

Susimeire Gomes

**Validação de um modelo suíno da síndrome do
desconforto respiratório agudo (SDRA) grave e
persistente**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Britto Passos
Amato.

**São Paulo
2014**

Susimeire Gomes

**Validação de um modelo suíno da síndrome do
desconforto respiratório agudo (SDRA) grave e
persistente**

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

Programa: Pneumologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Britto Passos
Amato.

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Susimeire

Validação de um modelo suíno da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) grave e persistente / Susimeire Gomes. -- São Paulo, 2014.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Pneumologia.

Orientador: Marcelo Britto Passos Amato.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório do adulto 2.Ventilação mecânica 3.Lesão pulmonar aguda 4.Lavagem broncoalveolar 5.Modelo experimental 6.Modelos animais 7.Unidades de terapia intensiva 8.Surfactantes pulmonares

USP/FM/DBD-354/14

*“Não vos conformeis com este mundo,
mas transformai-vos pela renovação do vosso entendimento”.*
Emmanuel

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”.*
Cora Coralina

Dedicatória

Sergio Gomes e Helena Gomes

*Dedico este trabalho especialmente ao meu pai e minha mãe, os
grandes responsáveis pela minha vida.*

*Gratidão eterna pela educação e pelo exemplo de vida moral, humana
e cristã que me passaram.*

*Meu pai (in memoriam), onde você estiver receba o meu eterno abraço
de amor e gratidão.*

*Minha mãe, obrigada por tudo e principalmente pela dedicação,
carinho e o amor em todos os momentos da minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade da vida e poder participar deste estudo com estes animais que serviram de grande proveito para a ciência e merecem todo o nosso respeito e gratidão.

A minha família, sempre em primeiro lugar pois são as pessoas que me conhecem há muito tempo e sabem realmente o significado de chegar até aqui.

Em especial a minha mãe tão querida, tão linda e ao meu marido Pedroso que tanto me apoiou desde o início dos meus estudos, ainda na faculdade e comigo compartilhou todas as alegrias e as dificuldades, agradeço imensamente pelo amor, pelo carinho, pela paciência e convivência nestes 22 anos.

Meus queridos: irmão Serginho, cunhada Sueli, fofo e lindo sobrinho Gustavo, linda sobrinha Vitória, cunhado César, Kauhe, Karina e a querida e tão especial Júlia, que participaram, apoiaram, respeitaram e sempre tiveram a paciência em dividir os momentos da família com os meus estudos.

Minha querida irmã Silmara que em todo momento esteve ao meu lado me apoiando e me dando todo o carinho necessário para vencer todos os obstáculos da profissão e da vida, não esquecendo é lógico da irmã postiça Cristiane a quem tenho um carinho enorme.

A toda a família Gomes e família Pedroso (especialmente minha cunhada Elza) que sempre demonstraram muito carinho e respeito por mim

e pela minha profissão, escrever o nome de todos seria impossível....Obrigada Família!!!!.

Eu tenho a oportunidade de ter várias famílias e o LIM é uma delas desde 2000, agradecer a todos que estão ou que já passaram no LIM teria que ter outra tese, principalmente se fossemos lembrar dos Sujinhos, das bagunças e comilâncias na minha casa.....mas algumas pessoas são especiais e merecem algumas palavras.....

Neide, Otília e Silvia só tenho que agradecer pela paciência, e pela convivência diária agradeço sempre pelo apoio e pelo carinho.

Aos amigos Vinícius, Marcelinho, Rollin, Miyuki, Shari, Carolzinha, Vivien e Andrea agradeço pelo convívio, pelas brincadeiras e pelo carinho.

A amiga Ozires que depois de tanto tempo voltamos a trabalhar juntas e compartilhar idéias científicas para melhorias e crescimento do LIM 09, é uma pessoa amiga e muito importante que me ajudou muito no período da escrita desta tese.

A querida Tati por todo o carinho e pelas conversas espirituais que tanto me ajudaram.

Não posso deixar de lembrar de grandes amigos que passaram pelo LIM e deixaram marcas de um carinho enorme em meu coração Márcia Souza Volpe, Patrícia Kandermann, Raquel Belmino e Elena Prina.

Aos queridos amigos Mauro Tucci e Eduardo Leite, pessoas especiais que me ajudaram nos momentos de muita dificuldade tanto da tese como

com a minha família. Edu....a dívida é grande!! Espero poder algum dia retribuir todo o carinho pela minha mãe..

As minhas pequenas amigas, pequenas mesmo.....Adriana Hirota e Robertinha, mas com o coração de gigante, grandes profissionais e grandse seres humanos....dois anjinhos que Deus colocou em minha vida sempre dispostas a contribuir com o meu trabalho sem medir esforços. Devo muito a vocês.....turma da madrugada.....Quantas árvores foram abraçadas durante este protocolo.....a Adriana deve saber.

Além de todos os amigos brasileiros e paulistas no decorrer deste estudo muito amigos residentes em outros locais do Brasil e do mundo estiveram presentes a quem tenho que agradecer muito. João Batista brasileiro que me recebeu na Suécia onde deixei um pouco do meu coração gratidão ao professor Göran Hedenstierna, Agneta, Karin, Maria, Nilza e Fernandinho que fizeram parte desta grande fase da minha vida;. aos visitantes Alemães Andreas, Suzi, Sören e Anna, ao meu querido amigo japonês Takeshi Yoshida, pessoa maravilhosa que ficará sempre guardada em meu coração; ao amigo Rollin Roldan grande amigo e um exemplo de grande persistência e especialmente a minha amiga Shirley Campos que não foi somente um pessoa que veio passar uma temporada no LIM se tornou a amiga e a cumadre pessoa muito inteligente a quem eu agradecerei imensamente por estar ao meu lado. .

A família LIM é muito especial....mas existem duas pessoas a quem eu tenho que agradecer muito, muito e muito

Marcelo Amato.....com certeza um ser de muita luz, um grande amigo, uma grande companhia, um grande médico, um grande professor, um grande cientista, mas acima de tudo um grande ser humano humilde.....a frase de Cora Coralina espelha o Marcelo, aprendi muito com ele, apesar de muitas vezes ter que dar umas puxadas de orelhas com carinho. O que mais aprendi, além da experiência científica, foi tentar me tornar um ser humano mais humilde, qualidade muito difícil de se encontrar no meio médico e científico. Quero aprender muito mais e espero que estejamos juntos nos grandes momentos do LIM, nos Sujinhos, nos projetos, nas bagunças da minha casa.....como tivemos até hoje....Obrigada.

Carlos Roberto Ribeiro de Carvalho, Ele, o nosso professor titular, o chefe, o professor, o médico, o administrador, o ser humano portador de grande sensibilidade, esteve comigo em todos os momentos que eu precisei...me salