório de Habilidades Médicas pelo apoio na realização dos experimentos

Ao **Hospital São Lucas da PUCRS** pelo apoio dado a essa pesquisa;

À empresa **Farmalab-Chiesi** pelo fornecimento do surfactante Curosurf®;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi

CAPÍTULO I REFERENCIAL TEORICO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Surfactante e Tensão Superficial	2
1.2 História da Descoberta do Surfactante Pulmonar	4
1.3 Composição do Sistema Surfactante.....	9
1.3.1 Lipídios.....	11
1.3.2 Proteínas	16
1.3.3 Estímulo Hormonal para Produção do Surfactante	18
1.4 Doenças Associadas à Deficiência da Produção do Surfactante Pulmonar	20
1.4.1 Doença da Membrana Hialina (DMH)	20

1.4.2	Proteinose Alveolar Pulmonar Congênita	26
1.5	Doenças Associadas à Alteração da Função do Surfactante	
	Pulmonar.....	27
1.5.1	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) e Hipertensão	
	Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN)	27
1.5.2	Pneumonia Neonatal	28
1.5.3	Hemorragia Pulmonar	29
1.5.4	Síndrome da Aspiração de Mecônio (SAM).....	30
1.6	Testes para Avaliar a Maturidade da Função Surfactante Fetal	41
1.7	Testes para Avaliar a Função Surfactante em Laboratório.....	44
	1.7.1 Avaliação da Função Surfactante <i>in vivo</i>	44
	1.7.2 Avaliação da Função Surfactante <i>in vitro</i>	46
1.8	Inibição/Inativação da Função do Surfactante Pulmonar	54
1.9	Inibição/Inativação da Função surfactante pela	
	adição de mecônio	58
1.10	Surfactante Pulmonar: Restauração da Função após	
	inativação/inibição	60
2	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	66
3	OBJETIVOS	68

3.1 Objetivo Geral	68
3.2 Objetivos Específicos	68
4 REFERÊNCIAS	69

CAPÍTULO II

5 MATERIAL E MÉTODO	83
5.1 Ética	87
5.2 Análise Estatística	88
5.3 REFERÊNCIAS	89

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

PÁGINA DE ROSTO	91
RESUMO	92
MÉTODO	94
RESULTADOS	97
DISCUSSÃO.....	102

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES	115
-------------------------	------------

ANEXOS

Anexo 1 Evolução das medidas de PaO ₂ durante o estudo nos três grupos	118
Anexo 2 Evolução das medidas de PaCO ₂ durante o estudo nos três grupos	119
Anexo 3 Evolução das medidas de pH durante o estudo nos três grupos.....	120
Anexo 4 Valores das diferenças das medidas da PaO ₂ (Δ PaO ₂) após a indução da SAM.....	121
Anexo 5 Valores das gasometrias e Δ PaO ₂ (médias \pm desvio padrão) e comparação entre os grupos.....	122
Anexo 6 Gráfico das medidas repetidas das PaCO ₂	123
Anexo 7 Gráfico das medidas repetidas dos pH	124
Anexo 8 Resultados da ANOVA multivariada para medidas repetidas dos valores das gasometrias arteriais	125
Anexo 9 Protocolo de Anestesia	126
Anexo 10 Dados Gerais sobre os Animais.....	127
Anexo 11 Consistência do Mecônio.....	128

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Metabolismo do surfactante pulmonar	10
Figura 2 - Modelo espacial do alinhamento da DPFC na interface ar-líquido ..	15
Figura 3 - Incidência da Síndrome de Aspiração de Mecônio HSL PUCRS	31
Figura 4 - Fisiopatologia da Síndrome de Aspiração de Mecônio	35
Figura 5 - Balança de Langmuir-Wilhelmy	47
Figura 6 - Surfactômetro da bolha pulsante	48
Figura 7 - Surfactômetro da bolha cativa	50
Figura 8 - Relação entre a concentração de surfactante e a contagem de mbe	53
Figura 9 - Inibição do Surfactante Exógeno pela Albumina	57
Figura 10 - Inibição do surfactante exógeno pelo sangue.....	57
Figura 11 - Inibição do surfactante exógeno pelo mecônio.....	60
Figura 12 - Efeito sobre a contagem de microbolhas estáveis da adição de Dextran e PEG à uma solução de surfatante (Curosurf® 0,04mg/ml) em sorofisiológico	65

Figura 13 - Efeito da adição de Dextran e PEG à solução de surfatante (Curosurf® 0,04mg/ml) inibida pelo mecônio	65
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1 - Porcos recém-nascidos após indução anestésica	85
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1 - Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa em uma solução contendo Curosurf® 0,2 mg/ml	99
Figura 2 - Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa em uma solução contendo Curosurf® 0,2 mg/ml adicionada de dextran 7,5%.....	99
Figura 3 - Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa em uma solução contendo Curosurf® 0,2 mg/ml adicionada de PEG 7,5%	100
Figura 4 - Evolução da média das PaO ₂	101

ANEXOS

Figura 1 - Evolução das médias dos valores da PaCO ₂ nos três diferentes grupos após a indução da SAM	123
Figura 2 - Evolução das médias do pH nos três diferentes grupos após a indução da SAM	124

LISTA DE ABREVIATURAS

CIT	Colinafosfato-citidililtransferase
CPAP	pressão positiva contínua nas vias aéreas (<i>continuous positive airway pressure</i>)
DMH	doença da membrana hialina
DPFC	dipalmitoilfosfatidilcolina
ΔPaO_2	variação da pressão parcial arterial de oxigênio
ECMO	membrana de oxigenação extra-corpórea (<i>extracorporeal membrane oxygenation</i>)
FC	fosfatidilcolina
FFP	Fator fibroblástico do pneumócito
FG	fosfatidilglicerol
FI	fosfatidilinositol
FiO_2	fração inspirada de oxigênio
GA	grandes agregados (surfactante)
HPPN	hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
IM	intramuscular
IO	índice de oxigenação
IP	intraperitoneal
IV	intravenosa
LBA	lavado broncoalveolar
O_2	oxigênio
PA	pequenos agregados (surfactante)

PaCO₂	pressão parcial arterial de dióxido de carbono
PaO₂	pressão parcial arterial de oxigênio
PEEP	pressão positiva expiratória final <i>(positive end-expiratory pressure)</i>
PEG	polietileno glicol
PIP	pressão positiva inspiratória <i>(positive inspiratory pressure)</i>
SARA	síndrome da angústia respiratória do adulto
SAM	síndrome de aspiração de mecônio
SBC	surfactômetro da bolha cativa
SBP	surfactômetro da bolha pulsante
SP(A,B,C,D)	proteína associada ao surfactante
TME	teste das microbolhas estáveis

RESUMO

Introdução: a síndrome da aspiração de mecônio (SAM) é uma das doenças respiratórias mais importantes no período neonatal. O tratamento com surfactante exógeno apresenta uma resposta muito modesta. O mecônio é um potente inibidor da função surfactante. Polímeros não iônicos adicionados ao surfactante neutralizam a inibição causada pelo mecônio *in vitro*. Os resultados do uso de surfactante em modelos experimentais não apresentam respostas consistentes.

Objetivo: avaliar o efeito de polímeros não iônicos na função surfactante *in vitro* e em modelo experimental de síndrome de aspiração de mecônio.

Método: as medidas da adsorção e da tensão superficial mínima de soluções de surfactante contendo dextran e polietilenoglicol (PEG) foram avaliados pelo surfactômetro da bolha cativa. O experimento *in vivo*, foi realizado com 16 porcos recém-nascidos nos quais a aspiração de mecônio foi provocada pela instilação de 5 ml/kg de mecônio a 20%. Os animais foram divididos em três grupos: I. controle (n=5); II. surfactante 100mg/kg (n=5); III. surfactante-polietilenoglicol 7,5% (n=6). O período de observação foi de 6 horas. A resposta aos diversos tratamentos foi avaliada por gasometrias arteriais seriadas.

Resultados: a adição de dextran e PEG melhorou o desempenho do surfactante avaliado pelo surfactômetro da bolha cativa.

Os valores da PaO₂ (média ± desvio padrão) aos 30 minutos após o tratamento da SAM foram: Grupo I= 66,8 ± 21,12 mmHg; Grupo II= 68,12 ± 19,41 mmHg; e no Grupo III= 61,33 ± 16,18 mmHg (P= 0,817). Com 3 horas após tratamento os valores foram: Grupo I= 90,60 ± 68,12 mmHg; Grupo II= 72,18 ± 34,83 mmHg; Grupo III= 69,00 ± 24,46 (P= 0,711). Com 6 horas após tratamento, os valores foram: Grupo I= 76,60 ± 48,04 mmHg; Grupo II= 99,00 ± 94,17 mmHg; Grupo III= 60,83 ± 19,18 mmHg (P= 0,586). ANOVA multivariada

modificada para medidas repetidas não demonstrou diferença significativa entre os três grupos ($P= 0,560$).

Conclusão: adição de PEG ao surfactante não modificou o quadro de insuficiência respiratória hipoxêmica grave causada pela SAM, apesar de melhorar o desempenho do surfactante *in vitro*.

Unitermos: aspiração de mecônio, dextran, modelo experimental, polímeros, polietilenoglicol, recém-nascidos, surfactante pulmonar, surfactômetro da bolha cativa.

ABSTRACT

Introduction: meconium aspiration syndrome (MAS) is one of the most significant respiratory diseases in the neonatal period. Surfactant therapy has only modest impact on MAS outcome. Meconium is a potent surfactant inhibitor. Non-ionic polymers reverse surfactant inhibition caused by meconium *in vitro*. Surfactant treatment in animal models do not show consistent results.

Objective: to evaluate the effect of non-ionic polymers on surfactant activity *in vitro* and added to in animal model of meconium aspiration syndrome.

Methods: measurements of adsorption and minimal surface tension of surfactant solutions with added dextran or polyethylene glycol (PEG) attained by captive bubble surfactometer. Animal experiment consisted of 16 newborn piglets submitted to MAS by instillation of 5 ml/kg of 20% meconium. There were divided in three groups: I. controls (n=5); II. surfactant 100 mg/kg (n=5); III. surfactant -PEG 7,5% (n=6). The experiments lasted for 6 hours. The responses to different treatments were evaluated by serial arterial blood gases.

Results: adding dextran and PEG improved surfactant function. PaO₂ values (mean ± SEM) at 30 minutes after treatment of MAS were: Group I= 66.80 ± 21.12 mmHg; Group II= 68.12 ± 19.41 mmHg; and Group III= 61.33 ± 16.18 mmHg (P=0.817). At 3 hours after treatment values were: Group I= 90.60 ± 68.12 mmHg; Group II= 72.18 ± 34.83 mmHg; Group III= 69.00 ± 24.46 (P= 0.711). At 6 hours after treatment values were: Group I= 76.60 ± 48.04 mmHg; Group II= 99.00 ± 94,17 mmHg; Group III= 60.83 ± 19.18 mmHg (P=0586). Multivariate ANOVA modified for repeated measures was not significant among the three groups (P= 0.560).

Conclusions: adding PEG to surfactant has no effect in the hypoxemic respiratory failure due to MAS, despite the improvement of surfactant properties *in vitro*.

Key-words: animal model, captive bubble surfactometer, dextran, meconium aspiration syndrome, newborn infant, polyethylene glycol, polymers, surfactant.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Surfactante e Tensão Superficial

O termo surfactante é derivado da palavra inglesa “*surfactant*”, forma reduzida de “*surface active agent*”. Por definição, uma substância qualifica-se como surfactante, se for capaz de alterar a tensão superficial para um valor diferente daquele produzido por determinada substância pura. Para o pulmão e em outras situações, as interações de forças que interessam são as geradoras da tensão superficial que ocorrem numa interface ar-líquido e das substâncias capazes de diminuí-las. No caso da água, a tensão superficial é a força gerada pelas pontes de hidrogênio entre as moléculas de H₂O na monocamada da superfície em contato com o ar. As moléculas de H₂O têm carga elétrica total de zero, mas sua assimetria estrutural cria um momento bipolar permanente. Assim ela se comporta como uma substância polar com pontes elétricas entre uma molécula de H⁺ e duas moléculas de O⁻. As pontes de hidrogênio da interface com o ar formam uma película na superfície da água, de tal maneira

que objetos que exerçam forças menores do que a tensão superficial, possam ficar sobre a superfície sem se molhar, como é caso dos mosquitos em uma poça de água. Essa propriedade física é diferente do princípio de Arquimedes, que relaciona o peso de um corpo com o peso do volume de água deslocado por esse, de modo que, se o peso do volume de água deslocado for maior que o peso do objeto, esse flutuará, mas ficará molhado.¹⁻³

As gorduras, os sabões e os detergentes são substâncias com atividade de surfactante. Elas são consideradas substâncias anfipáticas, pois possuem um pólo hidrofílico e um hidrofóbico. Essa característica permite às substâncias migrarem para a superfície do líquido (pólo hidrofóbico), permanecendo na interface de maneira estável (pólo hidrofílico), fenômeno chamado adsorção à interface ar-líquido. Por exemplo, com a água pura, por ter uma tensão superficial muito elevada, não se consegue produzir bolhas de ar estáveis, mas ao se misturar um pouco de sabão, diminui-se a tensão superficial e obtêm-se bolhas estáveis de sabão. Isso ocorre porque, ao se misturar a água com sabão, as ligações das pontes de hidrogênio da água na interface ar-líquido são substituídas por ligações mais fracas entre o hidrogênio e o pólo hidrofílico das moléculas do sabão, diminuindo as forças de tensão superficial.

O surfactante pulmonar é um dos mais potentes surfactantes conhecidos que atua em uma interface ar-líquido e tem como característica única a capacidade de diminuir a tensão superficial quase a zero, ao reduzir-se a superfície dessa interface. Essa tensão superficial mínima é fundamental para a diminuição das forças que ocasionam o colapso alveolar e bronquíolos distais

no final da expiração. Ao rever o exemplo das bolhas de sabão, nota-se que as muito pequenas se rompem imediatamente, enquanto as maiores permanecem estáveis por tempo mais longo. A tensão superficial é semelhante nas bolhas grandes e nas pequenas e quanto menor o raio de uma bolha maiores são as forças que causam a instabilidade dessa. Se essas forças ultrapassarem a gerada pela tensão superficial, as bolhas rompem-se imediatamente.³

A capacidade do surfactante pulmonar de manter bolhas muito pequenas estáveis é uma das maneiras de se demonstrar sua presença e função, tanto clínica como experimentalmente.⁴

1.2 História da Descoberta do Surfactante Pulmonar

O conhecimento essencial para a compreensão da ação do surfactante pulmonar teve início com os trabalhos do Marquês de Laplace. Entre 1798 e 1827, foram publicados os 5 volumes de sua obra “*Traité de Méchanique Céleste*”. O volume 4 (1806) apresenta um capítulo sobre a ação capilar e contém uma relação matemática entre a força, a tensão superficial e o raio de uma superfície curva conhecida como lei de Laplace.^{1,3}

Um princípio laplaciano é um cálculo matemático aplicado à física. A lei de Laplace aplicada a uma superfície esférica é a equação $\Delta P = 2\gamma/r$, na qual “ ΔP ” é a diferença de pressões (dentro e fora da esfera), “ γ ” é o valor da tensão superficial e “ r ” o raio da esfera.

A teoria sobre as forças que atuam em uma superfície foi elaborada por Lorde Rayleigh (1890), quando pesquisava um método para determinar o tamanho de uma molécula. Para conseguir seu objetivo, ele necessitou criar uma monocamada da substância a ser testada e assim desenvolveu a teoria física das forças que atuam em uma interface. Com os resultados desses trabalhos, Lorde Rayleigh foi agraciado com o prêmio Nobel de Física de 1904.¹⁻³

A presença de uma tensão superficial pulmonar foi demonstrada em 1929 pelo fisiologista suíço Kurt von Neergaard. Estudando pulmões isolados de porcos, concluiu que “(...) em todos os estágios da expansão (pulmonar), a tensão superficial foi a principal responsável pela retração total do pulmão, mais do que foi a elasticidade tissular (...)” e afirmou que a lei de Laplace necessitava ser aplicada para explicar a expansão e a retração dos alvéolos pulmonares. Von Neergaard tinha a convicção de que seus achados se aplicavam aos recém-nascidos, pois escreveu que “A considerável força da tensão superficial, a qual mais tarde é responsável por grande parte da retração pulmonar, dificulta a abertura inicial do pulmão”. Apesar da importância dessa descoberta, o trabalho de von Neergaard ficou esquecido por 30 anos e, portanto, não influenciou o desenvolvimento das pesquisas posteriores sobre o surfactante pulmonar.¹⁻³

Em 1933, Wilson e Faber reconheceram “(...) a coesão das superfícies úmidas nos pulmões sem ar dos recém-nascidos (...)” e que “(...) a

resistência inicial do pulmão atelectásico à expansão é sempre presente e contribui para a manutenção da atelectasia”.³

Em 1947 o patologista Peter Gruenwald, ao expandir com líquido ou com ar os pulmões retirados de prematuros, observou que a pressão necessária para a expansão era maior com o ar do que a com o líquido. E concluiu: “(...) a resistência à aeração é devida à tensão superficial que se opõe à entrada de ar, mas que não tem efeito quando da instilação de líquido. A presença de substâncias com atividade de superfície reduz a pressão necessária para a aeração”. Esse trabalho, além de confirmar os achados de Von Neergaard, despertou a atenção de uma aluna muito especial de Gruenwald, a Dra Mary Ellen Avery.⁵

Após a II Guerra Mundial, a pesquisa para o desenvolvimento de armas químicas na Inglaterra e nos Estados Unidos proporcionou uma série de descobertas para o melhor entendimento do surfactante pulmonar. Em 1954, Macklin identificou a presença de um filme de mucopolissacarídeos nas paredes alveolares capaz de gerar tensões superficiais favoráveis e constantes, além de sugerir a possível origem dessas substâncias nos grânulos dos pneumócitos.

Em 1955, Richard Pattle, trabalhando no desenvolvimento de armas químicas, estudou a espuma oriunda do edema pulmonar causado por gases tóxicos como o fosgênio (COCl_2), que causa edema pulmonar rapidamente letal. Pattle desenvolveu um método para avaliar a tensão superficial baseado

na taxa de contração das bolhas dessa espuma suspensa numa gota invertida vista em um microscópio. A inesperada estabilidade das bolhas retiradas de um pulmão normal, levaram-no a concluir que elas deviam se originar dos alvéolos, e os alvéolos, por sua vez, deveriam ser recobertos por uma camada de substâncias com uma tensão superficial muito baixa.^{1,3-6}

John Clements, após trabalhar com Pattle na Inglaterra, voltou para os Estados Unidos em 1953 para trabalhar no USA Army Chemical Center. Ele pensou que, se criasse um método capaz de medir dinamicamente a tensão superficial, reproduziria melhor o que ocorria nos pulmões. Para esse fim, Clements modificou a balança de Wilhelmy para torná-la capaz de medir as alterações na tensão superficial com relação às variações da área da superfície. Seus surpreendentes achados estabeleceram as importantes características físicas dessa camada que reveste os alvéolos, principalmente a alteração da tensão superficial, conforme a área da superfície era comprimida. Demonstrou que, nos “volumes pulmonares maiores”, a tensão superficial era mais alta e, nos “volumes pulmonares menores”, ela se aproximava de zero. Denominou esse material, presumivelmente presente na interface ar-líquido alveolar, de surfactante pulmonar, ressaltando sua importância como um fator anti-atelectásico.^{1,2,5}

A Dra Mary Ellen Avery, após terminar sua residência em pediatria na Johns Hopkins University, retornou para Boston em 1957. Seus objetivos eram estudar fisiologia respiratória com o Dr. Jere Mead e aprender mais sobre os recém-nascidos com o Dr. Clement Smith, considerado ainda hoje o mais

influyente dos neonatologistas norte-americanos. O Dr. Jere Mead tinha como linha de pesquisa o estudo das forças envolvidas na retração pulmonar.

Uma interessante observação feita no laboratório de Mead foi que pulmões inflados com ar têm uma retração elástica maior do que os inflados com o mesmo volume de líquido. E a conclusão foi que as forças de superfície, que são maiores em uma interface ar-líquido do que em uma de líquido-líquido, contribuem para a retração elástica dos pulmões. Estes achados reproduzem os descritos por von Neergaard.

As pesquisas do Dr. Clements com a balança para medir dinamicamente a tensão superficial despertaram o interesse da Dra. Mary Ellen, levando-a a visitar o laboratório do Dr. Clements a fim de conhecer esse dispositivo.

De volta a Boston, ela e Mead, utilizando a balança de Langmuir-Wilhelmy modificada por Clements, estudaram os extratos pulmonares de prematuros falecidos com doença da membrana hialina (DMH) e demonstraram a presença da deficiência de surfactante pulmonar.⁷ No ano anterior, Pattle, em sua publicação *magnum opus*, conforme citação de Avery no livro *The Roots of Perinatal Medicine*, já tinha demonstrado que as bolhas obtidas dos pulmões de porquinhos de Guiné imaturos eram instáveis.⁵

Apesar de ter consciência da relevância de seus achados, a Dra. Avery foi muito cuidadosa em relacionar diretamente a deficiência de surfactante com a doença da membrana hialina. Na 1ª edição de seu livro "The

Lung and Its Disorders in the Newborn Infant” publicado em 1964, a Dra. Avery apenas mencionou os resultados de seu trabalho como uma possível causa entre as demais etiologias consideradas na época. Somente na 4ª edição, em 1981, é que ela claramente coloca a deficiência do sistema surfactante pulmonar como a principal causa da doença da membrana hialina.

A Academia Americana de Pediatria considerou esse trabalho um dos marcos da pesquisa em pediatria do milênio passado.^{8,9}

Essas pesquisas que abriram linhas de investigação profícuas no conhecimento e no tratamento da doença da membrana hialina foram recompensadas quando Fujiwara introduziu com sucesso o tratamento com surfactante exógeno para a doença da membrana hialina em 1980.¹⁰

1.3 Composição do Sistema Surfactante

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa de fosfolipídios (80%), lipídios neutros (8%) e proteínas (12%) que revestem a superfície alveolar dos pulmões. A composição do surfactante é muito semelhante entre as mais diversas espécies animais inclusive os humanos. É sintetizado nas células alveolares tipo II, organizadas em corpúsculos lamelares e, posteriormente, secretadas para o espaço alveolar.

A presença do surfactante formando uma monocamada na interface ar-líquido reduz a tensão superficial, diminuindo a tendência dos alvéolos a

colapsarem no final da expiração. O surfactante extracelular é facilmente retirado dos alvéolos através de lavagem bronco-alveolar, e seus componentes podem ser isolados por diversas técnicas e estudados individualmente (Figura 1).^{3,11,12}

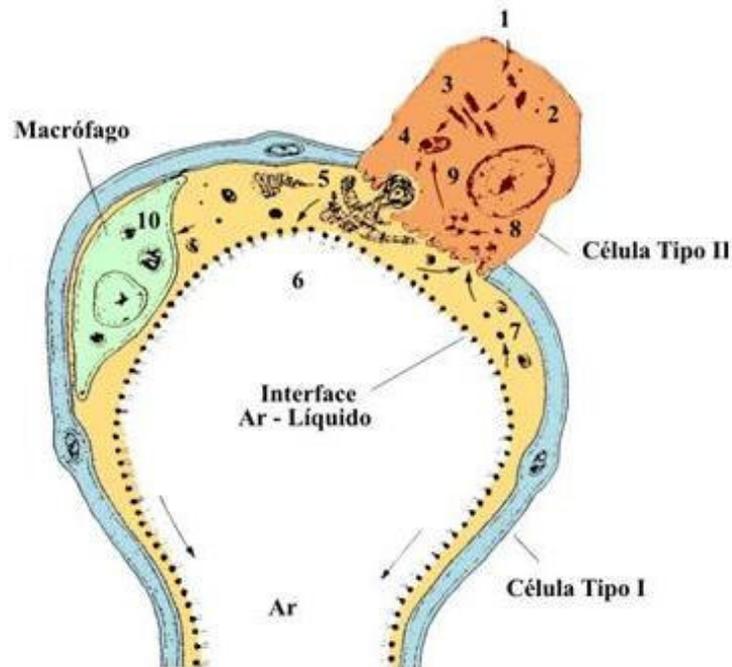


Figura 1 - Metabolismo do surfactante pulmonar. O surfactante é sintetizado, a partir dos seus percussores (1), no retículo endoplasmático (2), e é transportado pelo aparelho de Golgi (3) até os corpúsculos lamelares (4), onde é armazenado. Os corpúsculos lamelares são secretados para a camada líquida que reveste os alvéolos, onde transformam-se em mielina tubular (5). A mielina tubular libera a DPFC e as proteínas hidrofóbicas para a formação da monocamada na interface ar-líquido (6). Os fosfolípidios permanecem na luz alveolar por 5 a 10 horas. O surfactante é reutilizado pelas células alveolares tipo II, através da captação dos pequenos agregados vesiculares (7). Essas pequenas vesículas de surfactante são transformadas, pelo endossoma (8), em corpos multivesiculares (9). Esses agregados de fosfolípidios são armazenados nos corpúsculos lamelares (4). Esse ciclo de reutilização dos componentes do surfactante ocorre inúmeras vezes, até que ocorra a degradação e eliminação dos fosfolípidios. Uma pequena fração do surfactante é fagocitada pelos macrófagos alveolares (10). (Adaptado de Kattwinkel J. Surfactant: Evolving Issues. Clin Peritol 1998; 25:17-32).

1.3.1 Lipídios

Os fosfolipídios são os lipídios predominantes correspondendo a 80-90% da fração lipídica total, sendo que o colesterol, o triacilcolesterol e os ácidos graxos livres completam a composição. A fosfatidilcolina (FC), também conhecida como lecitina, é o mais abundante dos fosfolipídios, correspondendo a 70-80% desses. Aproximadamente 60% da fosfatidilcolina encontra-se na forma di-saturada com dois ácidos palmíticos nas posições 1 e 2 formando a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC), que é o fosfolipídio com maior atividade de superfície contido no surfactante.^{3,13-15}

O segundo maior componente da fração lipídica do surfactante é o fosfatidilglicerol (FG), que corresponde de 5 à 10% do total. O FG é essencial para a formação dos corpúsculos lamelares nas células alveolares tipo II.¹⁴

Entre os fosfolipídios restantes está o fosfatidilinositol (FI), que se encontra presente em mais alta concentração do que o FG nos pulmões imaturos; uma relação baixa entre FG e FI é um sinal de imaturidade pulmonar.^{3,14}

• Síntese dos Fosfolipídios

A síntese da DPFC, FG e FI ocorre no retículo endoplasmático das células alveolares tipo II. O aparelho de Golgi processa os fosfolipídios e as

proteínas, enviando-os para as organelas de armazenamento, os corpúsculos lamelares, de onde são secretados para a luz alveolar por exocitose.

Os precursores da síntese dos fosfolípidios são oriundos da glicose e da síntese “de novo” de ácidos graxos. No início da gestação, a glicose oriunda da circulação sistêmica é a principal fonte de energia e do glicerol (a estrutura básica dos fosfolípidios). No período final da gestação, o glicogênio acumulado nas células alveolares tipo II torna-se a fonte principal de glicose para síntese da lecitina. A principal fonte para a síntese “de novo” é o palmitato, que representa 40% dos ácidos graxos presentes na molécula de DPFC.^{3,13,14}

Os passos iniciais da síntese da DPFC, do FG e do FI têm a mesma rota metabólica. A glicose é metabolizada em fosfato-3-glicerol e fosfato-dihidrohidroxiacetona, os quais são transformados em ácido fosfatídico comum aos três fosfolípidios. O ácido fosfatídico pode ser ativado pela enzima fosfatidato-citidiltransferase para formar o CDP-diacilglicerol que no final formará o fosfatidilglicerol e o fosfatidilinositol, ou resultar no diacilglicerol sob ação da enzima fosfatidato-fosfatase. A colina, por sua vez, é transformada em CDP-colina pela ação da enzima colinafosfato-citidiltransferase e liga-se ao diacilglicerol para formar a fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina formada pela síntese de novo possui ácidos graxos não saturados e, remodelada pela substituição desses por moléculas de palmitato, transforma-se em DPFC. A produção de DPFC pulmonar é regulada pela atividade da enzima colinafosfato-citidiltransferase. Os ácidos graxos e o fator fibroblástico do pneumócito (FFP) estimulam a atividade da colinafosfato-citidiltransferase. Os glicocorticóides, por

umentarem a síntese de ácidos graxos e a expressão do FFP estimulam a produção de DPFC.^{3,14,15}

O aparelho de Golgi processa os fosfolípidios e as proteínas (ver adiante), enviando-os para as organelas de armazenamento, os corpúsculos lamelares. Estes corpúsculos são pacotes de lipoproteínas condensadas e são secretados para a luz alveolar por exocitose. A secreção dos corpos lamelares é estimulada pelo estiramento das células tipo II e por agonistas β adrenérgicos e purinérgicos como o ATP.¹⁴

Nos alvéolos, os corpúsculos lamelares expandem-se para uma estrutura semelhante a uma treliça chamada de mielina tubular. As proteínas associadas ao surfactante (SP-A e SP-B) e o íon Ca^{2+} são importantes para esta conformação geométrica. A mielina tubular, forma de armazenamento extracelular do surfactante, é a precursora da monocamada da interface ar-líquido (Figura 1). Durante a expansão pulmonar, os componentes do surfactante presentes na hipofase migram para a monocamada. Na expiração, a monocamada é comprimida da tal maneira que são excluídos as proteínas, os fosfolípidios não-saturados e outros lipídios. Por este mecanismo, a monocamada fica rica em DPFC, que é o componente mais importante na diminuição da tensão superficial durante a compressão.^{3,11}

Os fosfolípidios são removidos dos alvéolos a cada 5-10 horas e trabalhos recentes estimam a meia vida da DPFC exógeno no espaço aéreo em 34 horas. Aproximadamente 95% da DPFC e 80% do FG secretados nos

alvéolos são reutilizados pelas células tipo II. Os agonistas β adrenérgicos têm importante função na homeostase da camada de revestimento alveolar, pois regulam tanto a secreção quanto a remoção do surfactante extracelular.¹⁶

• Função dos Fosfolipídios

O di-palmitoilfosfatidilcolina é o fosfolipídio do sistema surfactante responsável pela diminuição da tensão superficial na interface ar-líquido alveolar. A DPFC, por estar no estado sólido a 37° C, precisa da presença de outros fosfolipídios e das apoproteínas hidrofóbicas para a adsorção na monocamada da interface.¹⁷

A molécula de DPFC é composta por dois pólos, um polar e outro apolar. A presença desses dois pólos lhe rende as qualidades essenciais para funcionar como substância capaz de alterar a tensão surfactante na interface ar-líquido alveolar. O grupo polar associa-se com a hipofase líquida, enquanto que o apolar (constituído das duas cadeias rígidas retificadas de ácido palmítico) está direcionado para o espaço alveolar. As moléculas retificadas da DPFC aproximam-se, à medida que o volume alveolar diminui; quando a superfície se encontra reduzida suficientemente, as moléculas de DPFC formam um aglomerado compacto, impedindo o contato direto entre o ar e o líquido, tornando a tensão superficial próxima a zero. (Figura 2). No final da expiração, os alvéolos ficam revestidos por um material sólido formados pelas moléculas rígidas de DPFC, que estão tão próximas, que praticamente

substituem a interface ar-líquido por outra de ar-sólido. Como consequência, há um aumento na pressão de superfície (pressão de superfície alta é igual à tensão superficial baixa), de tal maneira que a tensão superficial diminui proporcionalmente mais que a redução do raio do alvéolo. E de acordo com a lei de Laplace, $\Delta P=2\gamma/r$, diminui a tendência ao colapso dos alvéolos, estabilizando-os no final da expiração.^{3,18}

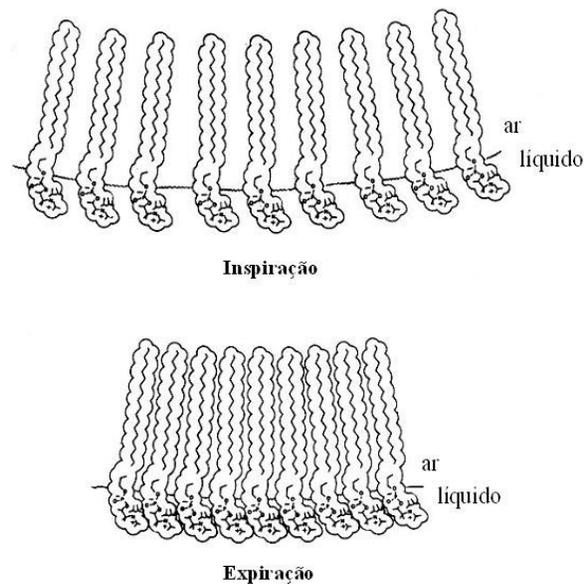


Figura 2 - Modelo espacial do alinhamento da DPFC na interface ar-líquido, na inspiração e na expiração. (Adaptado de Kotas R. Surface tension forces and liquid balance in the lung. Em: Thibeault DW, Gregory GA, editors. Neonatal Pulmonary Care.1ª ed Addison-Wesley Publishing Co California 1979.p. 35-53)

Os componentes da lecitina não saturada não funcionam como redutores da tensão superficial de maneira dinâmica, por não se manterem

como uma estrutura retificada na luz alveolar. Os seus ácidos graxos do pólo apolar torcem-se nas ligações duplas de suas moléculas e permitem o contato do ar com o líquido. Acredita-se que esses fosfolipídios sejam importantes para a rápida adsorção e distribuição da DPFC na monocamada da interface ar-líquido pulmonar. Esses fosfolipídios não saturados são excluídos progressivamente da interface ar-líquido, após vários ciclos de expansão e retração alveolar, tornando a monocamada mais pura em DPFC.

O fosfatidilglicerol não é essencial para a função de atividade de superfície do surfactante pulmonar em animais experimentais. O FG é essencial para a formação da mielina tubular e parece ser importante na regulação da renovação dos lipídios alveolares.^{3,14}

1.3.2 Proteínas

A fração protéica do surfactante corresponde a 10-15% da composição do surfactante. É composta por pelo menos quatro apoproteínas conhecidas SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. Estudos em líquido amniótico mostram um aumento progressivo na concentração das proteínas entre a 26ª e a 40ª semana de gestação.^{3,12 19}

As proteínas hidrofílicas (SP-A e SP-D) estão presentes na hipofase do líquido do alvéolo e, portanto, não fazem parte da monocamada da interface ar-líquido. As principais funções da SP-A nos pulmões relacionam-se com a

formação dos corpúsculos lamelares, na formação da mielina tubular e na manutenção do equilíbrio entre o surfactante intra e o extracelular.

A SP-A é a mais abundante das proteínas hidrofílicas, correspondendo a 5% do peso do surfactante e a melhor estudada. O seu *locus* gênico está localizado no braço longo do cromossoma 10 onde se encontram dois genes funcionais (SP-A1 e SP-A2) e inúmeras variantes genéticas já foram identificadas. A SP-A é sintetizada nas células alveolares tipo II e nas células epiteliais bronquiolares e brônquicas.

A SP-A e a SP-D têm importante ação nos mecanismos de defesa pulmonar, pois são capazes de neutralizar endotoxinas e vírus e de estimular a fagocitose. Essas duas proteínas eram consideradas exclusivas das vias aéreas inferiores, mas trabalhos recentes mostram que tanto a SP-A quanto a SP-D estão presentes também nas vias aéreas superiores, via digestiva, e podem ser importantes para proteção contra infecção como no caso da otite média. Dos surfactantes naturais exógenos disponíveis no mercado, nenhum contém a SP-A e a SP-D.^{19,20}

As proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C são consideradas as únicas específicas do surfactante pulmonar. A SP-B é a mais abundante delas e a melhor estudada e corresponde a 2% do peso do surfactante. O seu único *locus* gênico está localizado no cromossoma 2 com inúmeras mutações e polimorfismo descritos. Apesar de serem bem conhecidas sua estrutura molecular e funções, pouco se conhece de seu metabolismo. A presença da

SP-B é necessária para formação dos corpúsculos lamelares com morfologia normal.^{3,21}

A importância da SP-B para o sistema surfactante é exemplificada pela doença geneticamente transmitida, a proteinose alveolar congênita fatal, na qual o recém-nascido se apresenta com um quadro semelhante ao da doença da membrana hialina grave e evolui para o óbito.

As proteínas hidrofóbicas após serem secretadas pelas células alveolares tipo II, migram para a interface ar-líquido. Experimentalmente, foi demonstrado que a SP-B é essencial à rápida adsorção da DPFC para formar uma monocamada na interface ar-líquido e para que este filme de DPFC apresente uma tensão superficial mínima durante a compressão dinâmica.^{3,11,22}

Todos os surfactantes naturais exógenos contêm SP-B e SP-C, embora os surfactantes extraídos por trituração pulmonar (Survanta® e Curosurf®) contenham menor quantidade de SP-B em comparação aos extraídos por lavagem pulmonar (Infasurf® e Alveofact®).²³

1.3.3 Estímulo Hormonal para Produção do Surfactante

Em 1969, Liggins estudando fatores associados ao desencadeamento do trabalho de parto, observou que os cordeiros prematuros de ovelhas que haviam recebido infusão de glicocorticóide intra-útero

respiravam melhor e sobreviviam por mais tempo.²⁴ Este foi o primeiro passo no conhecimento da complexa interação entre a produção do surfactante pulmonar e os diversos hormônios que influenciam sua produção.

Os glicocorticóides aceleram a produção dos fosfolipídios pulmonares por estímulo direto na atividade de várias enzimas envolvidas na síntese da DPFC e, indiretamente, através dos fibroblastos pulmonares. Esses são estimulados a produzir FFP, que aumenta a produção dos fosfolipídios. A síntese das proteínas associadas ao surfactante também é acelerada pela ação dos corticóides. Os glicocorticóides são os mais importantes e estudados entre os hormônios que estimulam a produção de surfactante. Influenciam a maturação morfológica e funcional de diversos órgãos de origem endodérmica como intestino, pâncreas, glândulas salivares e pulmões. O uso clínico da corticoterapia para acelerar a maturação pulmonar nos fetos de gestações com ameaça de parto prematuro é considerado parte integral do atendimento pré-natal.^{3,25}

Os hormônios da tireóide estimulam a produção dos fosfolipídios pulmonares, mas não atuam sobre a síntese de proteínas associadas ao surfactante. Há uma ação sinérgica com os glicocorticóides na maturação do sistema surfactante. Os resultados clínicos com o hormônio estimulador da tireóide para acelerar a produção fetal de surfactante têm sido conflitantes.²⁵

Há evidências de uma ação estimulatória dos estrógenos e de uma ação inibitória dos andrógenos. Esta ação dos hormônios sexuais seria uma

das causas da vantagem biológica dos recém-nascidos prematuros do sexo feminino que apresentam maturação pulmonar mais precoce e melhor resposta ao estímulo com corticoterapia ante-natal.

A insulina inibe o efeito dos glicocorticóides na maturação pulmonar e, conseqüentemente, inibe a produção de DPFC. A hiperinsulinemia fetal está associada ao aumento na incidência da doença de membrana hialina nos filhos de gestantes diabéticas.

Entre outros hormônios investigados em relação à maturação pulmonar, estão a prolactina, o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento semelhante à insulina, ATP e os agonistas β adrenérgicos.^{3,25}

1.4. Doenças Associadas à Deficiência da Produção do Surfactante Pulmonar

1.4.1. Doença da Membrana Hialina (DMH)

A doença da membrana hialina é a doença respiratória neonatal mais estudada e conhecida e uma das principais causas de morbi-mortalidade no período neonatal. É causada pela deficiência do sistema surfactante pulmonar. Desde a descrição pioneira, feita por Hochheim em 1903, de uma membrana

peculiar no pulmão de dois prematuros falecidos logo após o nascimento, passando pela descoberta do surfactante pulmonar e sua deficiência nos prematuros acometidos com a DMH até o revolucionário uso clínico do surfactante pulmonar exógeno para o seu tratamento específico, passaram-se 77 anos. Essa caminhada necessitou do conhecimento de disciplinas básicas como a física, a química, a bioquímica e de disciplinas médicas como a patologia, a fisiologia, a epidemiologia, a pediatria e a neonatologia.^{1,26,27}

- **Epidemiologia**

A prematuridade é a principal causa da DMH e sua incidência é inversamente proporcional à idade gestacional. A população de maior risco é a dos recém-nascidos com idade gestacional menor que 34 semanas, sendo que 60-80% dos prematuros com idade gestacional menor que 28 semanas apresentam a doença e, por outro lado, raramente acomete recém-nascido a termo. A incidência de DMH é alterada pela presença de algumas situações clínicas especiais. As situações associadas com aumento da incidência incluem a diabetes materna, história de gestação anterior de parto prematuro e DMH, hemorragia materna pré-parto, eritroblastose fetal, asfixia neonatal, recém-nascido masculino, cesariana sem trabalho de parto. As situações associadas com uma diminuição da incidência da DMH incluem a raça negra, retardo de crescimento intra-uterino, ruptura prematura das membranas amnióticas e a

doença hipertensiva materna. A corticoterapia pré-natal altera a incidência da DMH por sua ação de indução à produção do surfactante endógeno.^{26,28}

• **Fisiopatologia**

A deficiência do surfactante pulmonar é o fator principal na fisiopatologia da DMH. Esta deficiência ocasiona um aumento das forças que tendem a colapsar os alvéolos no final de cada expiração e um aumento significativo do trabalho dos músculos respiratórios para expandir os alvéolos a cada inspiração. As atelectasias progressivas e difusas ocorrem e causam uma diminuição da capacidade funcional residual e, conseqüente, curtos-circuitos direito-esquerda. A fadiga das fibras dos músculos do diafragma é outro componente que contribui para a hipoventilação e a progressão de piora do quadro clínico. A hipoxemia e a acidose perpetuam e agravam este ciclo vicioso.^{3,26,28}

• **Apresentação Clínica**

Os prematuros afetados pela DMH apresentam desde o nascimento um padrão respiratório alterado e evoluindo precocemente para dificuldade respiratória. A apnéia precoce e intensa, a incapacidade do estabelecimento de uma ventilação adequada são características dos prematuros de muito baixo peso. Nos prematuros maiores, a DMH pode ter início mais insidioso, mas,

geralmente, o quadro de dificuldade respiratória está presente nas primeiras 6 horas de vida.

Os achados clínicos incluem o gemido expiratório, o batimento da asa nasal, as retrações torácicas, a taquipnéia, a entrada de ar diminuída nos pulmões à ausculta e as necessidades aumentadas de oxigênio. Há um agravamento progressivo da doença até o 3º dia de vida. Com o aumento da produção endógena de surfactante, a partir do 4º dia de vida, o quadro clínico gradativamente melhora.

O quadro clínico e a evolução típica da DMH são modificados pelas intervenções precoces como a instilação do surfactante pulmonar exógeno, a instituição de pressão positiva contínua de via aérea através de peça nasal e de ventilação mecânica.^{26,28}

• **Prevenção**

A prevenção primária da DMH seria pelo desenvolvimento de tratamentos que prolonguem a gestação até o amadurecimento do sistema surfactante fetal. Entretanto, poucos avanços terapêuticos efetivos têm ocorrido nessa área ao longo dos anos.

A partir da década de 70, diversos estudos comprovaram a eficácia da corticoterapia pré-natal na prevenção da DMH. Em 1994, ocorreu a reunião de consenso patrocinada pelo National Institute of Health dos EUA, que ratificou a indicação da corticoterapia na prevenção da DMH.^{29,30}

A prevenção pós-natal com surfactante pulmonar exógeno não é uma medida eficaz na diminuição da incidência da DMH. Por outro lado, o uso profilático de surfactante no prematuro com menos de 28-30 semanas de idade gestacional pode estar associado à diminuição da mortalidade neonatal.³⁰

• Tratamento da DMH com Surfactantes Exógenos

As primeiras tentativas do emprego de substâncias com atividade surfactante para o tratamento da DMH ocorreram nos anos 60. Essas tentativas falharam, pois as substâncias usadas como substitutas do surfactante tinham a capacidade de diminuir a tensão superficial na interface ar-líquido, mas careciam da característica fundamental do surfactante pulmonar que é a de diminuir a tensão superficial para valores mínimos, à medida que a área da superfície é reduzida, como o que acontece no final da expiração nos alvéolos.¹

O primeiro relato com êxito de série de casos de DMH tratados com surfactante exógeno deu-se em 1980 por Fujiwara(10). A intensa pesquisa laboratorial que precedeu essa publicação foi multiplicada pelos incontáveis trabalhos clínicos sobre o tratamento da DMH com diferentes tipos de surfactantes exógenos.³¹⁻³³

A terapia de reposição com o surfactante exógeno revolucionou o tratamento da DMH. Os trabalhos iniciais que compararam o uso de surfactantes exógenos com o placebo evidenciaram uma diminuição da mortalidade de até 40%. A aprovação e a liberação do uso dos surfactantes

exógenos para o tratamento da DMH pelo Food Drug Administration (FDA) foi o responsável pela maior diminuição dos índices de mortalidade infantil em um único ano nos EUA.^{32,34}

Compararam-se os diferentes tipos de surfactantes e evidenciou-se melhor resposta dos extratos de origem animal quando cotejados com o único produto sintético então comercialmente disponível. A comparação entre os surfactantes naturais mostrou uma resposta semelhante, mas mais rápida com o surfactante de origem porcina.

A instilação precoce do surfactante nos prematuros afetados com a DMH foi comparada com o tratamento tardio, após a doença ter atingido determinados parâmetros de gravidade. Associou-se o tratamento precoce com menor mortalidade e diminuição na incidência de pneumotórax. A instilação profilática de surfactante para todos os prematuros com risco de apresentar a DMH é uma estratégia efetiva, mas tem um custo elevado, pois implica em tratamento desnecessário de uma parcela significativa de pacientes que não têm deficiência de surfactante.^{34,35} A estratégia mais adequada seria a que combinasse os efeitos positivos da instilação profilática com os da instilação seletiva, sem aumentar os custos oriundos de tratamentos desnecessários. Para esse fim é necessário um teste para avaliar a presença da deficiência do sistema surfactante nos prematuros com risco de desenvolverem a DMH. Esse teste deveria possuir determinadas qualidades para ter utilidade clínica. Um teste que apresentasse simplicidade na sua realização, baixo custo, capacidade de ser feito na própria unidade a qualquer hora, sensibilidade e especificidade

elevadas seria o ideal. Fiori et al. demonstraram que o teste das microbolhas estáveis realizado no aspirado de secreção gástrica dos prematuros apresenta todos esses atributos.^{26, 36, 37}

1.4.2 Proteinose Alveolar Pulmonar Congênita

A proteinose alveolar pulmonar congênita é uma afecção pulmonar muito rara. Os recém-nascidos acometidos por essa doença apresentam sintomas de dificuldade respiratória logo após o nascimento com quadro pulmonar clínico e radiológico semelhantes à DMH. Apesar das tentativas de tratamento com doses múltiplas de surfactante e com o uso da membrana oxigenadora extracorpórea, todos os casos foram fatais.³⁸ O material proteináceo desses pacientes é rico em SP-A e SP-C e pobre em fosfolipídios. Os corpúsculos lamelares presentes nas células alveolares tipo II são defeituosos e a mielina tubular está ausente. A formação dos corpúsculos lamelares e da mielina tubular são essenciais para a função surfactante e depende da presença da SP-B. A ausência congênita da SP-B é a causa primária da proteinose alveolar pulmonar e a mutação genética responsável por esta deficiência foi descrita por Lin.³⁹

1.5 Doenças Associadas à Alteração da Função do Surfactante Pulmonar

1.5.1 Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) e Hipertensão

Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN)

A síndrome da angústia respiratória aguda caracteriza-se por apresentar edema pulmonar não-cardiogênico e hipoxemia refratária. Inicialmente descrita em adultos, também ocorrem quadros respiratórios semelhantes no período neonatal. Na asfixia neonatal, o edema pulmonar muitas vezes presente é secundário à insuficiência cardíaca, mas alguns RN a termo apresentam um quadro de insuficiência respiratória muito semelhante ao da SARA, e uma alteração da função do sistema surfactante pulmonar pode estar envolvida na fisiopatologia dessa afecção.

A hipertensão pulmonar persistente neonatal é a principal causa da insuficiência respiratória hipoxêmica severa e caracteriza-se pelas pressões supra-sistêmicas na artéria pulmonar. Na maioria dos casos não é uma doença e sim o resultado de uma complexa interação fisiopatológica. A DMH, síndrome da aspiração de mecônio (SAM), hérnia diafragmática congênita, hipoplasia pulmonar, pneumonia, septicemia e algumas cardiopatias congênitas são as doenças que freqüentemente apresentam a HPPN como complicação.⁴⁰⁻⁴⁴

• Tratamento da SARA e da HPPN com Surfactante Pulmonar

Diversas pesquisas laboratoriais investigaram a função do surfactante nessas situações. A albumina é uma das substâncias possivelmente implicada na inibição do surfactante em muitas dessas patologias e tem sido estudada mais exaustivamente.

O uso clínico do surfactante para o tratamento dessas afecções não tem a aprovação do órgão de controle de drogas dos EUA, o Food and Drug Administration (FDA). Apesar disso, é prática em muitas unidades neonatais a instilação de surfactante na tentativa de se obter uma resposta positiva nesses pacientes gravemente comprometidos.^{33,41-44}

1.5.2 Pneumonia Neonatal

A infecção pulmonar neonatal é uma doença muito grave com alta mortalidade. O recém-nascido pode adquirir infecções pulmonares, geralmente por via ascendente dos germes presentes no canal de parto no período neonatal imediato ou através de processos invasivos como a intubação traqueal em pacientes em ventilação mecânica. As pneumonias causadas pelo *Estreptococo β-hemolítico* do grupo B são as mais estudadas por ser esta a bactéria muito prevalente nas gestantes e causar quadros fulminantes. Os prematuros são os mais acometidos e podem nascer apresentando um quadro de septicemia grave ou rapidamente evoluírem para isso.

No intuito de melhorar o prognóstico reservado desses pacientes, fizeram-se estudos não controlados, instilando o surfactante exógeno, tanto em prematuros como em recém-nascido a termo. O resultado foi positivo, principalmente nos prematuros com pneumonia por *Estreptococo β-hemolítico* do grupo B. Entretanto, a resposta é menor do que nos casos de DMH.^{45,46}

1.5.3 Hemorragia Pulmonar

A hemorragia pulmonar é uma complicação freqüente no curso do tratamento da DMH. Sua incidência é estimada em 3 a 5% dos prematuros ventilados para DMH. A instilação de surfactante exógeno, principalmente a formulação sintética, aumentou a incidência. Essa incidência maior de sangramento parece estar relacionada com o aumento abrupto da perfusão pulmonar causada pela rápida queda da resistência da artéria pulmonar após a instilação do surfactante.

Alguns componentes do sangue como a hemoglobina e a albumina são potentes inibidores do surfactante endógeno. Portanto, a hemorragia pulmonar após instilação de surfactante poderia neutralizar a ação benéfica do mesmo. Porém, o tratamento da hemorragia pulmonar com surfactante exógeno, em um estudo não controlado, apresentou uma resposta positiva, mesmo para aqueles pacientes nos quais o sangramento ocorreu após a instilação do surfactante.⁴⁷

1.5.4 Síndrome da Aspiração de Mecônio (SAM)

A Síndrome da Aspiração de Mecônio é uma das causas mais importantes de morbidade respiratória no período neonatal.⁴⁸ A presença de líquido amniótico meconial (LAM) ocorre em cerca de 5 a 20% dos partos, e, aproximadamente 6% desses RN desenvolvem a SAM.^{49,50} Em 1990, Ribeiro et al. demonstraram que dos recém-nascidos do Hospital São Lucas da PUCRS, banhados em líquido meconial espesso, 30% foram admitidos na UTI-Neonatal e destes de 12% evoluíram para óbito.⁵¹ O risco estimado de um recém-nascido apresentar algum tipo de desconforto respiratório aumenta em cem vezes, se ocorrer a passagem de mecônio intra-útero.⁴⁹ Alguns dos fatores associados à SAM incluem mecônio espesso, sofrimento fetal com escore de Apgar <7, pH < 7,15 na artéria umbilical e parto domiciliar.^{48,52} A SAM grave é uma das principais indicações de uso de membrana de oxigenação extracorpórea (extracorporeal membrane oxygenation - CMO).⁵³ Este tratamento é extremamente oneroso, invasivo e não está disponível em nosso meio.

Nos últimos anos, tem ocorrido uma significativa redução da incidência de SAM. Dados recentes da Oceania mostram uma incidência de 0,35 casos/1000 recém-nascidos vivos. Esta redução parece estar relacionada a uma maior intervenção obstétrica, especialmente evitando-se a pós-maturidade e partos prolongados e difíceis.⁵⁴ Esta mesma tendência aconteceu ao longo da última década em nosso serviço. Nos últimos 12 anos, ocorreram 156 internações por SAM na UTI Neonatal do Hospital São Lucas - PUCRS e com uma taxa de mortalidade de 12,8%. No período de 1997-2002, dos 109 casos

de SAM, 18 (16,5%) evoluíram para o óbito, enquanto no período de 2003-2008 apenas de 2 de 49 (4%) evoluíram para óbito. Ou seja, 90% das mortes por SAM ficaram concentrados nos primeiros 6 anos deste levantamento realizado. Na figura 3, evidencia-se a diminuição estatisticamente significativa dos números de casos de SAM no decorrer destes últimos 12 anos no HSL-PUCRS.

O manejo clínico da SAM continua um desafio para os neonatologistas. Muitas modalidades terapêuticas têm sido estudadas para o tratamento da SAM, entre elas drogas antiinflamatórias, ventilação de alta frequência, drogas vasodilatadoras, óxido nítrico, ventilação líquida com perfluorocarbono e alcalinização. A maioria dos recém-nascidos com SAM grave recebe surfactante, ventilação de alta frequência ou óxido nítrico. Entretanto, nenhuma dessas terapêuticas mostrou-se muito eficaz no manejo da SAM.^{55,56}

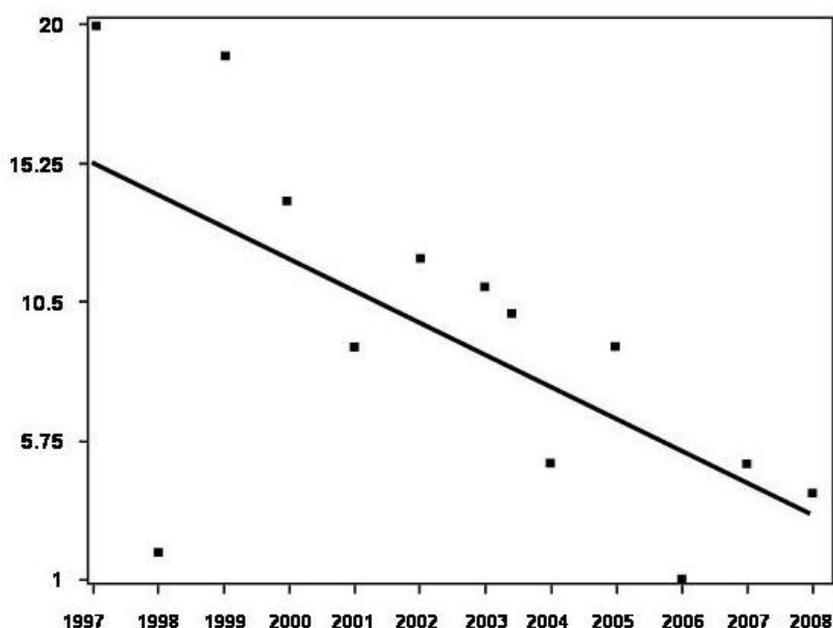


Figura 3 - Incidência da Síndrome de Aspiração de Mecônio HSL- PUCRS, 1997-2008 (correlação de Pearson de 0,73, $p= 0,027$).

Quadro Clínico

O quadro clínico típico de SAM é o de um recém-nascido com características físicas de pós-maturidade e manifestações variadas de hipóxia perinatal.⁵² A dificuldade respiratória engloba desde uma disfunção respiratória leve até um quadro de insuficiência respiratória hipoxêmica intratável. A impregnação da pele, unhas e coto umbilical pelo mecônio, o aumento do diâmetro ântero-posterior do tórax e a cianose são achados freqüentes. A ausculta pulmonar é inespecífica e pode apresentar estertores difusos e diminuição de murmúrio devido à presença de atelectasia ou pneumotórax. Entre as complicações mais freqüentes e graves destacam-se o pneumotórax e a hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (HPPRN), que é observada em mais da metade dos pacientes com SAM grave. Outros achados diversos relacionados à asfixia podem ser encontrados, entre eles a hipotensão, coagulação intravascular disseminada, acidose metabólica, anemia, insuficiência cardíaca, crises convulsivas.^{49,57} Radiologicamente, o pulmão na SAM apresenta-se com opacidades grosseiras, áreas de consolidação alternadas com áreas de hiperinsuflação. A presença pneumotórax ou de derrame pleural são achados relativamente freqüentes.

Fisiopatologia

O mecônio aparece pela primeira vez no íleo fetal, entre a décima e a décima-sexta semana de gestação. O mecônio é um líquido viscoso e

esverdeado composto por secreções gastrointestinais, restos celulares, sucos gástrico e pancreático, muco, sangue, lanugo e vérnix caseoso. A água corresponde a 72 a 80% de seu peso. A composição do seu peso seco consiste de mucopolissacarídeos e, em menor quantidade, de proteínas e lipídios. Apesar do mecônio intestinal aparecer bem precocemente no intestino fetal, a presença de mecônio no líquido amniótico raramente ocorre antes das 38 semanas de gestação.⁵⁸

A passagem de mecônio, documentada por presença de substâncias como a fosfatase alcalina no líquido amniótico, ocorre até a 20ª semana de gestação quando ocorre a inervação do esfíncter anal.⁵⁹ Estudos realizados com ecografia evidenciaram que a passagem de mecônio é um fenômeno fisiológico e muito mais freqüente do que se pensava, e ocorre, principalmente, entre a 20ª e 34ª semana de gestação.⁶⁰ Em muitos casos de RN a termo ou pós-termo, a passagem de mecônio ocorre naturalmente pela maturação da peristalse do trato gastrointestinal, pela compressão abdominal durante o trabalho de parto e pelo relaxamento do esfíncter anal secundário ao reflexo vagal desencadeado pela compressão do pólo cefálico. Porém, em muitas situações a passagem de mecônio decorre do aumento no peristaltismo intestinal e no relaxamento do esfíncter anal secundários à hipoxemia e sofrimento fetal.⁶¹ Entre os antecedentes maternos mais freqüentemente observados estão a hipertensão arterial, doença cardiovascular ou pulmonar crônica, hipotensão aguda, descolamento prematuro de placenta, placenta

prévia, parto laborioso, presença de circular, prolapso ou nó de cordão e apresentação pélvica.⁶²

A fisiopatologia da SAM está relacionada à obstrução de pequenas vias aéreas por partículas de mecônio, à pneumonite química, à reação inflamatória e à inibição do surfactante alveolar.⁵⁸ (Figura 4). A obstrução da via aérea distal por partículas de mecônio ocorre na primeira hora de sua instilação. A presença de mecônio nas vias aéreas inferiores causa uma obstrução completa ou parcial da via aérea. A obstrução completa causa atelectasias alveolares. A obstrução parcial gera um mecanismo valvular que permite a entrada do ar na inspiração, mas não sua saída na expiração e, como consequência, causa o alçapamento de ar no pulmão. Esse aprisionamento progressivo do ar nestas unidades alveolares aumenta o risco de pneumotórax e associadas as atelectasias de outras porções do pulmão causa uma alteração da relação ventilação-perfusão resultando em hipoxemia e acidose respiratória.⁶³ Outro mecanismo de lesão pulmonar observado na SAM é a distensão irregular dos espaços aéreos terminais pela ventilação mecânica com volumes correntes altos. Essa distensão alveolar causa falência celular por estresse, semelhante à da síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). Também, a exposição do alvéolo a altas concentrações de oxigênio pode aumentar a permeabilidade da membrana alvéolo-capilar piorando a insuficiência respiratória.

O processo inflamatório tem um papel importante na fisiopatogenia da SAM. A presença de um aumento do número total de células inflamatórias e da atividade da mieloperoxidase, a liberação de radicais livres do oxigênio e

aumento na produção de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral alfa , interleucinas 1b, 6 e 8 foram demonstrados em modelos experimentais de SAM.^{63,64} Apesar de haver diversos estudos tentando elucidar os mecanismos inflamatórios na SAM, a extensão e a significância da inflamação no tecido pulmonar no desencadeamento e na gravidade da SAM ainda são pouco conhecidas.

A inibição da função surfactante pelo mecônio é outro mecanismo provável de causar lesão pulmonar. Luz et al. e Fiori et al. observaram o marcado efeito inibitório que quantidades diminutas de mecônio exercem sobre a atividade do surfactante avaliado através do teste das microbolhas estáveis.^{65,66}

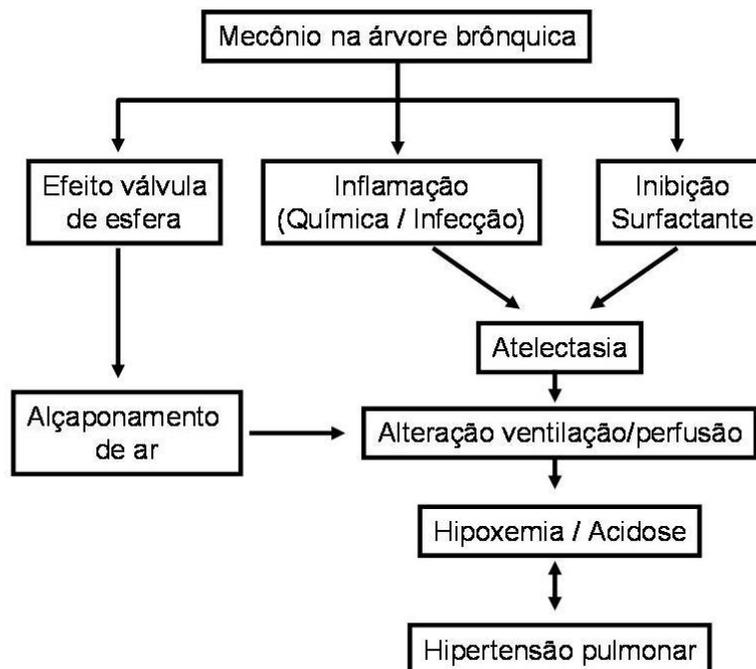


Figura 4. Fisiopatologia da Síndrome de Aspiração de Mecônio

Achados Histopatológicos

As partículas de mecônio produzem obstrução mecânica da via aérea distal, resultando em hiperinsuflação pulmonar e atelectasias localizadas. Com a progressão da doença, aparecem a pneumonite química e o edema intersticial, que aumentam o quadro obstrutivo. Nesse estágio, persiste a hiperinsuflação e as áreas de atelectasia tornam-se mais difusas. Ocorre infiltração do septo alveolar por neutrófilos ativados. Estes liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e enzimas proteolíticas, as quais tem um papel importante na lesão alvéolo-capilar. Gradualmente, ocorre necrose do epitélio alveolar e acúmulo de restos protéicos e sangue dentro dos alvéolos.

Prevenção

Desde a década de 70, pensava-se que a aspiração do líquido amniótico meconial ocorria, na maioria dos casos, nos primeiros movimentos respiratórios após o nascimento. Em 1974, Gregory et al. sugeriram que a intubação e aspiração traqueal logo após ao nascimento melhorava o prognóstico da SAM. Dois anos após, foi sugerida que a realização da aspiração da nasofaringe antes do desprendimento dos ombros e antes do primeiro movimento respiratório poderia resultar na diminuição da SAM. A recomendação vigente até o final dos anos 80 foi que em todo parto com líquido amniótico meconial

(LAM) deveria haver uma combinação da aspiração da orofaringe pelo obstetra seguida pela intubação e aspiração da traquéia pelo neonatologista.⁶⁷

Em 1988, o grupo liderado por Linder demonstrou que a intubação seletiva de RN com presença de LAM e com escore de Apgar > 8 não era necessária.⁶⁸ Estes resultados foram contestados e tiveram uma resistência inicial por parte dos neonatologistas norte-americanos.⁶⁹ Na última década, estudos multicêntricos prospectivos envolvendo um número significativo de pacientes e revisões sistemáticas confirmaram a futilidade, segundo Linder e al., da intubação imediata após o nascimento de todo recém-nascido na presença de LAM.^{70,71} E em 2002, Vain et al. evidenciaram que a aspiração rotineira intraparto da oro-nasofaringe não previne a ocorrência de SAM.⁷²

A amnioinfusão, que consiste na infusão de solução salina aquecida na cavidade amniótica, já foi descrita como muito útil na prevenção da asfixia perinatal e da SAM. Entretanto, em um recente ensaio clínico randomizado multicêntrico não foi observada redução na incidência de SAM ou morte perinatal.⁷³

Tratamento

O manejo clínico da SAM nos casos leve a moderados consiste no tratamento da insuficiência respiratória hipoxêmica. Todos os recém-nascidos com desconforto respiratório devem ser internados em uma UTI neonatal para observação e monitoração. O controle térmico, manutenção da pressão arterial,

infusão de glicose e hidratação são fundamentais no manejo do recém-nascido com SAM. O uso de antibioticoterapia é controverso, mas costuma ser recomendado devido a gravidade do quadro e dificuldade de exclusão de processo infeccioso. O mecônio nas vias aéreas aumenta a colonização por germes, especialmente gram negativos.

Inicialmente, a maioria dos recém-nascidos com SAM é colocada em oxigenoterapia. A saturação da hemoglobina deve ser mantida acima de 92-95%, idealmente, avaliada pré e pós-ductal para diagnóstico de hipertensão pulmonar persistente severa com curto circuito da direita para a esquerda (D-E). A ventilação mecânica é necessária em cerca de 50% dos casos de SAM. A ventilação convencional ou de alta frequência têm sido empregadas com sucesso semelhante.⁴⁹

Muitos casos de SAM apresentam hipoxemia refratária ao tratamento convencional. Em 1992, foi demonstrada a eficácia do óxido nítrico inalatório no tratamento na SAM associadas ou não a HPPRN, reduziu a indicação de ECMO.⁴⁴ Ao longo da última década houve uma redução significativa no número de casos de SAM que foram tratados com ECMO. Segundo os dados da Extracorporeal Life Support Organization Neonatal Registry desde 1992 a 2002 houve uma redução de 66% do número de casos de SAM tratados com ECMO, de 540 para 179 respectivamente.⁷⁴

O uso de surfactante exógeno para o tratamento da SAM não obteve o mesmo sucesso encontrado com a doença da membrana hialina.⁶² Estudos

iniciais mostraram resposta em parâmetros fisiológicos. Findlay et al. realizaram um ensaio clínico randomizado controlado com placebo envolvendo 40 recém-nascidos com SAM grave. Nesse estudo, o surfactante (Survanta®) foi infundido continuamente pelo tubo endotraqueal durante 20 minutos, precocemente na presença de quadro de insuficiência respiratória, sendo administradas três doses de 150mg/kg a cada 6 horas. Foram observadas melhora na oxigenação arterial, diminuição de escape de ar, redução na necessidade de ECMO, duração da ventilação mecânica e necessidade de oxigênio quando comparado ao placebo. Foi sugerido que a resposta parcial à primeira dose deve-se à inativação do surfactante pelo mecônio presente na via aérea. As doses subseqüentes superariam essa inibição e ficariam depositadas na superfície alveolar, restabelecendo o surfactante na superfície ar-líquido e melhorando a oxigenação.⁷⁵

Lotze et al realizaram um ensaio clínico randomizado multicêntrico envolvendo 44 centros e 328 recém-nascidos a termo com SAM e HPPN tratados com quatro doses de Survanta®, 100mg/kg a cada 6 horas ou placebo com ar. Houve uma redução de 41% na indicação de ECMO no grupo que utilizou surfactante.⁴⁰

Em 2005, o Estudo Colaborativo Chinês avaliou a segurança e eficácia do surfactante (Curosurf®) em 61 recém-nascidos a termo ou próximo do termo com SAM e necessidade de ventilação mecânica por mais de 1-2 horas e IO > 15. Os pacientes recebiam uma dose inicial de 200mg/kg seguida de doses repetidas de 200, 100 e 100 mg/kg em intervalos de 6-12 horas. O grupo

controle recebeu placebo com ar. Houve uma modesta melhora na oxigenação nos pacientes submetidos ao tratamento com surfactante em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na duração média de ventilação mecânica, incidência de complicações maiores ou mortalidade entre os grupos.⁷⁶

Recentemente, Maturana et al realizaram um ensaio clínico multicêntrico no Chile com o objetivo de avaliar o efeito de até três doses de surfactante (Survanta®) 150mg/kg em 57 recém-nascidos com SAM moderada. Foram incluídos recém-nascidos com concentração de oxigênio em câmbula de mais de 50% ou IO > 8 se o paciente já estivesse em ventilação mecânica. Os autores observaram que houve redução no número de dias em ventilação mecânica no grupo que recebeu surfactante.⁷⁷

Em duas recentes revisões sistemáticas, observou-se que não houve redução de mortalidade com o uso de surfactante na SAM, mas pode haver uma redução da gravidade da doença e uma diminuição no número de recém-nascidos que evoluem com insuficiência respiratória e necessidade de ECMO.^{78,79} Academia Americana de Pediatria recomenda a instilação de surfactante exógeno no tratamento da SAM que necessita ventilação mecânica e a administração de doses repetidas.³³

Recentemente, a lavagem bronco-alveolar (LBA) com surfactante diluído tornou-se mais uma alternativa para o tratamento da SAM e é uma das linhas de pesquisa de nosso laboratório experimental.^{62,80,81} Lam et al., em um estudo piloto, demonstraram uma melhora do IO, diminuição da pressão média de via

aérea, diminuição da necessidade de oxigênio e melhora do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (A-a DO₂) dentro de 48 h.⁸² Wiswell et al., realizaram um estudo piloto aberto, multicêntrico, randomizado e controlado avaliando o efeito do LBA na SAM com um surfactante artificial que contém um peptídeo similar à SP-B (Lucinactant®). O procedimento foi considerado seguro e houve uma tendência do grupo do LBA ter um desmame mais precoce da ventilação mecânica e uma diminuição do IO nas primeiras 96 horas.⁸³ Em 2007, Dargaville et al. publicaram um estudo multicêntrico em recém-nascidos com aspiração de mecônio grave tratados com LBA.⁸⁴

1.6 Testes para Avaliar a Maturidade da Função Surfactante Fetal

A descoberta por Adams, em 1965, da presença do surfactante pulmonar no líquido amniótico de ovelhas abriu a possibilidade para se correlacionar a presença desse material no líquido amniótico com a maturidade pulmonar. Muitos testes para avaliação da maturidade pulmonar fetal surgiram a partir da década de 70.⁸⁵

Esses testes foram um marco na história da obstetrícia, pois possibilitaram aos clínicos a interrupção prematura e segura de gestações de alto risco. Antes do advento desses testes, os obstetras temiam a retirada de um feto prematuro devido à alta morbidade e mortalidade dos prematuros afetados com a DMH. Nesse período a neonatologia engatinhava, e as

primeiras unidades de cuidados intensivos neonatais começavam a proliferar nos EUA. Com os avanços da terapia intensiva e do uso de surfactante exógeno a partir do início dos anos 90, a utilidade dos testes de dosagem do surfactante no líquido amniótico diminuiu muito, na medida em que houve uma acentuada melhora nos índices de morbidade e mortalidade neonatais.³

Esses testes podem ser divididos de maneira didática em dois grupos. No primeiro encontram-se os testes que dosam a presença de material surfactante no líquido amniótico e no segundo os que testam a função surfactante presente nesse líquido.

Os testes de dosagem incluem entre outros a relação lecitina/esfingomielina, a dosagem da fosfatidilcolina saturada, a dosagem do fosfatidilglicerol, o perfil dos fosfolípidios, a dosagem das proteínas específicas do surfactante e a contagem de corpos lamelares. A relação lecitina/esfingomielina foi o teste mais utilizado, sendo substituído, posteriormente, pelo teste do perfil de fosfolípidios que é mais acurado.⁸⁶

A contagem dos corpos lamelares (CCL) é um método amplamente utilizado para avaliar a maturidade da função surfactante em líquido amniótico. A contagem é realizada através do canal de plaquetas de contadores automáticos de células, pois os corpos lamelares tem dimensões semelhantes ao das plaquetas. Em nosso laboratório, confirmamos sua utilidade na avaliação da maturidade pulmonar em líquido amniótico e, com ineditismo, em secreção gástrica logo após o nascimento.⁸⁷⁻⁸⁹

Os testes de função surfactante no líquido amniótico baseiam-se na capacidade dessa substância de diminuir a tensão superficial na interface ar-líquido.

Teste de Clements: foi o mais utilizado na prática obstétrica. Realizava-se com a adição de partes iguais de líquido amniótico e etanol a 95%. A função do etanol era de reduzir o número de bolhas, só permanecendo aquelas que tenham uma substância com ação surfactante mais poderosa. Agitava-se a mistura vigorosamente por 15 segundos e lia-se o teste após 15 minutos. A presença e distribuição das bolhas de ar, vistas a olho nu, determinam a positividade do teste.⁸⁵

Teste do Clique: desenvolvido por Pattle, quando se realizavam as primeiras pesquisas sobre o surfactante pulmonar. Baseia-se no fenômeno do clique, que consiste na expansão e contração repentinas e repetitivas das bolhas em contato com a água desaerada. A presença de material surfactante pulmonar é essencial para que isso ocorra. Esse fenômeno é visto ao microscópio e sua presença indica um resultado positivo.^{4,36,90}

Teste das Microbolhas Estáveis: também desenvolvido por Pattle, depende da capacidade do surfactante de formar bolhas estáveis muito pequenas, as microbolhas.^{4,6}

Esses testes de função surfactante podem ser realizados tanto em líquido amniótico como em secreções gástricas ou aspirados traqueais obtidos de prematuros logo após o nascimento. Na era pós-surfactantes exógenos

comerciais, houve o recrudescimento do interesse pelo TME, que pode ser utilizado para identificar os prematuros com dificuldade respiratória, deficientes de surfactante pulmonar, somando as vantagens do tratamento profilático e precoce do surfactante exógeno com o menor custo financeiro. O TME tem sido um dos testes utilizados por diversos autores para avaliar a função dos surfactantes exógenos *in vitro*.^{3,65,66} O TME está integrado na nossa rotina de atendimento ao recém-nascido prematuro na UTI Neonatal Hospital São Lucas da PUCRS, sendo inclusive citado no Consenso Europeu de Diretrizes no Manejo da Síndrome do Desconforto Respiratório.^{37,91-94}

1.7 Testes para Avaliar a Função Surfactante em Laboratório

1.7.1 Avaliação da Função Surfactante *in vivo*

A avaliação da função surfactante no espaço aéreo pulmonar pode ser feita de muitas maneiras. Desde o trabalho inicial de von Neergaard foram utilizadas as curvas de pressão-volume obtidas em preparados de pulmão isolado. von Neergaard e mais tarde Mead mostraram as diferentes curvas de pressão-volume geradas quando instilados com líquido ou insuflados com ar os pulmões retirados de animais. A técnica evoluiu, possibilitando a realização dessas curvas de pressão-volume pulmonares em pequenos animais vivos

ventilados, sendo os coelhos os mais utilizados, por terem uma gestação muito curta.³

Através da lavagem bronco-alveolar com solução salina, o pulmão torna-se deficiente em surfactante alveolar. Diversas substâncias podem ser instiladas e suas curvas de pressão-volume medidas e comparadas com as obtidas com o surfactante pulmonar natural. Nesses casos o que se mede é a complacência pulmonar, que é derivada diretamente das curvas de pressão-volume. A complacência pulmonar é igual à alteração do volume pulmonar por unidade de pressão. Quanto maior for a complacência pulmonar, maior será o volume de ar enviado aos alvéolos por unidade de pressão. Sabe-se que a tensão superficial na interface ar-líquido alveolar é um dos componentes fundamentais da complacência pulmonar. A complacência pulmonar pode ser medida de maneira dinâmica durante todo o ciclo respiratório, ou de maneira *quasi*-estática, quando o pulmão é insuflado/desinflado parcialmente e, a cada variação de volume, as pressões são medidas em “equilíbrio”. A vantagem dessa técnica é a reprodução da complexa interação entre a substância testada e as substâncias presentes nos alvéolos combinadas com as forças elásticas e resistivas próprias do pulmão.

Os experimentos *in vivo* possibilitam averiguar através de estudos histopatológicos as reações biológicas que ocorrem ao nível do parênquima pulmonar, quando essas substâncias são instiladas. Os experimentos em animais são essenciais para avaliação completa de qualquer substância com atividade surfactante que tenha demonstrado efetividade *in vitro*. É a etapa final

dos experimentos laboratoriais, antes que essas substâncias sejam testadas em ensaios clínicos com humanos.³

1.7.2 Avaliação da Função Surfactante *in vitro*

• Balança de Langmuir-Wilhelmy Modificada

O primeiro instrumento para avaliar a função do surfactante pulmonar foi a balança de Langmuir-Wilhelmy. É uma balança especial para medir a tensão superficial de uma superfície ar-líquido. Mede-se a tensão superficial de duas maneiras dependendo do modelo de balança. Uma é através do peso exercido por uma placa na superfície do líquido. Assim que a placa é colocada sob a superfície, as forças são medidas por um transdutor de pressão, até o ponto em que a placa rompe a película da monocamada. A outra maneira é observando a altura do menisco formado entre o líquido, a placa imersa e o ar. Compõe-se a balança de uma cuba especial recoberta com teflon (cuba de Langmuir) e uma pequena placa de imersão (placa de Wilhelmy), conectada a um transdutor de pressão. A cuba possui um dispositivo pelo qual se pode diminuir sua área e, conseqüentemente, comprimir a monocamada da interface ar-líquido (Figura 5).⁹⁵

As características positivas das balanças de Langmuir-Wilhelmy incluem a de ser uma técnica simples, oferecer controle exato da quantidade de surfactante na superfície, permitir muitos testes em um curto período de tempo e avaliar em separado os efeitos da adsorção e os da expansão/compressão do filme surfactante. Essas balanças encontram-se disponíveis comercialmente.

As características negativas incluem o escape do filme de surfactante nas bordas da cuba, os ciclos de expansão/compressão dos filmes serem lentos, a necessidade de grandes volumes de líquidos e principalmente o fato de ser a medida da tensão superficial feita em uma superfície plana (o que não corresponde ao que ocorre nos pulmões).⁹⁵



Figura 5 - Esquema da balança de Langmuir-Wilhelmy. A substância a ser testada é colocada como uma monocamada na superfície de uma solução contida na cuba de Langmuir. A tensão superficial é medida através da placa de Wilhelmy que está conectada a um transdutor de pressão. A área da superfície pode variar com o movimento da barra móvel. <http://ising.phys.cwru.edu/surfactants/measurements.html>

• Surfactômetro da Bolha Pulsante (SBP)

O SBP foi desenvolvido para avaliar a tensão superficial em uma bolha de ar, em vez de se fazer essa medida em superfície plana como na balança de Wilhelmy. O SBP avalia o comportamento de uma bolha pulsante em contato com o ar atmosférico como se essa bolha fosse um alvéolo. Constitui-se de uma câmara especial, onde o líquido a ser testado é colocado, um capilar que conecta a câmara com o ar atmosférico, um transdutor de pressão e uma unidade pulsátil composta de pistão e propulsor. A câmara é colocada em banho-maria para manter a temperatura em 37°C. Uma bolha de ar é introduzida dentro da câmara através do capilar. Uma vez criada a bolha, o movimento do pistão faz com que essa altere seu tamanho. O comportamento da bolha pulsante é, então, observado através de microscópio.^{95,96} (Figura 6)

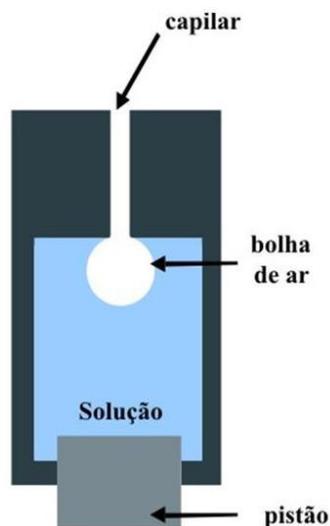


Figura 6 - Esquema do funcionamento do SBP. Uma bolha de 1,1 mm de diâmetro é formada a partir do capilar que está em contato com o ar atmosférico. O movimento do pistão comprime a bolha até um diâmetro de 0,8mm. Os movimentos repetidos do pistão fazem a bolha pulsar.

<http://ising.phys.cwru.edu/surfactants/measurements.html>

raio da bolha expandida e o raio quando esta tem metade do volume original são medidos. O sensor mede diretamente a pressão da solução em torno da bolha. A tensão superficial é calculada pela lei de Laplace, que calcula a tensão superficial em uma superfície esférica. Aplicando-se a equação de Laplace, $\Delta P = 2\gamma/r$, na qual a variação de pressão (ΔP) é a diferença entre a pressão medida no líquido e a pressão atmosférica, “r” é o raio da bolha e “ γ ” é valor da tensão superficial que é a incógnita. O registro simultâneo dos ciclos de compressão/expansão da bolha através de câmeras de vídeo e das medidas de pressão geradas em torno da bolha permite criar curvas relacionando a tensão superficial e a área da superfície da bolha. Esses estudos dinâmicos do comportamento da bolha pulsante aumentam a acuidade e o significado dos resultados obtidos através do SBP.

As vantagens do SBP em relação às balanças de Langmuir-Wilhelmy incluem a medida da tensão superficial numa superfície esférica, os ciclos mais rápidos de expansão/compressão do filme de surfactante, a necessidade de pequenos volumes e, como nas balanças, permite a troca rápida de amostras, o que possibilita a realização de muitos testes num curto intervalo de tempo.

O SBP apresenta algumas dificuldades técnicas como o escape do líquido da câmara, as deformações que a bolha pode sofrer (afastando-se da forma esférica e da aplicação lei de Laplace), a necessidade de vários ciclos para a adsorção adequada do surfactante e a impossibilidade de determinar a concentração do surfactante na interface ar-líquido.^{95,96}

- **Surfactômetro da Bolha Cativa (SBC)**

Esse aparelho é um aprimoramento do surfactômetro da bolha pulsante e baseia-se, portanto, nos mesmos princípios físicos. A diferença é que a bolha pulsante está contida (cativa) na solução dentro da câmara do surfactômetro. Na parte superior dessa câmara há uma camada curva de gel hidrofílico (de agarose), para que a bolha não fique em contato com a parede superior da câmara (Figura 7). A bolha cativa é filmada, e sua forma é analisada através da relação entre a altura e o diâmetro para o cálculo da tensão superficial.⁹⁵

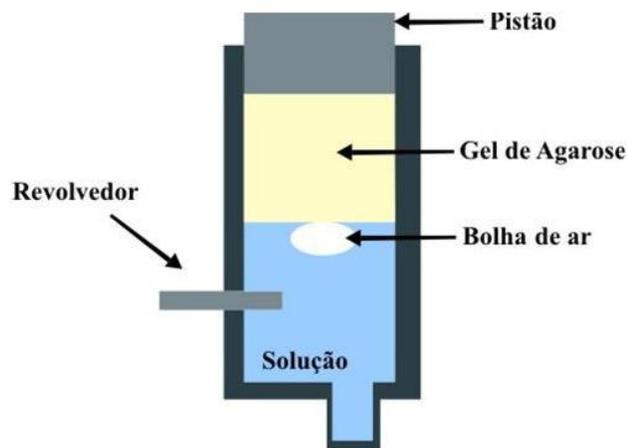


Figura 7 -Esquema do funcionamento do SBC. Uma bolha cativa é colocada dentro do aparelho. O misturador mantém a hipofase constante. O movimento do pistão contrai e distende a bolha.

<http://ising.phys.cwru.edu/surfactants/measurements.html>

O surfactômetro da bolha cativa apresenta algumas vantagens em relação ao surfactômetro das bolhas pulsantes: a ausência de escape da câmara, os ciclos de expansão/compressão mais rápidos e o menor tamanho da câmara.⁹⁷

As desvantagens do SBC incluem a complexidade da análise dos dados, a dificuldade na troca de soluções, a impossibilidade da visualização da bolha pulsante em concentrações de surfactante maiores do que 3mg/ml.

• **Método da Gota de Surfactante**

Esse método baseia-se no seguinte fenômeno: uma gota colocada sobre a superfície de uma interface ar-líquido adquire formas que dependem das interações entre as tensões superficiais geradas entre a gota e o líquido, a gota e o ar e o líquido e o ar. A soma das três tensões superficiais é zero (equilíbrio). Se o volume da gota for constante, seu diâmetro depende da tensão superficial. A tensão superficial é previamente medida através de uma balança de Langmuir-Wilhelmy. Colocam-se essas gotas, então, na superfície de preparados de pulmão que são expandidos e obtêm-se fotos para análise. Não se trata de um método padronizado, mas é uma das poucas tentativas de investigação da função surfactante em nível alveolar.⁹⁵

• Teste das Microbolhas Estáveis (TME)

O Teste das Microbolhas Estáveis foi desenvolvido por Pattle, e foi essencial nos estudos iniciais da descoberta do surfactante pulmonar. O TME baseia-se na capacidade do surfactante de formar bolhas estáveis muito pequenas. A contagem do número de microbolhas estáveis menores que 15 μm feitas no líquido amniótico, secreção gástrica avalia a maturidade pulmonar.^{3,4,6,36,37}

A técnica do TME consiste em obter um volume de 0,04 ml da solução a ser testada. Essa amostra é aerada durante 6 segundos através da aspiração/expulsão com uma micropipeta de Pasteur de 22 cm de comprimento acoplada a uma borracha de pipetar. Quando a técnica é corretamente realizada, produz um som característico. Ao final desse processo de aeração, a lâmina é invertida imediatamente, formando uma gota pendente. Após aproximadamente 4 minutos, faz-se a contagem do número de microbolhas nessa gota pendente através de microscopia de 100 aumentos.

A contagem de microbolhas estáveis é feita sobre a área graduada da lâmina micrométrica. Essa área compõe-se de duas réguas dispostas em cruz. Essas réguas são formadas por barras paralelas com intervalos de 10 μm e têm uma área total de 0,76 mm^2 . As réguas estão desenhadas num disco de vidro muito fino transparente com 1cm de diâmetro colado sobre a superfície da lâmina. São consideradas para a contagem todas as bolhas com diâmetros < 15 μm . As bolhas não esféricas e as que apareciam só como pontos pretos não

se computam. Os resultados das contagens são expressos em microbolhas por mm^2 (mbe/ mm^2). Apresenta como características favoráveis a simplicidade do material necessário, a facilidade para sua realização e a rápida obtenção dos resultados. O TME foi o teste utilizado por diversos autores para avaliar a presença de maturidade pulmonar em líquido amniótico e em aspirado gástrico de RN logo após o parto.^{4,36,37,92}

O TME pode estimar a função dos surfactantes exógenos *in vitro*. Para avaliação da função/inibição de soluções contendo surfactante, o TME sofreu uma adaptação na aeração da amostra. A formação de microbolhas foi realizada através de uma agitação manual (e vigorosa), por 30 segundos, da solução contida em um tubo de Ependorf.^{3,36,65,98}

Em nosso laboratório, o TME foi avaliado em 30 testes de dez diluições de surfactante porcino (Curosurf ®) com soro fisiológico e apresentou resultados muito satisfatórios para avaliar a presença de função surfactante (Figura 8).^{3,65,66}

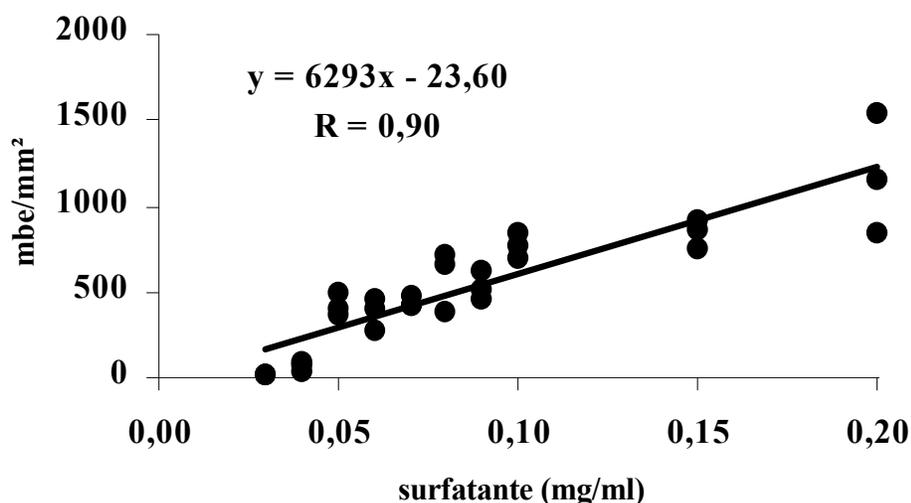


Figura 8 - Relação entre a concentração de surfactante e a contagem de mbe ($p = 0,013$).³

1.8 Inibição/Inativação da Função do Surfactante Pulmonar

Na publicação original sobre a deficiência de surfactante nos prematuros que faleciam de DMH, Avery e Mead já pensavam na hipótese que a presença do transudato proteináceo poderia contribuir para a alteração da função do surfactante.⁷ O conceito de “inativação” do surfactante foi descrito em 1965 por Tierney, e sua provável implicação em muitas doenças pulmonares.⁹⁹ Pesquisas posteriores enfocaram diferentes aspectos da função surfactante, principalmente a ação de substâncias inibidoras da função do surfactante pulmonar. Os primeiros trabalhos nessa área foram relacionados à síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). A semelhança do quadro clínico da SARA com o da doença da membrana hialina neonatal levou os pesquisadores a suspeitarem que houvesse uma deficiência na síntese do surfactante na SARA. Pesquisas subseqüentes não confirmaram uma deficiência, mas sim uma “inativação” do surfactante.^{100,101}

Diversas substâncias capazes de inibir a função do surfactante foram identificadas, entre elas o plasma, a albumina, o fibrinogênio e os monômeros de fibrina, a IgG, a hemoglobina, as fosfolipases, os radicais de oxigênio, o sangue e o mecônio.⁶⁵ Os mecanismos propostos para a inibição do surfactante intra-alveolar são complexos. Tauesch descreveu quatro possíveis mecanismos envolvidos para inibir a ação do surfactante:¹⁰⁰

1) O filme da superfície é diluído ou removido da superfície: o mecanismo mais simples seria o acúmulo de líquido no alvéolo que aumentaria o volume da

hipofase, e, por conseguinte, diminuiria a concentração do surfactante presente na hipofase. Nos casos mais intensos inundaria o espaço alveolar excluindo tanto o surfactante como o ar do espaço aéreo. Fatores mecânicos como a ventilação mecânica, com volumes correntes elevados e pressões baixas no final da expiração, poderiam determinar a exclusão da DPFC da interface ar-líquido. O filme da monocamada pode ser danificado diretamente como na aspiração de hidrocarbonetos ou serem degradados pela ação de fosfolipases ou proteases.¹⁰¹

2) Presença de outra substância com atividade de superfície que desloca ou compete com a DPFC no filme da monocamada: um exemplo seria a interação de ácidos graxos, albumina, lisofosfatidilcolina ou lipopolissacarídeos com o filme de superfície.^{102,103} Estas substâncias ao serem adsorvidas na interface ar-líquido causam um aumento da tensão superficial, e facilitam o colapso da monocamada(100). Muitas destas substâncias estão presentes no mecônio.⁵⁸

3) Por meios físicos: a destruição do filme da superfície é aumentada com temperaturas próximas ao ponto de fusão da DPFC (~42°C). Modificações no pH e na força iônica da hipofase afetam consideravelmente a atividade do filme de superfície.

4) Por diminuição da liberação do surfactante na interface ar-líquido. A ligação dos elementos constituintes do surfactante com determinadas substâncias pode retardar a formação do filme de superfície. Este é o

mecanismo de inativação que ocorre com o fibrinogênio durante a sua polimerização em fibrina.¹⁰⁴

Em nosso laboratório, avaliamos a influência da adição de albumina e sangue a soluções contendo surfactante através do TME. A albumina reduziu a contagem de microbolhas em mais de 84% quando comparado com o controle, independente da concentração analisada (figura 9).⁶⁵ Estes resultados foram reproduzidos por Fiori et al.^{36,98} A adição de sangue inibiu significativamente a contagem de mbe. A contagem foi reduzida em 63% com adição de sangue a 0,5% e em mais de 95% nas demais concentrações (Figura 10).³ Estes resultados foram, também confirmados posteriormente por Fiori et al.⁹⁸

O surfactante sofre inibição de sua função na presença de agentes oxidantes. A superóxido desmutase, enzima neutralizadora de radicais livre de oxigênio, tem um efeito inibidor sobre o surfactante quando instilada experimentalmente no pulmão.¹⁰⁵ A ação inibitória teria um a efeito semelhante a de outras proteínas. A presença de ácidos, com redução do pH, também exerce função inibitória sobre o surfactante pulmonar.¹⁰⁶ Anticorpos monoclonais contra proteínas do surfactante e outras substâncias como a lisofosfatidilcolina também demonstraram efeitos inibitórios em modelos experimentais.^{107,108}

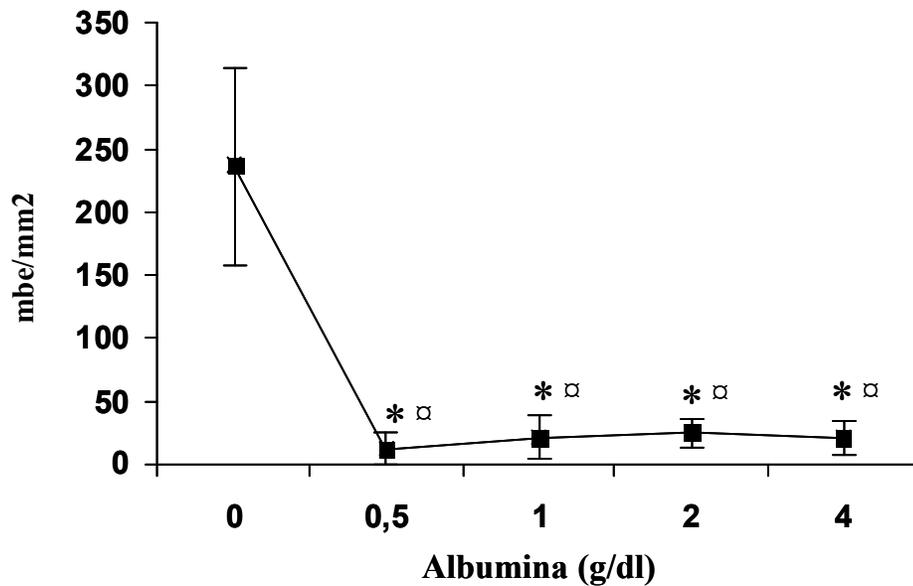


Figura 9 - Inibição do surfactante exógeno pela albumina.
* $p < 0,0001$ entre o controle e as soluções surfactante-albumina.
□ $p = 0,38$ entre as soluções surfactante-albumina.³

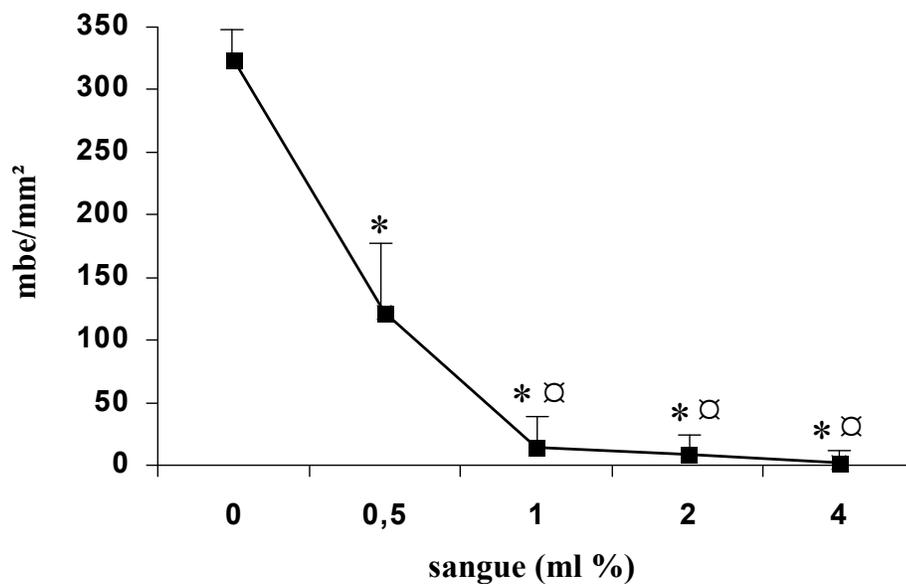


Figura 10 - Inibição do surfactante exógeno pelo sangue. * $p < 0,0001$ entre controle e as soluções surfactante-sangue
□ $p = 0,03$ entre a solução surfactante-sangue a 0,5 ml % e as demais.³

1.9 Inibição/Inativação da função surfactante pela adição de mecônio

A alteração da função do surfactante endógeno na SAM é considerada como um dos componentes fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento da insuficiência respiratória. A inibição do surfactante exógeno pela adição de mecônio está amplamente documentada. Vários constituintes do mecônio podem contribuir para a alteração da função do surfactante. Entre eles estão a bilirrubina, as fosfolipases, as proteínas plasmáticas, os triglicerídeos e os ácidos graxos livres. A inibição do surfactante exógeno por essas substâncias foi avaliada e documentada através de diversos métodos. Os surfactômetros da bolha pulsante e os da bolha cativa foram os mais utilizados.^{109,110} As alterações da função surfactante foram também demonstradas em pulmões excisados de animais de laboratório.^{111,112}

O mecanismo de ação principal da diminuição da atividade do surfactante desencadeada pela presença do mecônio parece ser uma alteração na estrutura do surfactante. O surfactante é composto por pequenos e grandes agregados de material com atividade de superfície. Os grandes agregados (GA) são formados pelos corpos lamelares e pela mielina tubular. Os corpos lamelares, secretados pelos pneumócitos tipo II transformam-se em mielina tubular na hipofase da camada líquida que reveste os alvéolos. A mielina tubular é a percussora do surfactante presente na monocamada da interface ar-líquido alveolar. Os pequenos agregados (PA), vesículas unilamelares, representam o surfactante já utilizado e excluído da monocamada. O mecônio altera a morfologia do surfactante com aumento da proporção de PA e, por

consequente da relação PA/GA. Relação PA/GA elevada é associada com aumento da tensão superficial mínima.^{113,114}

Outros mecanismos implicados na alteração da função do surfactante seriam a inibição competitiva da entrada dos fosfolipídios na monocamada da superfície ar-líquido por substâncias como as proteínas plasmáticas e a infiltração e desestabilização da monocamada por lipídios sem ação surfactante como os ácidos graxos livres.¹⁰⁰ Recentemente, foi demonstrada em recém-nascidos com SAM a importância do edema pulmonar hemorrágico na disfunção do surfactante endógeno.⁶⁴ As características físico-químicas do mecônio como a viscosidade e a capacidade adesiva podem contribuir no processo de inativação do surfactante.¹¹⁵

Luz et al. avaliaram o efeito da adição de mecônio a soluções contendo surfactante porcino (Curosurf®) na contagem de mbe.³ Os testes evidenciaram uma grande inibição na formação de microbolhas com uma redução de 98% na contagem de mbe independentemente da concentração de mecônio utilizada (Figura 11).³ Estes achados foram confirmado por Fiori et al., que testaram a inibição do surfactante com diluições ainda menores de mecônio.⁶⁶

A pesquisa em surfactante pulmonar exógeno tem-se centrado na manufatura de novos compostos artificiais e na adição de substâncias ao surfactante natural, capaz de aumentar a resistência à inibição ou restaurar a função do filme da interface ar-líquido alveolar.

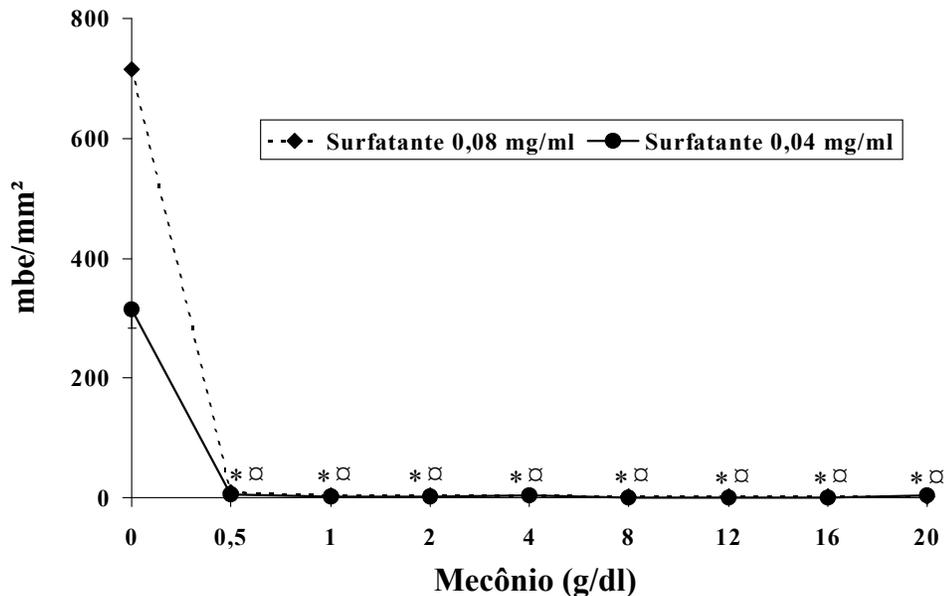


Figura 11 - Inibição do surfactante exógeno pelo mecônio.

* , [□] -p < 0,0001 entre o controle e as soluções surfactante-mecônio.³

1.10 Surfactante Pulmonar: Restauração da Função após inativação/inibição

A capacidade de reverter a inibição do surfactante foi descrita pela primeira vez por Cockshutt et al. em 1990.¹¹⁶ Nesse estudo, a adição de SP-A ao surfactante reverteu a inibição provocada pela adição de proteínas plasmáticas. Esses achados foram confirmados por vários autores, utilizando diferentes técnicas de avaliação da função surfactante.¹¹⁶ Desde o momento em que se identificou a ocorrência da inibição da função surfactante como importantes na

fisiopatologia de diversas afecções e a identificação destas substâncias inibitórias, esforços foram conjugados para descobrir formas de atenuar ou até mesmo reverter esta inibição.^{100,117} O aumento da resistência do surfactante à inibição foi observado inicialmente com a adição de proteínas específicas ao surfactante, SP-A, SP-B e SP-C, as quais pareciam aumentar a adsorção da DPFC ao filme da superfície, através da formação e preservação de grandes agregados de surfactante.

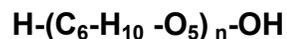
A possibilidade de que o componente carboidrato da SP-A fosse o responsável por essa ação levou diversos autores a testarem compostos como açúcares simples, polímeros de açúcar e outros polímeros não iônicos, na tentativa de suprimir a inibição da ação do surfactante exógeno. Tauesch et al. demonstraram que os polímeros não iônicos, com peso molecular maior que 3,3 kD, eram efetivos na restauração da função surfactante. Neste estudo o dextran e o PEG melhoraram a performance do surfactante (Survanta™) e reverteram a inibição provocada pelo mecônio em concentrações de 1 a 3%. Os polímeros foram testados em diversas concentrações através do surfactômetro de bolha pulsante e em modelo experimental com ratos adultos.¹¹⁸

Os polímeros não iônicos mais pesquisados nas diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* foram o polietilenoglicol PEG e o dextran. Ambos têm excelente compatibilidade biológica e são componentes de diversos produtos farmacêuticos. PEG é utilizado clinicamente como laxativo, para preparação do colon pré-cirúrgico ou endoscopia, em cremes de pele e pastas dentais. Muitas medicações e proteínas, quando associadas ao PEG, têm uma meia vida mais

longa, aumentando o tempo de ação sem aumentar a toxicidade. São exemplos o PEG-interferon alfa para o tratamento da hepatite C e PEG-fator estimulante do crescimento de granulócitos para tratamento neutropenia. O PEG tem a seguinte fórmula química: ¹¹⁹



O dextran é um polissacarídeo ramificado complexo de moléculas de glicose. Tem sido utilizado em diversas situações clínicas como expansor volumétrico em casos de choque hipovolêmico, na profilaxia da trombose venosa em determinados procedimentos cirúrgicos, e como veículo para medicações como o ferro. A fórmula química dodextran é: ¹²⁰



As pesquisas sobre a reversão da inibição do surfactante mostraram uma restauração completa das características surfactantes quando avaliadas pelos surfactômetros da bolha pulsante e o da bolha cativa. Experimentos em animais mostram uma melhora significativa da função pulmonar com a instilação de surfactante associado a polímeros não iônicos. Segundo Lu et al., os polímeros separam os complexos formados entre o mecônio e o surfactante, permitindo

que os componentes do surfactante tenham um acesso facilitado à interface ar-líquido.¹²¹ A restauração da função de diversos surfactantes exógenos, também, foi obtida pela simples modificação do pH das soluções de surfactantes com mecônio.¹²²

A adição do dextran, PEG e polivinilpirrolidona, de vários pesos moleculares, a surfactantes caninos inibidos por mecônio, plasma e lisofosfatidilcolina restaurou a função surfactante, avaliada com um surfactômetro de bolha pulsátil. A adição destes polímeros não iônicos causou uma redução na tensão superficial mínima durante a compressão da bolha. Nas lesões pulmonares em ratos causadas pela aspiração de mecônio, ácidos e endotoxinas, a presença de polímeros melhorou significativamente a dinâmica pulmonar e os achados histológicos post-mortem.¹¹⁸ A ação benéfica dos polímeros adicionadas ao surfactante foi revista por Dargaville em 2001.¹¹⁷ Os polímeros iônicos, como o ácido hialurônico, também apresentam a capacidade de reverter a inibição do surfactante determinada pela presença de mecônio.¹²³

O TME, analisado através de imagem computadorizada, foi utilizado como umas das técnicas para avaliar a inibição do surfactante pelo mecônio e sua reversão com a mudança do pH. Nesse experimento, uma solução de Curosurf, contendo 5mg/ml, gerou a formação de aproximadamente 400 mbe/mm². A adição de mecônio (0,75g/dl) reduziu a contagem de mbe para 41/mm². Ao baixar o pH de 6,2 para 5,0-5,5, restaurou-se a contagem de mbe. Os resultados com TME foram comparáveis aos obtidos com o surfactômetro da bolha pulsante.¹²⁴

Entretanto, estudos realizados em nosso laboratório utilizando polímeros não iônicos revelaram resultados surpreendentes. A adição de diferentes concentrações de dextran a soluções de surfactante (Curosurf®) resultou em uma diminuição significativa na formação de mbe em todas as análises feitas ($p > 0,001$), ou seja a presença de dextran resultou em uma perda de função surfactante. Estes resultados foram confirmados por Fiori et al. ao avaliarem a adição de dextran e PEG a soluções de surfactante. A adição do dextran resultou em uma redução em aproximadamente 88% na formação de mbe ($p > 0,01$), enquanto a do PEG impediu completamente a formação de microbolhas estáveis (Figura 12).^{3,36,65,125}

A adição de dextran e PEG a soluções de Curosurf® contendo mecônio em baixas concentrações foi avaliada em nosso laboratório através do TME. A adição do dextran restaurou < 10 % a contagem de mbe, enquanto que a presença do PEG determinou o desaparecimento das mbe (Figura 13). Estes resultados da avaliação da função surfactante através do TME estão na direção oposta aos descritos por inúmeros autores utilizando diferentes metodologias e de experimentos em animais.^{100,121,126}

Para elucidar estes resultados desenvolvemos a atual pesquisa. A primeira fase foi desenhada para avaliar o efeito da adição do dextran e PEG na função surfactante de um preparado comercialmente disponível (Curosurf®). Posteriormente, utilizaremos um destes polímeros adicionados ao surfactante em um modelo experimental de SAM.

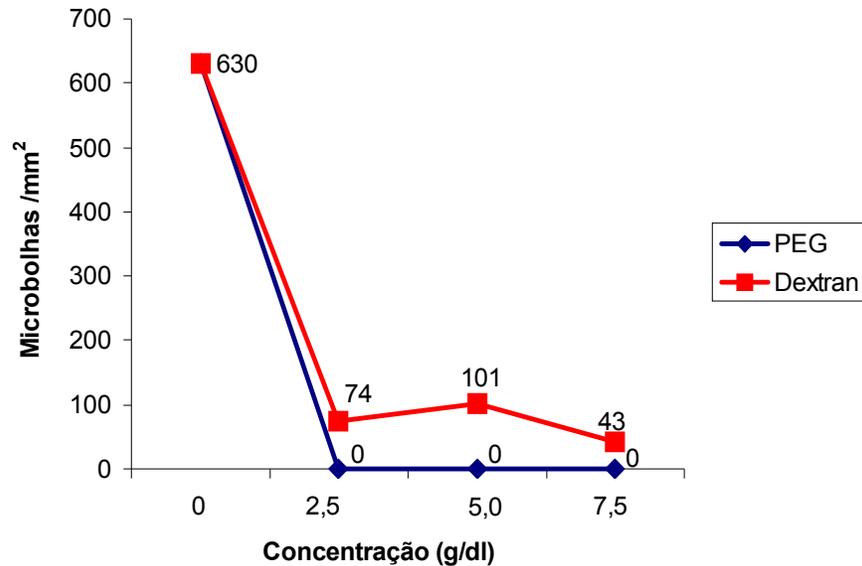


Figura 12 - Efeito sobre a contagem de microbolhas estáveis da adição de Dextran e PEG à uma solução de surfatante (Curosurf® 0,04mg/ml) em sorofisiológico; para o Dextran $p < 0,01$ e para o PEG $p < 0,005$.⁶⁶

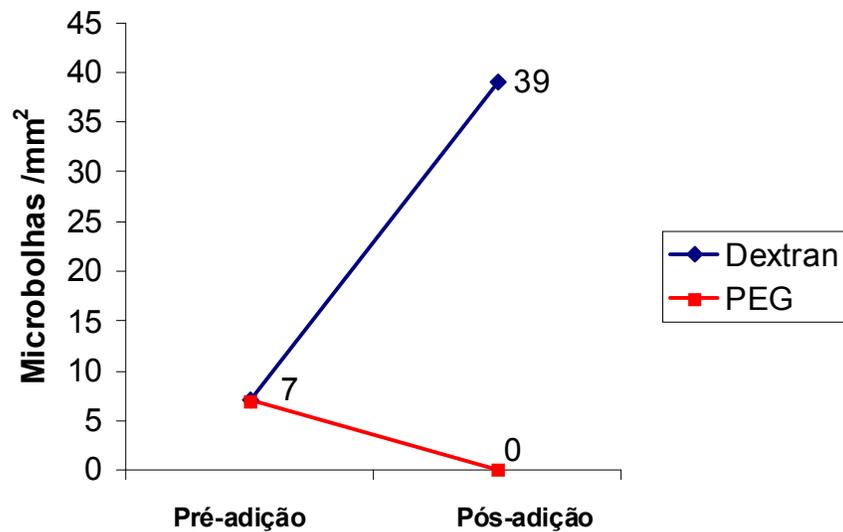


Figura 13 - Efeito sobre a contagem de microbolhas estáveis da adição de Dextran e PEG à solução de surfatante (Curosurf® 0,04mg/ml) em soro fisiológico + mecônio. Valores expressos em médias de todas as determinações; para o Dextran $p < 0,05$ e para o PEG $p < 0,001$.⁶⁶

2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A Síndrome da Aspiração de Mecônio (SAM) continua sendo uma causa importante de morbi-mortalidade neonatal, apesar das mudanças ocorridas na última década. O melhor manejo obstétrico resultou em uma diminuição na sua prevalência, e novas alternativas de tratamento possibilitam resultados mais alentadores nos casos mais graves. A instilação de surfactante exógeno tem sido pouco efetiva no tratamento da SAM se comparada ao sucesso com a DMH. Nos trabalhos clínicos, altas doses ou doses cumulativas de surfactantes são necessárias para que ocorra uma melhora clínica modesta. O lavado broncoalveolar com surfactante é uma opção terapêutica com resultados indeterminados, e é uma das linhas de investigação de nosso laboratório.

O mecônio é um potente inibidor da atividade surfactante *in vitro*, principalmente das preparações que não contêm a proteína A do surfactante (SP-A) na sua formulação. Os dois surfactantes comerciais mais difundidos para o uso clínico, Curosurf® e Survanta®, não contem SP-A. A inibição da função surfactante determinada pela presença de mecônio pode ser revertida pela adição de polímeros iônicos e não iônicos. Os resultados positivos *in vitro* estão amplamente documentados, porém as pesquisas em modelos experimentais apresentam resultados bem menos expressivos.

A hipótese a ser testada neste estudo é se a função de um surfactante natural melhorado pela adição de polímero não iônico é mais eficaz que a

preparação convencional no tratamento da SAM em modelo animal experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de polímeros não iônicos adicionados ao surfactante *in vitro* e em um modelo experimental de síndrome da aspiração de mecônio.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Estudar o efeito sobre a tensão superficial mínima da adição de PEG e de dextran a uma solução de surfactante durante a compressão dinâmica através do surfactômetro da bolha cativa.
 2. Comparar o efeito sobre a tensão superficial das soluções de surfactante contendo PEG e dextran.
 3. Estudar o efeito dos polímeros não iônicos na adsorção do filme à interface ar-líquido da bolha cativa.
 4. Comparar o efeito sobre as alterações gasométricas na síndrome de aspiração de mecônio experimental do tratamento com surfactante e com surfactante adicionado de PEG.
-

4. REFERÊNCIAS

1. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate*. 2005;87:308-16.
 2. Obladen M. History of Surfactant Research. In: Robertson B VGL, Batenburg J, editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice*. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 1-18.
 3. Luz JH. Teste das microbolhas estáveis na avaliação da função surfatante in vitro [Mestrado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2001.
 4. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol*. 1979; 86:615-22.
 5. Avery M. Surfactant deficiency in Hyaline Membrane Disease: the Story of Discovery. In: Rooth G SD, editor. *The Roots of Perinatal Medicine*. 1^aed ed. New York: Thieme-Stratton Inc; 1985. p.1-6.
 6. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 1955;175:1125-6.
 7. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child*. 1959; 97:517-23.
 8. Pearson HA, Anunziato D, Baker JP, Gartner LM, Howell DA, Strain JE, et al. Committee report: American Pediatrics: milestones at the millennium. *Pediatrics*. 2001;107:1482-91.
 9. Hostetter MK. Introduction of the American Pediatric Society's 2005 John Howland Award Recipient, Mary Ellen Avery, M.D. *Pediatr Res*. 2005; 58:1311-6.
 10. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*. 1980; 1:55-9.
-

-
11. Kattwinkel J. Surfactant. Evolving issues. *Clin Perinatol.* 1998; 25:17-32.
 12. Jobe AH, Ikegami M. Biology of surfactant. *Clin Perinatol.* 2001; 28:655-69, vii-viii.
 13. Batenburg JJ. Biosynthesis of Surfactant Lipids. In: Robertson B, Van Golde, L.M.G., Batenburg J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice.* Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 256-81.
 14. Batenburg JJ. Biosynthesis, Secretion, and Recycling of Surfactant Components. In: Robertson B TH, editor. *Surfactant Therapy For Lung Disease.* 1ª ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1995. p. 47-74.
 15. Akino T. Lipid Components of Surfactant System. In: Robertson B, Van Golde L.M.G., Batenburg J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice.* 1ªed ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 19-31.
 16. Zimmermann LJI, Janssen, D.J.M.T., Tibboel, D., Hamvas, A. Surfactant Metabolism in the Neonate. *Biol Neonate.* 2005; 87:298-307.
 17. Batenburg JJ, Hallman, M. Developmental biochemistry of alveoli. In: Scarpelli EM, editor. *Pulmonary Physiology: Fetus, Newborn, Child and Adolescent.* 1ªed ed. Philadelphia Lea & Febiger; 1990. p. 106-39.
 18. Kotas RV. Surface tension forces and liquid balance in the lungs. In: Thibeault DWeG, G.A., editor. *Neonatal Pulmonary Care.* 1 ed. Menlo Park, Califórnia: Addisson-Welley Publishing Co; 1979. p. 35-53.
 19. Hawgood S. The Hydrophilic Surfactant Protein SP-A: Molecular Biology, Structure and Function. In: Robertson B, Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice.* 1ª ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 33-54.
 20. Wright JR. Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate.* 2004; 85:326-32.
-

-
21. Hawgood S. Surfactant protein B: structure and function. *Biol Neonate*. 2004; 85:285-9.
 22. Weaver TE. Biosynthesis and Intracellular Processing of Surfactant. In: Robertson B, Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice*. 1^a ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 283-93.
 23. Moya F, Maturana A. Animal-derived surfactants versus past and current synthetic surfactants: current status. *Clin Perinatol*. 2007; 34:145-77, viii.
 24. Liggins GC. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*. 1969; 45:515-23.
 25. Post M, Smith, B.T. Hormonal Control of Surfactant Metabolism. In: Robertson B, Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice*. 1^a ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 379-424.
 26. Sliveira CMB, Guaragna, G.F., Daniel, I.W.B.S., Luz, J.H. Síndrome do Desconforto Respiratório. In: Lerner L, editor. *Acta Médica Porto Alegre: ediPUCRS*; 2008. p. 636-48.
 27. Halliday HL. History of surfactant from 1980. *Biol Neonate*. 2005; 87:317-22.
 28. Hansen T, Corbet, A. Disorders of the Transition. In: Tauesch WeB, R.A., editor. *Avery's Diseases of the Newborn*. 7 ed. USA: WB Saunders Co; 1998. p. 602-29.
 29. Effect of antenatal dexamethasone administration on the prevention of respiratory distress syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;141:276-87.
 30. Fiori RM, Diniz EM, Lopes JM, Goncalves AL, da Costa MT, Marino WT, et al. Surfactant replacement therapy: a multicentric trial comparing two dosage approaches. *Acta Biomed Ateneo Parmense*. 1997; 68 Suppl 1:55-63.
 31. Stevens TP, Harrington EW, Blennow M, Soll RF. Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued
-

-
- mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007:CD003063.
32. Seger N, Soll R. Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009:CD007836.
33. Engle WA. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. *Pediatrics.* 2008; 121:419-32.
34. Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001:CD000510.
35. Early versus delayed neonatal administration of a synthetic surfactant--the judgment of OSIRIS. The OSIRIS Collaborative Group (open study of infants at high risk of or with respiratory insufficiency--the role of surfactant. *Lancet.* 1992; 340:363-9.
36. Fiori HH. Teste das microbolhas estáveis e teste do clique para predição de síndrome do desconforto respiratório em recém-nascido pré-termo. Porto Alegre: PUCRS; 2000.
37. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *J Perinat Med.* 2006; 34:66-70.
38. Moulton SL, Krous HF, Merritt TA, Odell RM, Gangitano E, Cornish JD. Congenital pulmonary alveolar proteinosis: failure of treatment with extracorporeal life support. *J Pediatr.* 1992;120:297-302.
39. Lin Z, deMello DE, Wallot M, Floros J. An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a mutation hotspot in exon 4. *Mol Genet Metab.* 1998; 64:25-35.
40. Lotze A, Mitchell BR, Bulas DI, Zola EM, Shalwitz RA, Gunkel JH. Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term
-

-
- infants with severe respiratory failure. Survanta in Term Infants Study Group. *J Pediatr.* 1998;132:40-7.
41. Lacaze-Masmonteil T. Expanded use of surfactant therapy in newborns. *Clin Perinatol.* 2007; 34:179-89, ix.
42. Walsh-Sukys MC. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. The black box revisited. *Clin Perinatol.* 1993; 20:127-43.
43. Walsh-Sukys MC, Cornell DJ, Houston LN, Keszler M, Kanto WP, Jr. Treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn without hyperventilation: an assessment of diffusion of innovation. *Pediatrics.* 1994; 94:303-6.
44. Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics.* 2000; 105:14-20.
45. Auten RL, Notter RH, Kendig JW, Davis JM, Shapiro DL. Surfactant treatment of full-term newborns with respiratory failure. *Pediatrics.* 1991; 87:101-7.
46. Herting E, Gefeller O, Land M, van Sonderen L, Harms K, Robertson B. Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics.* 2000;106:957-64; discussion 1135.
47. Raju TN, Langenberg P. Pulmonary hemorrhage and exogenous surfactant therapy: a metaanalysis. *J Pediatr.* 1993; 123:603-10.
48. Dargaville PA, Copnell B. The epidemiology of meconium aspiration syndrome: incidence, risk factors, therapies, and outcome. *Pediatrics.* 2006; 117:1712-21.
-

-
49. Whisett JA, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Acute Respiratory Disorder. In: Avery, editor. Neonatology-Pathophysiology and Management of the Newborn Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 1999. p. 18-23.
 50. Cleary GM, Wiswell TE. Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome. An update. *Pediatr Clin North Am.* 1998; 45:511-29.
 51. Ribeiro M, Luz JH, Arcienegas R. Aspiração de Mecônio: Intubar ou não? . XII Congresso Brasileiro, IV Congresso Latini-Americano de Perinatologia e IX Reunião Brasileira de Enfermagem Neonatal; 1990; Rio de Janeiro. 1990.
 52. Liu WF, Harrington T. Delivery room risk factors for meconium aspiration syndrome. *Am J Perinatol.* 2002; 19:367-78.
 53. Kugelman A, Gangitano E, Taschuk R, Garza R, Riskin A, McEvoy C, et al. Extracorporeal membrane oxygenation in infants with meconium aspiration syndrome: a decade of experience with venovenous ECMO. *J Pediatr Surg.* 2005; 40:1082-9.
 54. Yoder BA, Kirsch EA, Barth WH, Gordon MC. Changing obstetric practices associated with decreasing incidence of meconium aspiration syndrome. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:731-9.
 55. Fanaroff AA. Meconium aspiration syndrome: historical aspects. *J Perinatol.* 2008;28 Suppl 3:S3-7.
 56. Wiswell TE. Advances in the treatment of the meconium aspiration syndrome. *Acta Paediatr Suppl.* 2001; 90:28-30.
 57. Garcia-Prastes JA. Management of meconium aspiration syndrome. 11/04/2009 ed:UptoDate; 2009.
 58. Garci-Prastes JA. Clinical features and diagnosis of meconium aspiration syndrome. 09/10/2007 ed:UptoDate; 2009.
 59. Abramovich DR, Gray ES. Physiologic fetal defecation in midpregnancy. *Obstet Gynecol.* 1982; 60:294-6.
-

-
60. Ramon y Cajal CL, Martinez RO. Defecation in utero: a physiologic fetal function. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188:153-6.
 61. Miller FC. Meconium staining of the amniotic fluid. *Clin Obstet Gynaecol.* 1979; 6:359-65.
 62. Colvero MO. Uso de surfactante em modelo experimental de aspiração de mecônio Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2009.
 63. Tyler DC, Murphy J, Cheney FW. Mechanical and chemical damage to lung tissue caused by meconium aspiration. *Pediatrics.* 1978; 62:454-9.
 64. Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr.* 2001; 138:113-5.
 65. Luz JH, Fiori, H.H., Pereira, M.R., Piva, J., Fiori, R.M., editor. Stable Microbubble Test for Evaluation of Surfactant Inhibition by Meconium, Human Albumin and Blood and restoration of Surfactant Activity by Dextran. *Proceedings of the 17th International Workshop on Surfactant Replacement;* 2002; Cagliari, Italy.
 66. Fiori AH. Inibição e restauração da função surfatante pulmonar in vitro: avaliação através do teste das microbolhas estáveis. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2003.
 67. Gregory GA, Gooding CA, Phibbs RH, Tooley WH. Meconium aspiration in infants--a prospective study. *J Pediatr.* 1974; 85:848-52.
 68. Linder N, Aranda JV, Tsur M, Matoth I, Yatsiv I, Mandelberg H, et al. Need for endotracheal intubation and suction in meconium-stained neonates. *J Pediatr.* 1988; 112:613-5.
 69. Casiro O, Seshia M. Management of meconium-stained neonates. *J Pediatr.* 1989; 11:1067-8.
 70. Wiswell TE, Gannon CM, Jacob J, Goldsmith L, Szyld E, Weiss K, et al. Delivery room management of the apparently vigorous meconium-stained
-

-
- neonate: results of the multicenter, international collaborative trial. *Pediatrics*. 2000; 105:1-7.
71. Halliday HL. Endotracheal intubation at birth for preventing morbidity and mortality in vigorous, meconium-stained infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001(1):CD000500.
72. Vain NE, Szyld EG, Prudent LM, Wiswell TE, Aguilar AM, Vivas NI. Oropharyngeal and nasopharyngeal suctioning of meconium-stained neonates before delivery of their shoulders: multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2004; 364:597-602.
73. Fraser WD, Hofmeyr J, Lede R, Faron G, Alexander S, Goffinet F, et al. Amnioinfusion for the prevention of the meconium aspiration syndrome. *N Engl J Med*. 2005; 353:909-17.
74. Bahrami KR, Van Meurs KP. ECMO for neonatal respiratory failure. *Semin Perinatol*. 2005; 29:15-23.
75. Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ. Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 1996; 97:48-52.
76. Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant: a multicentre, randomized, controlled trial. *Acta Paediatr*. 2005; 94:896-902.
77. Maturana A T-P, Salinas R, Astudillo P, Moya FR. . The Chile Surf Group. A randomized trial of natural surfactant for moderate to severe meconium aspiration syndrome. PAS Meeting; 2005; Washington DC. 2005. p. 1545.
78. El Shahed AI, Dargaville P, Ohlsson A, Soll RF. Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term/near term infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3):CD002054.
79. Wiswell TE, Fuloria M. Management of meconium-stained amniotic fluid. *Clin Perinatol*. 1999; 26:659-68.
-

-
80. Colvero MO, Fiori HH, Fiori RM, Luz JH, de Paula D, Oppermann C, et al. Bronchoalveolar lavage plus surfactant in a piglet model of meconium aspiration syndrome. *Neonatology*. 2008; 93:188-92.
 81. Colvero MO. Lavado broncoalveolar e surfactante em modelo experimental de síndrome de aspiração de mecônio. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005.
 82. Lam BC, Yeung CY. Surfactant lavage for meconium aspiration syndrome: a pilot study. *Pediatrics*. 1999; 103:1014-8.
 83. Wiswell TE, Knight GR, Finer NN, Donn SM, Desai H, Walsh WF, et al. A multicenter, randomized, controlled trial comparing Surfaxin (Lucinactant) lavage with standard care for treatment of meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 2002; 109:1081-7.
 84. Dargaville PA, Mills JF, Copnell B, Loughnan PM, McDougall PN, Morley CJ. Therapeutic lung lavage in meconium aspiration syndrome: a preliminary report. *J Paediatr Child Health*. 2007; 43:539-45.
 85. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med*. 1972; 286:1077-81.
 86. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Jr., Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol*. 1971; 109:440-5.
 87. Colvero A. Contagem de corpos lamelares no aspirado gástrico de recém-nascidos a termo e pré-termo. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.
 88. Daniel IWBD. Testes rápidos de maturidade pulmonar no aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros para o diagnóstico de síndrome do desconforto respiratório. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
-

-
89. Steibel G. Teste das microbolhas estáveis e contagem dos corpos lamelares no líquido amniótico para predição da síndrome do desconforto respiratório no recém-nascido prematuro. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
 90. Skelton R, Jeffery H. "Click test": rapid diagnosis of the respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulmonol.* 1994; 17:383-9.
 91. Machado LU. Avaliação da produção e função surfactante através de testes de maturidade pulmonar no aspirado gástrico de recém-nascidos a termo com taquipnéia transitória Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
 92. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM. Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med.* 2003; 31:509-14.
 93. Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Saugstad OD, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med.* 2007; 35:175-86.
 94. Verдум G. Valor do Teste de Microbolhas Estáveis para a predição de necessidade de segunda dose de surfactante em prematuros com 31 semanas de idade gestacional. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
 95. Measuring Dynamics Surface Tensio in the Lungs. Cleveland; [cited 2009]; Available from: <http://ising.phys.cwru.edu/surfactants/measurements.html>.
 96. Enhorning G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol.* 1977; 43:198-203.
 97. Putz G, Goerke J, Taeusch HW, Clements JA. Comparison of captive and pulsating bubble surfactometers with use of lung surfactants. *J Appl Physiol.* 1994; 76:1425-31.
-

-
98. Fiori AH, Luz, J.L., Fiori, H.H., Fiori, R.M.,. Effect of Polyethyleneglycol e Dextran on the Stable Microbubble Test in Surfactant Containing Solution *Pediatr Res.* 2004; 55:541A.
 99. Tierney DF. Pulmonary Surfactant in Health and Disease. *Dis Chest.* 1965; 47:247-53.
 100. Taeusch HW. Treatment of acute (Adult) respiratory distress syndrome. The holy grail of surfactant therapy. *Biol Neonate.* 2000; 77 Suppl 1:2-8.
 101. Robertson B. Surfactant inactivation and surfactant therapy in acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Monaldi Arch Chest Dis.* 1998; 53:64-9.
 102. Bummer PM, Sanders LP, Pauly TH, Gillespie MN. In vitro inactivation of pulmonary surfactant replacement preparations by serum albumin. *Am J Med Sci.* 1994; 307:401-4.
 103. Wang Z, Notter RH. Additivity of protein and nonprotein inhibitors of lung surfactant activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158:28-35.
 104. Ueda T, Ikegami M, Jobe A. Surfactant subtypes. In vitro conversion, in vivo function, and effects of serum proteins. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149:1254-9.
 105. Amirkhanian JD, Merritt TA. Inhibitory effects of oxyradicals on surfactant function: utilizing in vitro Fenton reaction. *Lung.* 1998; 176:63-72.
 106. Merritt TA, Amirkhanian JD, Helbock H, Halliwell B, Cross CE. Reduction of the surface-tension-lowering ability of surfactant after exposure to hypochlorous acid. *Biochem J.* 1993; 295 (Pt 1):19-22.
 107. Grossmann G, Suzuki Y, Robertson B, Kobayashi T, Berggren P, Li WZ, et al. Pathophysiology of neonatal lung injury induced by monoclonal antibody to surfactant protein B. *J Appl Physiol.* 1997; 82:2003-10.
 108. Grossmann G, Tashiro K, Kobayashi T, Suzuki Y, Matsumoto Y, Waseda Y, et al. Experimental neonatal respiratory failure induced by
-

-
- lysophosphatidylcholine: effect of surfactant treatment. *J Appl Physiol.* 1999; 86:633-40.
109. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu MY, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:477-81.
110. Chen CT, Toung TJ, Rogers MC. Effect of intra-alveolar meconium on pulmonary surface tension properties. *Crit Care Med.* 1985; 13:233-6.
111. Robertson B. Animal Models of Neonatal Surfactant Dysfunction. In: Robertson B, Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J., editor. *Pulmonary Surfactant from Molecular Biology to Clinical Practice.* 1^a ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 459-84.
112. Sun B, Curstedt T, Robertson B. Surfactant inhibition in experimental meconium aspiration. *Acta Paediatr.* 1993; 82:182-9.
113. Bae CW, Takahashi A, Chida S, Sasaki M. Morphology and function of pulmonary surfactant inhibited by meconium. *Pediatr Res.* 1998; 44:187-91.
114. Ochs M, Schuttler M, Stichtenoth G, Herting E. Morphological alterations of exogenous surfactant inhibited by meconium can be prevented by dextran. *Respir Res.* 2006; 7:86.
115. Park KH, Bae CW, Chung SJ. In vitro effect of meconium on the physical surface properties and morphology of exogenous pulmonary surfactant. *J Korean Med Sci.* 1996; 11:429-36.
116. Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry.* 1990; 29:8424-9.
117. Dargaville PA, Morley CJ. Overcoming surfactant inhibition with polymers. *Acta Paediatr.* 2000; 89:1397-400.
118. Taeusch W, Lu KW, Goerke J, Clements JA. Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:1391-5.
-

-
119. Polyethelene glicol. 2009 [updated 2009; cited 2009 12/11/2009]; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/polyethyleneglicol>.
 120. DEXTRAN. 2009 [updated 2009; cited 2009 4/12/2009]; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/dextran>.
 121. Lu KW, William Taeusch H, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polymer-surfactant treatment of meconium-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:623-8.
 122. Lu KW, Taeusch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polyethylene glycol/surfactant mixtures improve lung function after HCl and endotoxin lung injuries. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:1531-6.
 123. Lu KW, Goerke J, Clements JA, Taeusch HW. Hyaluronan reduces surfactant inhibition and improves rat lung function after meconium injury. *Pediatr Res*. 2005; 58:206-10.
 124. Berggren P, Eklind J, Linderholm B, Robertson B. Bubbles and computer-aided image analysis for evaluation of surfactant inhibition. *Biol Neonate*. 1992; 61 Suppl 1:15-20.
 125. Fiori AH, Luz,J.L., Fiori,H.H.,Fiori,R.M.,. Effect of Polyethyleneglycol and Dextran on the Stable Microbubble Test in Surfactant Containing Solution. *Pediatr Res*. 2004; 55(4):541A.
 126. Taeusch HW, de la Serna JB, Perez-Gil J, Alonso C, Zasadzinski JA. Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental. *Biophys J*. 2005; 89:1769-79.
-

CAPÍTULO II

5 MATERIAL E MÉTODO

A avaliação da função surfactante das soluções de surfactante adicionadas dos polímeros foi realizada através de um surfactômetro de bolha cativa, no laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Calgary, Canadá. Foram avaliadas a capacidade de adsorção na interface ar-líquida e a tensão superficial mínima durante a compressão dinâmica da bolha.^{1,2}

O surfactante natural foi doado pelo laboratório Chiesi Farmacêutica Ltda, São Paulo SP.

O polietilenoglicol (PEG) de peso molecular de 10 kD, laboratório Sigma - São Paulo SP, foi adquirido pelos autores para esta pesquisa. O PEG era pesado previamente em balança de alta precisão em um laboratório de manipulação e diluído com soro fisiológico, momentos antes de ser adicionado ao surfactante. A solução final continha PEG 7,5% (peso/volume).³

O mecônio era proveniente da primeira evacuação de recém-nascidos a termo saudáveis obtidos internados na maternidade do Hospital São Lucas da PUCRS. Várias amostras eram coletadas e misturadas para formar o “pool” de

mecônio dentro de 12 horas antes das experimentações. O “pool” era diluído numa concentração de 20% (peso/volume) momentos antes da instilação.^{4,5}

Os porcos eram de raça híbrida e adquiridos diretamente do produtor (Cooperativa Regional Agropecuária Languiru Ltda, Teutônia-RS). Todos os porcos tinham menos de 24 horas e tinham os cordões umbilicais permeáveis que permitiram a colocação de cateteres arteriais e venosos.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Habilidades Médicas da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Na preparação dos animais, o protocolo de analgesia e sedação foi rigorosamente seguido. A sedação inicial foi realizada através de uma dose 2 mg/kg de ketamina intramuscular. Os porcos eram posicionados e imobilizados em uma mesa cirúrgica (Figura 1). Uma fonte de calor era utilizada com o objetivo de manter a temperatura axilar entre 37° e 38° C. Um acesso venoso umbilical, através de um cateter de poliuretano # 5 French, Argylle®, era obtido para administração intermitente de medicações. Para realização da traqueostomia, a analgesia era obtida com uma dose endovenosa de fentanil de 5mcg/kg, seguida de anestesia tópica da região cervical anterior com lidocaína 2%, sem vasoconstritor. Uma cânula endotraqueal #3,5 Portex®, era introduzida 3,5 a 4,0 cm dentro da traquéia e fixada por meio de fitas de 0,5 cm de largura. A entrada de ar simétrica em ambos campos pulmonares era confirmada pela ausculta. Após assegurar uma via aérea adequada, os animais eram paralisados com pancurônio 0,1mg/kg e mantidos em ventilação

mecânica. Um cateter #3,5 French, Argylle® era colocado na artéria umbilical para amostras de sangue para a realização das gasometrias arteriais.⁵⁻⁷

A anestesia era mantida com fentanil e pancurônio repetidos a cada 1 a 2 horas ou quando se julgasse necessário. Nos cateteres venosos e arteriais eram infundidos soro glicosado 5% intermitentemente num volume de cerca de 80ml/kg/dia. Foram monitorizadas a frequência cardíaca e a temperatura retal.



Figura 1 - Porcos recém-nascidos após indução anestésica

A ventilação mecânica era realizada através de um respirador ciclado a tempo, limitado por pressão e de fluxo contínuo (BP 200 – Pro-Medico - RJ®).

Os parâmetros iniciais do respirador eram pré-determinados em uma frequência respiratória de 25, uma pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 5 cmH₂O, uma pressão inspiratória positiva de 15 cmH₂O, um fluxo de 6 l/min, uma fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 1,0 e um tempo inspiratório de 0,4 segundos. Uma primeira amostra de sangue arterial era obtida com estes parâmetros e foi designada como a gasometria de base (analisada no aparelho ABL 5 – Radiometer – Copenhagen – Denmark ®).

A aspiração de mecônio era então induzida pela instilação de 5 ml/kg do “pool” de mecônio a 20%, em alíquota única através de uma seringa conectada ao tubo endotraqueal, em cerca de 30 segundos.

Os parâmetros ventilatórios, após a indução da aspiração de mecônio, foram padronizados em uma frequência respiratória de 40/min, uma PEEP de 5 cmH₂O, uma PIP de 20 cmH₂O, fluxo de ar 6 l/min, FiO₂ 1,0 e um tempo inspiratório de 0,4 segundos. Esses parâmetros foram mantidos fixos durante todo o experimento. Se houvesse bradicardia (frequência cardíaca menor de 100 batimentos) ou gasometria arterial com retenção excessiva de CO₂ (>100), o PIP era aumentado transitoriamente em 5 cmH₂O(5-7). Com estes parâmetros ventilatórios, uma gasometria era coletada 30 minutos após a instilação de mecônio para avaliar a indução da SAM. Se a PaO₂ após a administração do mecônio fosse superior a 100 mmHg, uma dose complementar de 2,5ml/kg de mecônio era instilada.

Após a indução da aspiração de mecônio, os animais foram alocados randomicamente em 3 grupos: Grupo I - controle; Grupo II – surfactante 100mg/kg; Grupo III – surfactante de 100 mg/kg com PEG 7,5%. Para avaliar a resposta foram realizadas gasometrias arteriais aos 30 minutos após intervenção, 3 e 6 horas após a instilação do mecônio. As variáveis gasométricas analisadas incluíram o pH, PaO₂, PaCO₂ e as variações da PaO₂ da PaCO₂ e pH entre as gasometrias realizadas antes do procedimento, 30 minutos, 3 e 6 horas. Ao término do experimento, os animais ainda sob efeito da anestesia eram eutanasiados com injeção intra-cardíaca de 3-5 ml de tiopental.⁶

5.1 Ética

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Foi utilizado apenas o número necessário de animais e todos foram devidamente anestesiados e sedados. Nos casos de ocorrências de óbitos antes do termino do protocolo da pesquisa, este animal seria excluído da análise e outro animal era incluído randomicamente.

5.2 Análise Estatística

Todos os dados estão apresentados como médias e desvios padrões. A análise dos resultados das gasometrias em cada um dos quatro momentos entre os três grupos foi avaliada através da análise uni-variada (ANOVA). Análises uni e bi-variadas modificadas para medidas de repetição inter e intra-grupos foram realizadas para detectar diferenças significativas. Se uma diferença estatística nas análises fosse detectada, esta diferença seria analisada comparando os grupos de interesse e um $p < 0,05$ seria considerado estatisticamente significativo. O cálculo amostral mínimo para se detectar uma diferença de 30 % na PaO_2 com um erro alfa de 0,05 e um poder de 0,8 foi de 5 animais em cada grupo.⁸

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SAS®, SAS Institute, Inc. SAS Statistical Software, Release 9.1. Cary, NC: SAS Institute, Inc, 2002-2003.

5.3 REFERÊNCIAS

1. Schurch S, Bachofen H, Possmayer F. Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001; 129:195-207.
 2. Schürch S, Bachofen, H. Biophysical Aspects in the Design of a Therapeutic Surfactant. In: Robertson B, Tauesch, H.W., editor. *Surfactant Therapy For Lung Disease.* 1^a ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1995. p. 3-32.
 3. Taeusch HW, Lu KW, Goerke J, Clements JA. Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May; 159:1391-5.
 4. Lu KW, Taeusch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polyethylene glycol/surfactant mixtures improve lung function after HCl and endotoxin lung injuries. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:1531-6.
 5. Colvero MO. *Uso de surfactante em modelo experimental de aspiração de mecônio* Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2009.
 6. Colvero MO. *Lavado broncoalveolar e surfactante em modelo experimental de síndrome de aspiração de mecônio* Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005.
 7. de Paula D. *Lavagem bronco-alveolar com tyloxapol em modelo experimental de síndrome de aspiração de mecônio* Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.
 8. Robinson TW, Roberts AM. Effects of exogenous surfactant on gas exchange and compliance in rabbits after meconium aspiration. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 33:117-23.
-

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

Efeitos de polímeros não iônicos adicionados a surfactante *in vitro* e em modelo experimental de aspiração de mecônio

Jorge Hecker Luz¹, Alexandre Holmer Fiori², Humberto Homer Fiori³,
Manuel Antônio Ruttkay Pereira⁴, Mauricio Obal Colvero⁵,
Renato Machado Fiori⁶

1. Doutor, Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
2. Mestre, Membro do *Staff* da UTI Neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS.
3. Doutor, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
4. Doutor; Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
5. Doutor, Membro Efetivo do *Staff* do Hospital Fêmina.
6. Doutor, Professor Titular da Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Endereço para correspondência

Endereço: Avenida Ipiranga, 6690 - 5º andar – UTI Neonatal.

Porto Alegre – RS

Telefone: 51-33154188

E-mail: jluz@pucrs.br

RESUMO: O mecônio é um potente inibidor da função surfactante. A inibição do surfactante tem sido considerada uma importante causa da insuficiência respiratória da síndrome de aspiração de mecônio (SAM). Entretanto, a instilação de surfactantes de origem animal modificados apresenta efeito modesto na evolução clínica destas doenças apesar do uso de doses altas e repetidas. *In vitro*, a adição de polímeros iônicos e não iônicos ao surfactante restaura sua função inativada pela presença de mecônio. As pesquisas em modelos animais de SAM apresentam resultados inconsistentes. Ao adicionarmos dextran e polietilenoglicol ao surfactante natural observamos uma melhora no desempenho avaliado pelo surfactômetro da bolha cativa. Para avaliar se este efeito benéfico sobre o surfactante modificaria a evolução da SAM testamos a adição de polietilenoglicol em um modelo animal. Porcos recém-nascidos (n=16) foram divididos em três grupos: 1. controle (n=5); 2. surfactante (poractante alfa) 100 mg/kg (n=5); 3. surfactante 100mg/kg adicionados de PEG 7,5% (n=6). O período de observação foi de 6 horas. A resposta aos diversos tratamentos foi avaliada por gasometrias arteriais seriadas. O tratamento com surfactante ou com surfactante adicionado de PEG 7,5% não foi diferente do grupo controle. Estes resultados sugerem que, nas doses utilizadas, o surfactante isoladamente ou adicionado de PEG não modificam a insuficiência respiratória produzida pela SAM.

A instilação traqueal de surfactante exógeno é o tratamento específico para a doença da membrana hialina (DMH). A sua aplicação clínica revolucionou o tratamento da DMH[1]. Estes resultados altamente positivos não foram reproduzidos em outras doenças respiratórias que causam lesão pulmonar aguda, entre elas a síndrome da aspiração de mecônio (SAM)[2]. A inibição/inativação da função surfactante pelo mecônio tem sido demonstrada em diferentes tipos de experimentos. Acredita-se que esta inibição/inativação faça parte da patofisiologia da doença e seria a base teórica para o tratamento com surfactante exógeno nos recém-nascidos com insuficiência respiratória devido a SAM[3].

Cockshutt et al. em 1990 demonstraram que adição da SP-A revertia a inibição causada pelas proteínas plasmáticas, embora não revertesse a inibição determinada pela lisofosfatidilcolina[4]. Mais tarde, a adição de polímeros, como o dextran, polietilenoglicol e ácido hialurônico, mostrou-se capaz de melhorar a função de preparados de surfactantes naturais e de reverter a inibição da função provocada por inúmeras substâncias[5, 6].

Em experimentos anteriores realizados em nossa instituição, observamos que a adição de dextran e PEG ao surfactante natural porcino causou inibição na formação de microbolhas quando avaliados pelo teste das microbolhas estáveis. O PEG, quando usado na tentativa de restauração da atividade surfactante em preparados inibidos pelo mecônio, não demonstrou nenhuma

resposta (contagem de microbolhas de zero), enquanto o dextran teve uma ação restauradora mínima[7, 8].

Para elucidar este intrigante achado desenvolvemos a presente pesquisa. Inicialmente, foram avaliados os mesmos polímeros adicionados a uma solução de surfactante. Posteriormente, em um modelo animal de SAM foi avaliado o efeito da adição de PEG ao surfactante natural modificado.

MÉTODOS

Animais e procedimento cirúrgico: foram utilizados dezesseis porcos machos de raça híbrida, a termo, com menos de 24 horas de vida. Em todos os animais foi possível cateterizar a artéria e a veia umbilicais para obtenção de gasometrias e infusão de fluídos e medicações. Inicialmente, os animais eram sedados com cetamina 2 mg/kg e fentanila 5 mcg/kg. Com anestesia infiltrativa com lidocaína 2%, era realizada uma traqueostomia para inserção de uma cânula endotraqueal 3,5 colocada cerca de 4 cm no interior da traquéia. A cânula era ancorada com nó apertado para evitar escape de mecônio. Os animais eram mantidos sedados e paralisados com doses de fentanila e 5 mcg/kg e de pancurônio 0,1mg/kg a cada 1-2 horas, respectivamente.

Os animais eram mantidos em ventilação mecânica padronizada após a instilação de mecônio com pico inspiratório de pressão (PIP) de 20 cmH₂O,

pressão positiva no final da expiração de 5 cmH₂O, tempo inspiratório de 0,4 segundos, frequência respiratória 40/min, fração inspirada de oxigênio de 1,0. Se ocorresse bradicardia ou retenção de CO₂, o PIP era aumentado para 25-30 cm H₂O.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMED-PUCRS.

Material

O mecônio para instilação endotraqueal era de um “pool” formado pela primeira evacuação de pelo menos 3 recém-nascidos normais dentro de 12 horas antes dos experimentos.

Os frascos de surfactante natural modificado poractante alfa (Curosurf®) foram doados pelo laboratório Chiesi Farmacêutica Ltda., São Paulo.

O polietilenoglicol (PEG), de peso molecular de 10 kDa, foi adquirido do Laboratório Sigma_ São Paulo, SP.

Protocolo Experimental

A avaliação da função surfactante das soluções contendo surfactante puro e adicionado de polímeros não iônicos foi realizada através de um surfactômetro de bolha cativa no laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade da Calgary, Canadá, pelo Dr. Samuel Schurch. Foram

avaliadas a velocidade de adsorção e a tensão superficial mínima durante a compressão dinâmica.

A SAM era induzida pela instilação de 5ml/kg de mecônio 20% em soro fisiológico (peso/volume) em dose única, pela traqueostomia. Definiu-se como SAM uma $PaO_2 < 100$ mmHg trinta minutos após a instilação do mecônio. Uma dose extra de 2,5 ml/kg de mecônio poderia ser instilada na falha da indução de SAM.

Após a indução da SAM, os animais eram alocados randomicamente em três grupos: Grupo I (controle) n=5, Grupo II (surfactante 100mg/kg) n=5, Grupo III (surfactante com PEG 7,5%) n= 6. Para avaliar as respostas às três intervenções foram coletadas gasometrias arteriais com 30 minutos, 3 e 6 horas após indução da SAM.

Na ocorrência de óbito de algum animal este era excluído da análise e um outro animal era incluindo randomicamente.

Ao término do experimento, procedia-se a eutanásia dos animais através de uma injeção intracardíaca de 3 a 5 ml de tiopental.

Análise Estatística

Os resultados obtidos com o surfactômetro de bolha cativa estão apresentados de maneira descritiva.

Todos os dados dos experimentos em animais estão apresentados como médias e desvios padrões.

A análise dos resultados das gasometrias em cada um dos quatro momentos, levando-se em conta os três grupos (controle, surfactante e surfactante adicionado de PEG), foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) univariada. A análise dos resultados das gasometrias, considerando-se os quatro momentos conjuntamente, foi procedida através da análise de variância univariada e multivariada para medidas repetidas, separando-se as variações inter e intragrupos para proceder o teste dos efeitos. Se fossem detectados efeitos significativos nas análises, comparar-se-ia os grupos de interesse e um $p < 0,05$ seria considerado estatisticamente significativo.

O número necessário de animais para detectar uma diferença de 30 % na PaO_2 com um erro alfa de 0,05 e um poder de 0,8 foi calculado em 5 para cada grupo.

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SAS®, SAS Institute, Inc. SAS Statistical Software, Release 9.1. Cary, NC: SAS Institute, Inc, 2002-2003.

RESULTADOS

Os resultados obtidos através do surfactômetro de bolha cativa das solução contendo surfactante 0,2 mg/ml em 0,9% NaCl e adicionada de dextran

7,5% e PEG 7,5% são mostrados nas figuras 1 a 3. Em cada experimento, a bolha foi comprimida e expandida em ciclos de 20/min. Nas figuras são apresentados os ciclos dinâmicos 9,10 e 11 de um total de 20 realizados.

Na solução com surfactante puro, os ciclos foram realizados com amplitudes maiores, o que causou um aumento na tensão superficial máxima para aproximadamente 34 mN/m. A tensão superficial mínima na compressão foi $\sim 1,5$ mN/m e observando-se uma leve histerese da curva na tensão superficial mínima, devido a uma excessiva compressão. Verifica-se uma inclinação negativa da curva a esquerda, provavelmente causada por uma instabilidade da bolha ou pelo fenômeno do “clicking” (figura 1).

A adição de dextran 7,5 % e a de PEG 7,5% manteve o valor da tensão superficial mínima de $\sim 1,5$ mN/m, mas fez desaparecer tanto a histerese como a inclinação da curva na tensão superficial mínima (figura 2 e 3).

A adsorção do surfactante à interface ar - líquido foi substancialmente melhor com a adição dos polímeros. A capacidade de atingir tensões superficiais próximas a zero, após um período de adsorção de 5 minutos, foi também melhor com a adição dos polímeros e, neste aspecto, o PEG foi superior ao Dextran. A adição dos polímeros fez com que a tensão superficial próxima a zero fosse obtida nos dois primeiros ciclos quase-estáticos, enquanto que, com a solução surfactante sem adições, só foi obtida com os ciclos dinâmicos.

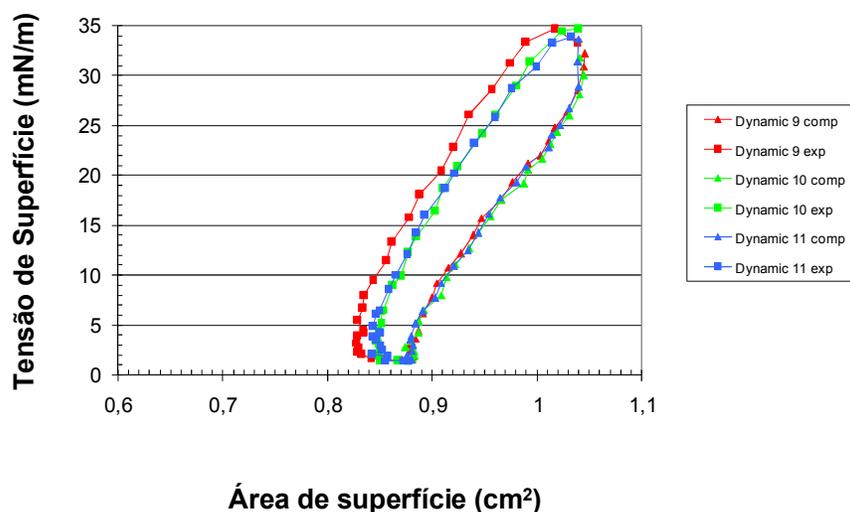


Figura 1. Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa. Os ciclos 9-10-11 de 20 ciclos dinâmicos consecutivos de uma suspensão contendo 0,2 mg/ml de Curosurf® em 0,9% NaCl. A bolha de ar foi comprimida e expandida na velocidade de 20 ciclos/min.

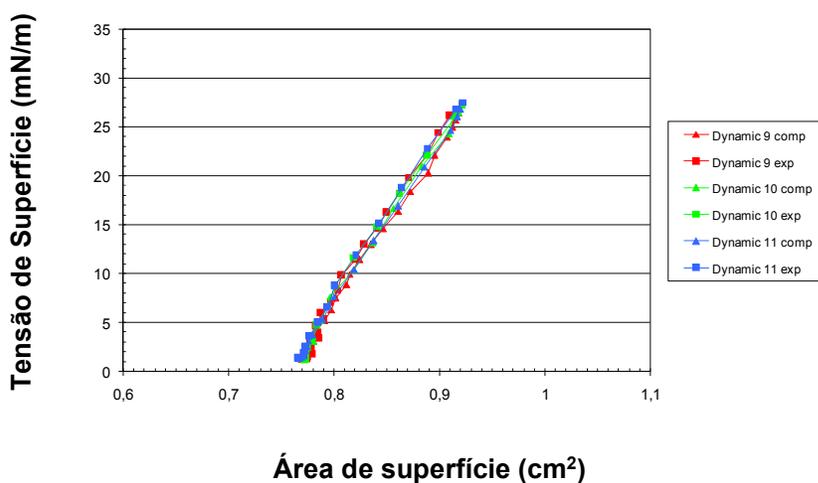


Figura 2. Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa. Os ciclos 9-10-11 de 20 ciclos dinâmicos consecutivos de uma suspensão contendo 0,2 mg/ml de Curosurf® em 0,9% NaCl adicionada de dextran 7,5%. A bolha de ar foi comprimida e expandida na velocidade de 20 ciclos/min.

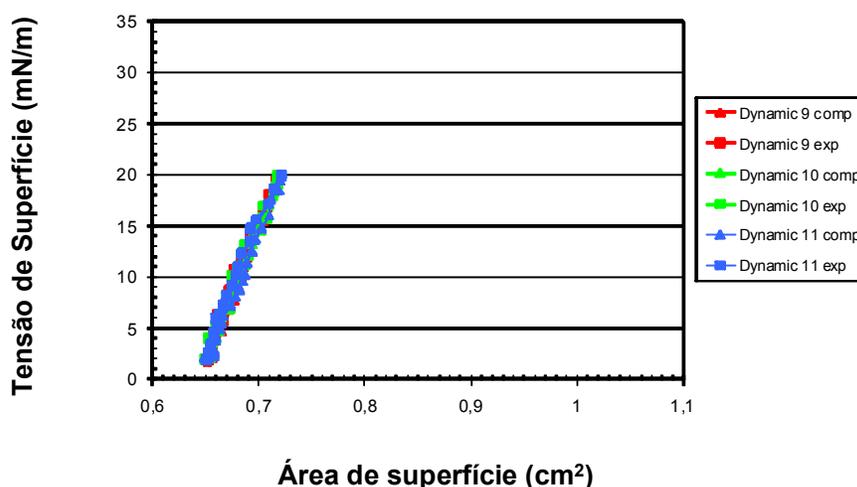


Figura 3. Tensão superficial medida através do surfactômetro de bolha cativa. Os ciclos 9-10-11 de 20 ciclos dinâmicos consecutivos de uma suspensão contendo 0,2 mg/ml de Curosurf® em 0,9% NaCl adicionada de PEG 7,5%. A bolha de ar foi comprimida e expandida na velocidade de 20 ciclos/min

No monitor da televisão, a solução de surfactante com PEG mostrou grandes agregados de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro. O surfactante puro apareceu como uma fina suspensão com agregados muito diminutos e, com dextran, o tamanho dos agregados ficou num nível intermediário entre os dois.

Foram estudados 26 porcos recém-nascidos, sendo 10 animais que foram excluídos das análises, 7 por óbito e 3 por não atingirem o critério de entrada no estudo ($\text{PaO}_2 < 100 \text{ mmHg}$). Dois óbitos aconteceram no grupo I

(controle), 3 no grupo II (surfactante) e 2 no grupo III (surfactante com PEG). Estes óbitos ocorreram com mais de 3 horas após a indução de SAM, exceto um do grupo III, que faleceu durante a indução, antes da intervenção.

O peso médio dos porcos do grupo I foi de 1700 ± 348 g, do grupo II, 1370 ± 455 g, e do grupo III, 1360 ± 221 g. ($p=0,236$)

Doses complementares de mecônio foram necessárias em 7 dos 16 casos analisados (44%).

Os valores de PaO₂ nos três grupos estão mostrados na figura 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos após a indução da SAM ($p=0,901$), 30 minutos pós intervenção ($p=0,817$), 3 horas pós-SAM ($p= 0,711$) e 6 horas pós-SAM ($p= 0,586$).

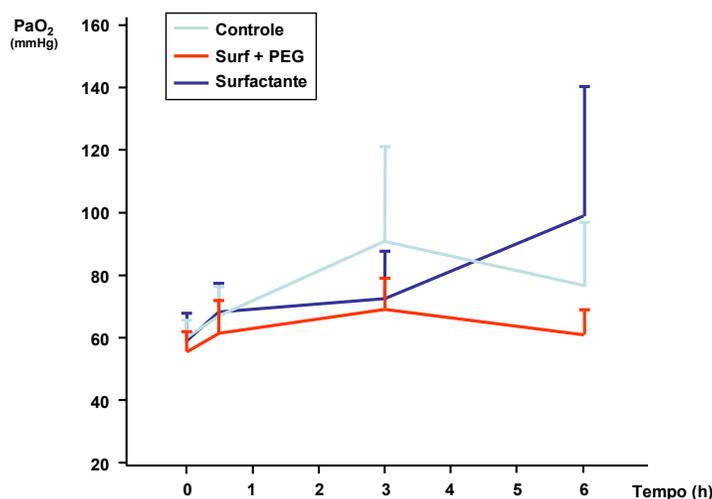


Figura 4. Evolução das médias (\pm desvio padrão) da PaO₂ durante o experimento nos três grupos após a indução de SAM ($p > 0,560$)

Ao comparar-se a PaO₂ dos três grupos conjuntamente, não houve nenhum efeito do tratamento (P=0,850), do tempo (P=0,808) e da interação tratamento e tempo (P=0,560). Os valores mais baixos da PaO₂ foram, consistentemente, os obtidos com surfactante adicionado de PEG.

DISCUSSÃO

A síndrome da aspiração de mecônio é uma das causas mais importantes de morbi-mortalidade no período neonatal precoce[2, 9, 10]. A inibição da função surfactante pela presença de mecônio é um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da insuficiência respiratória[11-13].

A pesquisa da função surfactante pulmonar com experimentos *in vitro* teve seu início com os primeiros trabalhos de Pattle que revelaram a presença de bolhas muito estáveis e com uma tensão superficial próxima a zero em pulmões maduros[14]. O teste das microbolhas estáveis (TME) foi desenvolvido para avaliar a função surfactante no líquido amniótico e secreção gástrica de recém-nascidos prematuros[15-18]. O TME é um método validado para avaliar inibição da função surfactante[7, 19].

Os surfactômetros de bolha pulsante (SBP) e o da bolha cativa (SBC) podem ser considerados a evolução e a sofisticação do teste das microbolhas estáveis. Estes são os aparelhos mais utilizados atualmente e são capazes de determinar algumas das características essenciais de um surfactante pulmonar

eficiente. Estas funções incluem a rápida formação de um filme através da adsorção a partir da hipofase, uma compressibilidade muito baixa com correspondente tensão superficial com valores próximos de zero, e a capacidade de reabastecimento do filme com material surfactante na expansão (da bolha) a partir do reservatório associado à superfície[20-24].

No presente estudo, a avaliação da adsorção, da tensão superficial mínima e da estabilidade a ciclos de expansão/compressão foi feita através de um surfactômetro de bolha cativa. A comparação de uma diluição contendo apenas surfactante natural modificado (Curosurf®) com duas outras acrescidas de dextran ou de PEG mostrou respostas muito semelhantes, todas apresentando características funcionais adequadas de um surfactante pulmonar efetivo. A adição dos polímeros não iônicos acelerou a adsorção e melhorou a estabilidade do filme.

A ação de polímeros não-iônicos sobre a função surfactante foram descritas em 1999. Tauesch et al estudaram a adição de diversos açúcares de diversos tamanhos moleculares a um surfactante natural de origem bovina (Survanta®) através de um surfactômetro de bolha pulsante[3]. Estes autores demonstraram um desempenho melhor do surfactante quando este era adicionado de dextran e PEG. A tensão superficial mínima foi sempre menor nas soluções contendo estes polímeros independentemente da concentração de surfactante testada (entre 0,16 e 1,25 mg/ml). Estes resultados são semelhantes aos que obtivemos com a adição de dextran e PEG (ambos a 7,5%) ao poractante alfa. Um dos mecanismos envolvidos para melhorar esta

complexa interação entre surfactante e polímeros não-iônicos seria a diminuição da hidratação que envolve as membranas dos lipídios. Desta maneira, os lipídios agregam-se em um menor volume de água, permitindo maior concentração dos fosfolipídios do surfactante disponíveis e facilitando a adsorção na interface ar-líquido da bolha pulsante[25, 26]. Documentamos a presença de agregados maiores com a adição dos polímeros do que surfactante puro, vistos através da tela do monitor.

Em nosso laboratório, demonstramos que a adição de dextran e PEG a soluções contendo surfactante a 0,04mg/ml causou marcada diminuição na função surfactante avaliada pelo TME[7, 8]. Este efeito inesperado poderia ter sido causado por diluição do surfactante uma vez que utilizamos concentrações muitas vezes menores que as utilizadas com os SBC e SBP.[27, 28]. Embora a tensão superficial mínima aumente com diluições progressivas do surfactante natural, a adição de dextran e PEG melhoram o desempenho do surfactante, reduzindo os valores da tensão superficial mínima[3]. Uma outra possível explicação para estes resultados contraditórios poderia ser o crescimento irreversível das vesículas de fosfolipídios durante a execução do TME como o que ocorre com altas concentrações de PEG avaliadas pelo SBC. Este efeito impediria a adsorção do surfactante à interface ar-líquido da bolha. Pelo princípio de Laplace, $\Delta P = 2\gamma / r$, a medida que o raio (r) diminui aumenta o gradiente de pressão (ΔP) através da interface ar-líquido da bolha, na ausência de uma substância capaz de diminuir a tensão superficial (γ). Este aumento da pressão dentro da bolha provoca uma rápida difusão dos gases para fora da

mesma. A meia-vida destas bolhas com poucos milímetros de diâmetro é calculada em poucos segundos o que resultaria em significativa redução na contagem das microbolhas no TME[22].

O mecônio é um potente inibidor dose-dependente da função surfactante. Os mecanismos de inibição determinados pela presença do mecônio inclui alteração morfológica do surfactante, a inibição competitiva na adsorção dos fosfolipídios e a infiltração da monocamada por substancias com menor atividade de superfície[29-31].

Com concentrações de mecônio acima de 0,04 mg/ml, a tensão superficial mínima das soluções de surfactante naturais modificados (Curosurf®, Alveofact®, Survanta® contendo 2,5 mg/ml de fosfolipídios) ficaram > 10mN/m[32].

As tentativas de restaurar a função surfactante inibida pelo mecônio iniciaram logo após a descrição da reversão da inibição do surfactante causada pelas proteínas plasmáticas[4]. As substâncias mais testadas para este fim foram as proteínas associadas ao surfactante e os polímeros não iônicos com excelente compatibilidade biológica. O dextran e o PEG restauram a função surfactante avaliadas por diferentes técnicas *in vitro*. Os mecanismos de reversão da inibição do surfactante pelo mecônio na presença dos polímeros seria pela melhora do desempenho do surfactante, pela separação dos complexos formados entre o mecônio e o surfactante e por impedir alterações morfológicas do surfactante[3, 5, 28, 30, 32]. Estes efeitos benéficos dos

polímeros não foram repetidos quando soluções de surfactante inibidas pelo mecônio foram avaliadas pelo TME[7, 8].

Em nosso modelo experimental de SAM previamente descrito em porcos recém-nascidos[33, 34], o tratamento com surfactante e com surfactante adicionado de PEG não modificou a evolução da doença. Os modelos experimentais descritos na literatura incluem diferentes espécies de animais como ratos[35, 36], coelhos[37] e porcos.[33, 34, 38]. E a maioria destas pesquisas foram realizadas com animais adultos, o que talvez não seja um modelo ideal para avaliar as conseqüências da aspiração de mecônio a um recém-nascido com as profundas mudanças cardio-respiratórias que ocorrem ao nascimento[39]. Lyra et al. publicaram uma elegante pesquisa de SAM em coelhos recém-nascidos e demonstraram que adição de PEG não melhorou a função pulmonar no breve período estudado[40].

O mecônio utilizado na maioria dos trabalhos era liofilizado a partir de um “pool”de mecônio fresco. Em alguns experimentos eram também retiradas partículas visíveis. A dose usual para instilação foi de 4-5 ml/kg de solução a 20% [36, 41]. O “pool” de mecônio fresco utilizado no presente estudo, provavelmente reflita com mais fidelidade as condições encontradas em humanos que aspiram mecônio.

As preparações de surfactante naturais mais utilizadas foram o Survanta® e o Curosurf®, em doses variáveis de 50 a 200 mg/kg, sendo que a maioria dos trabalhos empregaram doses de 100mg/kg[5, 41]. Esta é a dose

usual de surfactante recomendada para tratamento da DMH, embora a dose de 200mg/kg de Curosurf® ser também recomendada[1, 42].

O dextran e o PEG revertem a inibição da função surfactante inibidas pelo mecônio. Lu et al. compararam o efeito do Curosurf® (35mg/kg) puro e com a adição de dextran e PEG em modelo de SAM em ratos adultos. Nas primeiras duas horas após a indução de SAM ambos os polímeros melhoraram significativamente a PaO₂, porém o efeito do dextran se manteve na terceira hora e a do PEG diminuiu I significativamente[36] O mesmo grupo mostrou que o PEG associado ao Survanta® melhorou a troca gasosa e a mecânica pulmonar e o dextran não foi diferente do grupo controle com lesão pulmonar induzida pelo mecônio[5]. Como o PEG causou o desaparecimento total das microbolhas estáveis em pesquisa anterior e apresentou melhores resultados qualitativos na avaliação com SBC, optamos por avaliar este polímero associado ao Curosurf®. O resultado de nosso experimento não evidenciou nenhum efeito terapêutico positivo da adição de PEG ao surfactante no tratamento da SAM.

REFERÊNCIAS

1. Engle, W.A., *Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate*. Pediatrics. 2008; **121**:419-32.
 2. El Shahed, A.I., et al., *Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term/near term infants*. Cochrane Database SystRev. 2007: CD002054.
 3. Taeusch, W., et al., *Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances*. Am J Respir Crit Care Med. 1999, **159**:1391-5.
 4. Cockshutt, A.M., J. Weitz, and F. Possmayer, *Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro*. Biochemistry. 1990; **29**: 8424-9.
 5. Lu, K.W., et al., *Polymer-surfactant treatment of meconium-induced acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med. 2000; **162**:623-8.
 6. Lu, K.W., et al., *Hyaluronan reduces surfactant inhibition and improves rat lung function after meconium injury*. Pediatr Res. 2005; **58**:206-10.
 7. Luz, J.H., Fiori, H.H., Pereira, M.R., Piva, J., Fiori, R.M. *Stable Microbubble Test for Evaluation of Surfactant Inhibition by Meconium, Human Albumin and Blood and restoration of Surfactant Activity by Dextran*. in *Proceedings of the 17th International Workshop on Surfactant Replacement*. 2002. Cagliari, Italy.
 8. Fiori, A.H., Luz, J.L., Fiori, H.H., Fiori, R.M., *Effect of Polyethyleneglycol and Dextran on the Stable Microbubble Test in Surfactant Containing Solution*. Pediatr Res. 2004; **55**: 541A.
 9. Dargaville, P.A. and B. Copnell, *The epidemiology of meconium aspiration syndrome: incidence, risk factors, therapies, and outcome*. Pediatrics. 2006; **117**:1712-21.
-

-
10. Fanaroff, A.A., *Meconium aspiration syndrome: historical aspects*. J Perinatol. 2008; **28 Suppl 3**:S3-7.
 11. Dargaville, P.A., M. South, and P.N. McDougall, *Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome*. J Pediatr. 2001; **138**:113-5.
 12. Wiswell, T.E., *Advances in the treatment of the meconium aspiration syndrome*. Acta Paediatr Suppl, 2001. **90**:28-30.
 13. Wiswell, T.E., *Expanded uses of surfactant therapy*. Clin Perinatol. 2001; **28**:695-711.
 14. Pattle, R.E., *Properties, function and origin of the alveolar lining layer*. Nature. 1955; **175**:1125-6.
 15. Pattle, R.E., et al., *Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid*. Br J Obstet Gynaecol. 1979; **86**:615-22.
 16. Fiori, H.H., et al., *Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth*. J Perinat Med. 2003; **31**:509-14.
 17. Fiori, H.H., et al., *Evaluation of surfactant function at birth determined by the stable microbubble test in term and near term infants with respiratory distress*. Eur J Pediatr. 2004; **163**:443-8.
 18. Fiori, H.H., C.C. Fritscher, and R.M. Fiori, *Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates*. J Perinat Med. 2006; **34**:66-70.
 19. Oh, M.H. and C.W. Bae, *Inhibitory effect of meconium on pulmonary surfactant function tested in vitro using the stable microbubble test*. Eur J Pediatr. 2000; **159**:770-4.
 20. Enhorning, G., *Pulmonary surfactant function studied with the pulsating bubble surfactometer (PBS) and the capillary surfactometer (CS)*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001; **129**:221-6.
-

-
21. Enhorning, G., *Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant*. J Appl Physiol. 1977; **43**:198-203.
 22. Schurch, S., H. Bachofen, and F. Possmayer, *Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001; **129**:195-207.
 23. Schürch, S., Bachofen, H., *Biophysical Aspects in the Design of a Therapeutic Surfactant*, in *Surfactant Therapy For Lung Disease*, B. Robertson, Tauesch, H.W., Editor. 1995, Marcel Dekker Inc: New York. p. 3-32.
 24. Schoel, W.M., S. Schurch, and J. Goerke, *The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations*. Biochim Biophys Acta. 1994; **1200**:281-90.
 25. Meyuhas, D., S. Nir, and D. Lichtenberg, *Aggregation of phospholipid vesicles by water-soluble polymers*. Biophys J. 1996; **71**:2602-12.
 26. Meyuhas, D. and D. Lichtenberg, *Effect of water-soluble polymers on the state of aggregation, vesicle size, and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate*. Biophys J. 1996; **71**:2613-22.
 27. Moses, D., et al., *Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium*. Am J Obstet Gynecol. 1991; **164**:477-81.
 28. Tashiro, K., T. Kobayashi, and B. Robertson, *Dextran reduces surfactant inhibition by meconium*. Acta Paediatr. 2000; **89**:1439-45.
 29. Taeusch, H.W., *Treatment of acute (Adult) respiratory distress syndrome. The holy grail of surfactant therapy*. Biol Neonate. 2000; **77 Suppl 1**: 2-8.
 30. Ochs, M., et al., *Morphological alterations of exogenous surfactant inhibited by meconium can be prevented by dextran*. Respir Res. 2006; **7**:86.
 31. Dargaville, P.A. and C.J. Morley, *Overcoming surfactant inhibition with polymers*. Acta Paediatr. 2000; **89**:1397-400.
-

-
32. Herting, E., et al., *Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium*. *Pediatr Res*. 2001; **50**:44-9.
 33. Colvero MO, F.H., Luz JH, Pereira MR, Fiori AH, Silveira C, *Surfactant Treatment in an Experimental Model of Meconium Aspiration Syndrome*. *Neonatology*. 2009; **95**:373.
 34. Colvero, M.O., et al., *Bronchoalveolar lavage plus surfactant in a piglet model of meconium aspiration syndrome*. *Neonatology*. 2008; **93**:188-92.
 35. Sun, B., et al., *Exogenous surfactant improves lung compliance and oxygenation in adult rats with meconium aspiration*. *J Appl Physiol*. 1994; **77**: 1961-71.
 36. Lu, K.W., B. Robertson, and H.W. Taeusch, *Dextran or polyethylene glycol added to curosurf for treatment of meconium lung injury in rats*. *Biol Neonate*. 2005; **88**:46-53.
 37. Robinson, T.W. and A.M. Roberts, *Effects of exogenous surfactant on gas exchange and compliance in rabbits after meconium aspiration*. *Pediatr Pulmonol*. 2002; **33**:117-23.
 38. Paranka, M.S., W.F. Walsh, and B.B. Stancombe, *Surfactant lavage in a piglet model of meconium aspiration syndrome*. *Pediatr Res*. 1992; **31**:625-8.
 39. Walsh-Sukys, M.C., et al., *Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes*. *Pediatrics*. 2000; **105**:14-20.
 40. Lyra, J.C., et al., *Polyethylene glycol addition does not improve exogenous surfactant function in an experimental model of meconium aspiration syndrome*. *Exp Lung Res*. 2009; **35**:76-88.
 41. Sun, B., T. Curstedt, and B. Robertson, *Exogenous surfactant improves ventilation efficiency and alveolar expansion in rats with meconium aspiration*. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; **154**:764-70.
-

42. *Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: an international randomized clinical trial. Collaborative European Multicenter Study Group. Pediatrics. 1988. 82:683-91.*

O artigo previamente apresentado foi elaborado seguindo as normas
para submissão ao Pediatric Research.

CAPITULO IV

CONCLUSÕES

Conclusão Geral:

A adição de polímeros não iônicos melhorou o desempenho da função do surfactante natural modificado *in vitro*, porém não modificou a evolução do quadro clínico em um modelo experimental de síndrome da aspiração de mecônio.

Conclusões específicas:

1. A adição de dextran e de PEG não alterou o valor da tensão superficial mínima de uma solução de surfactante avaliados durante a compressão dinâmica avaliada através do surfactômetro da bolha cativa.

2. A tensão superficial mínima obtida durante a compressão dinâmica avaliada através do surfactômetro da bolha cativa efeito foi semelhante entre as soluções de surfactante contendo PEG e dextran.

3. A velocidade de adsorção do surfactante à interface ar-líquido da bolha foi mais rápida com a adição do PEG e dextran.

4.O tratamento com surfactante ou com surfactante adicionado de PEG não foi diferente do grupo controle quando avaliados pelas alterações da PaO₂, PaCO₂ e do pH na síndrome da aspiração experimental.

ANEXOS

Anexo 1– Evolução das medidas de PaO₂ durante o estudo nos três grupos.

Tratamento	N	Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	5	PaO ₂ _1	353.00	350.00	29.60	13.24	318.00	398.00
		PaO ₂ _2	59.80	55.00	12.68	5.67	49.00	79.00
		PaO ₂ _3	66.80	63.00	21.12	9.45	47.00	102.00
		PaO ₂ _4	90.60	65.00	68.12	30.46	33.00	208.00
		PaO ₂ _5	76.60	70.00	48.04	21.48	27.00	154.00
Surfactante + PEG	6	PaO ₂ _1	263.50	291.50	86.84	35.45	146.00	371.00
		PaO ₂ _2	55.17	52.50	17.19	7.02	35.00	87.00
		PaO ₂ _3	61.33	55.00	16.18	6.61	48.00	92.00
		PaO ₂ _4	69.00	65.50	24.46	9.99	42.00	110.00
		PaO ₂ _5	60.83	62.00	19.18	7.83	27.00	81.00
Surfactante	5	PaO ₂ _1	305.60	262.00	100.24	44.83	220.00	465.00
		PaO ₂ _2	58.40	52.00	20.96	9.37	38.00	87.00
		PaO ₂ _3	68.12	73.00	19.41	8.68	47.00	93.00
		PaO ₂ _4	72.18	60.00	34.83	15.58	39.00	129.00
		PaO ₂ _5	99.00	57.00	94.17	42.11	31.00	260.00

Anexo 2 - Evolução das medidas de PaCO₂ durante o estudo nos três grupos.

Tratamento	N	Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	5	PaCO ₂ _1	34.74	30.70	10.53	4.71	27.00	53.00
		PaCO ₂ _2	80.20	59.00	40.12	17.94	42.00	137.00
		PaCO ₂ _3	77.32	66.00	38.69	17.30	41.00	143.00
		PaCO ₂ _4	86.80	68.00	40.08	17.93	46.00	142.00
		PaCO ₂ _5	103.40	113.00	64.13	28.68	34.00	174.00
Surfactante + PEG	6	PaCO ₂ _1	31.83	27.50	10.83	4.42	22.00	46.00
		PaCO ₂ _2	68.33	64.00	24.43	9.98	35.00	104.00
		PaCO ₂ _3	75.17	82.00	19.37	7.91	38.00	90.00
		PaCO ₂ _4	89.50	93.50	35.69	14.57	39.00	138.00
		PaCO ₂ _5	135.83	141.00	59.79	24.41	43.00	197.00
Surfactante	5	PaCO ₂ _1	31.80	34.00	9.15	4.09	19.00	43.00
		PaCO ₂ _2	77.40	59.00	51.97	23.24	42.00	167.00
		PaCO ₂ _3	73.94	64.00	40.43	18.08	40.00	138.00
		PaCO ₂ _4	83.82	80.00	44.19	19.76	35.00	152.00
		PaCO ₂ _5	83.30	95.00	46.45	20.77	26.00	134.00

Anexo 3 - Evolução das medidas de pH durante o estudo nos três grupos.

Tratamento	N	Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	5	pH_1	7.47	7.50	0.14	0.06	7.26	7.62
		pH_2	7.18	7.25	0.21	0.09	6.93	7.43
		pH_3	7.24	7.22	0.18	0.08	6.99	7.49
		pH_4	7.18	7.22	0.18	0.08	6.97	7.42
		pH_5	7.15	7.06	0.30	0.14	6.78	7.50
Surfactante + PEG	6	pH_1	7.50	7.50	0.08	0.03	7.40	7.64
		pH_2	7.21	7.20	0.10	0.04	7.09	7.36
		pH_3	7.18	7.16	0.11	0.04	7.07	7.36
		pH_4	7.12	7.06	0.13	0.05	6.98	7.28
		pH_5	6.96	6.90	0.21	0.09	6.72	7.32
Surfactante	5	pH_1	7.51	7.54	0.08	0.04	7.39	7.59
		pH_2	7.21	7.21	0.20	0.09	6.88	7.38
		pH_3	7.23	7.19	0.20	0.09	6.95	7.45
		pH_4	7.18	7.13	0.21	0.09	6.95	7.48
		pH_5	7.14	7.13	0.31	0.14	6.80	7.52

Anexo 4 - Valores das diferenças das medidas da PaO₂ (Δ PaO₂) após a indução da SAM.

Tratamento	N	Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
Controle	5	Δ PaO _{2_3}	7.00	6.00	10.98	4.91	-3.00	23.00
		Δ PaO _{2_4}	30.80	14.00	56.58	25.30	-17.00	129.00
		Δ PaO _{2_5}	16.80	16.00	51.13	22.87	-29.00	99.00
Surfactante+PEG	6	Δ PaO _{2_3}	6.17	4.00	8.64	3.53	-2.00	21.00
		Δ PaO _{2_4}	13.83	9.50	23.94	9.77	-7.00	55.00
		Δ PaO _{2_5}	5.67	14.00	23.98	9.79	-25.00	27.00
Surfactante	5	Δ PaO _{2_3}	9.72	12.00	12.51	5.59	-9.40	21.00
		Δ PaO _{2_4}	13.78	8.00	24.81	11.09	-8.10	56.00
		Δ PaO _{2_5}	40.60	5.00	82.30	36.80	-7.00	187.00

Anexo 5 - Valores das gasometrias e ΔPaO_2 (médias \pm desvio padrão) e comparação entre os grupos.

Gasometria	Variável	Tratamento			p
		Controle	Surfactante+PEG	Surfactante	
Pré-Mecônio	PaO ₂	353 \pm 29.60	263.5 \pm 86.84	305.6 \pm 100.24	0.2132
	PaCO ₂	34.74 \pm 10.53	31.83 \pm 10.83	31.80 \pm 9.15	0.8708
	pH	7.47 \pm 0.14	7.5 \pm 0.08	7.51 \pm 0.08	0.7834
Pós-Mecônio	PaO ₂	59.8 \pm 12.68	55.17 \pm 17.19	58.4 \pm 20.96	0.9006
	PaCO ₂	80.2 \pm 40.12	68.33 \pm 24.43	77.4 \pm 51.97	0.8721
	pH	7.18 \pm 0.21	7.21 \pm 0.10	7.21 \pm 0.20	0.9677
30 minutos pós-tratamento	PaO ₂	66.8 \pm 21.12	61.33 \pm 16.18	68.12 \pm 19.41	0.8172
	ΔPaO_2	7 \pm 10.98	6.17 \pm 8.64	9.72 \pm 12.51	0.8535
	PaCO ₂	77.32 \pm 38.69	75.17 \pm 19.37	73.94 \pm 40.43	0.9868
	pH	7.24 \pm 0.18	7.18 \pm 0.11	7.23 \pm 0.20	0.7788
3 horas pós-tratamento	PaO ₂	90.6 \pm 68.12	69 \pm 24.46	72.18 \pm 34.83	0.7108
	ΔPaO_2	30.8 \pm 56.58	13.83 \pm 23.94	13.78 \pm 24.81	0.7073
	PaCO ₂	86.8 \pm 40.08	89.5 \pm 35.69	83.82 \pm 44.19	0.9727
	pH	7.18 \pm 0.18	7.12 \pm 0.13	7.18 \pm 0.21	0.7529
6 horas pós-tratamento	PaO ₂	76.6 \pm 48.04	60.83 \pm 19.18	99 \pm 94.17	0.5865
	ΔPaO_2	16.8 \pm 51.13	5.67 \pm 23.98	40.6 \pm 82.3	0.5911
	PaCO ₂	103.4 \pm 64.13	135.83 \pm 59.79	83.3 \pm 46.45	0.3390
	pH	7.15 \pm 0.30	6.96 \pm 0.21	7.14 \pm 0.31	0.4469

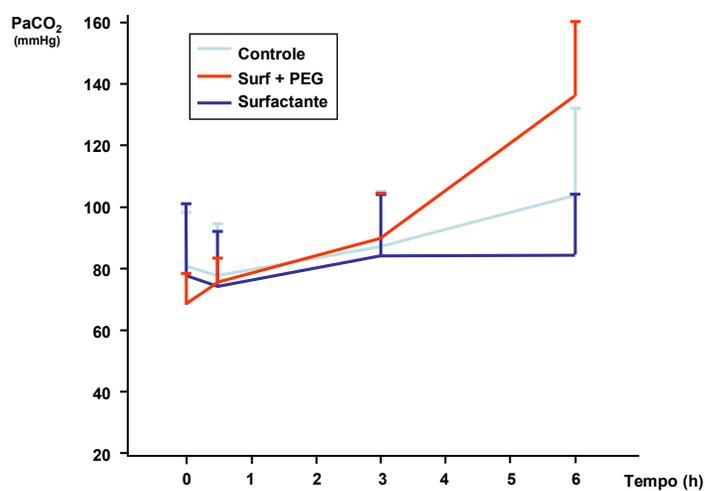
Anexo 6 – Gráfico das medidas repetidas das PaCO₂ (mmHg)

Figura 1. Evolução das médias (\pm dp) dos valores da PaCO₂ durante o experimento nos três diferentes grupos após a indução da SAM, mostrando que os valores não se alteraram ao longo do estudo ($p \geq 0,339$).

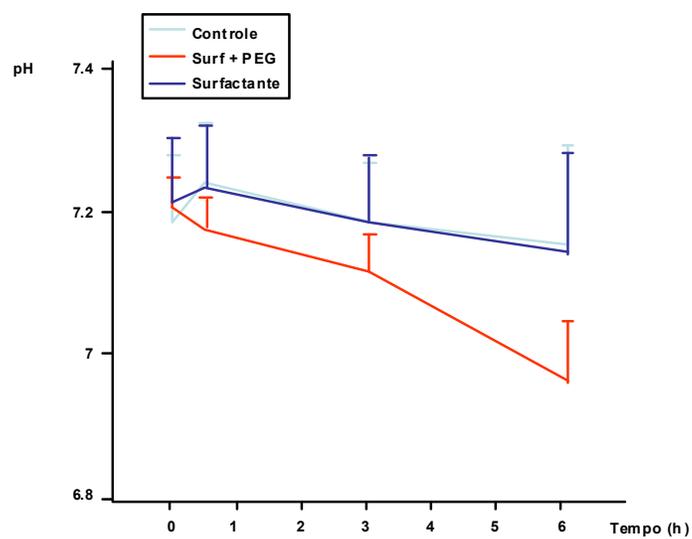
Anexo 7 – Gráfico das medidas repetidas dos pH

Figura 2. Evolução das médias (\pm dp) do pH durante o experimento nos três diferentes grupos após a indução da SAM ($p \geq 0,4475$).

Anexo 8 – Resultados da ANOVA multivariadas para medidas repetidas dos valores da PaO₂ , PaCO₂ , pH e da variação da PaO₂ (Δ PaO₂).

Efeito	PaO ₂	PaCO ₂	pH	Δ PaO ₂ *
Tratamentos	p=0,8502	P=0,8084	p=0,6317	p=0,8154
Tempo	p=0,8076	P=0,2314	p=0,3168	p=0,6056
TratamentosxTempo	p=0,5596	P=0,5038	p=0,4712	p=0,5164
Covariável **	p=0,0691	P=0,2775	p=0,4414	p=0,1218
Teste de Esfericidade	p<0,0001	P=0,0077	p<0,0001	p=0,0457

* Δ PaO₂ - diferença entre os valores da PaO₂ antes da SAM com os valores subseqüentes.

++ covariável utilizada foi PaO₂ antes da indução da SAM.

Anexo 9 - Protocolo de Anestesia

PORCO # PESO: DATA.../.../....

ANESTESIA

1. dose inicial de cetamina 2 mg/kg

2. fentanila, 5mcg/kg/dose

3 . pancurônio 0,1mg/kg/dose

4. fentanila e pancurônio serão repetidos a cada hora para mantê-los anestesiados/ paralisados

CETAMINA

Diluir ___ ml em 9 ml de SF(aplicar 1 ml/kg) : _____ml

FENTANILA

Diluir ___ ml em 9 ml de SF(aplicar 1 ml/kg) : _____ml

PANCURÔNIO

Diluir ___ ml em 9 ml de SF(aplicar 1 ml

Anexo 10 – Dados Gerais sobre os Animais

	PESO (g)
CONTROLES n=5	1700 ± 348,21
SURFACTANTE n=5	1370 ± 454,97
SURFACTANTE + PEG n=6	1360 ± 221.36

	N	Óbitos (horas)	Sem doença	Doses complementares surfactante (n= 16)
Controle	9	2 (>3)	2	2
Surfactante	9	3(>3)	1	3
PEG	8	2* (<2)	0	2
TOTAL	26	7	3	7

* p= 0,2364

* Um óbito ocorreu durante a indução da SAM.

ANEXO 11 - Consistência do Mecônio

PORCO	PELLET (ml) /m l	CONSISTÊNCIA (%)	ÓBITO	DIA
4 (SURFACTANTE)	5,1/6	85	SIM	
5 (SURFACTANTE)*	-----	-----	-----	
7 (SURFACTANTE)	1,4/5,6	25	NÃO	
10 (CONTROLE)	2,3/5,7	40	NÃO	
13 (PEG)	0,9/3	30	NÃO	
16 (SURFACTANTE)	3,2/5	64	NÃO	
20 (CONTROLE)	0,9/5	18	SIM	
21 (PEG)**	1,4/5	28	SIM	¥
22 (CONTROLE)***	1,4/5	28	SIM	¥
25(PEG)***	2,8/5	56	SIM	
27(CONTROLE)	0,7/4	17,5	NÃO	
29(PEG)	0,7/4	17,5	NÃO	
30 (SURFACTANTE)	2/5	40	SIM	§
31 (SURFACTANTE)	2/5	40	SIM	§
32 (PEG)	2/5	40	NÃO	§
33(PEG)	0,5/5	10	NÃO	
36(SURFACTANTE)	0,5/5	10	NÃO	^
37(PEG)	0,5/5	10	NÃO	^
43(CONTROLE)***	4,6/5	92	NÃO	
44 (CONTROLE)*	0,8/5	16	-----	&
45(SURFACTANTE)	0,8/5	16	NÃO	&
46(CONTROLE)*	0,5/5	10	-----	#
47(CONTROLE)	0,5/5	10	NÃO	#
48(CONTROLE)	0,5/5	10	NÃO	
A (PEG)	1,2/5	24	NÃO	+
C (SURFACTANTE)	1,2/5	24	NÃO	+

* Não desenvolveu SAM,

** Óbito na indução da SAM

*** Mecônio "gelatinoso"

¥,§,^,&,#,+: Experimentos realizados no mesmo dia e com o mesmo pool de mecônio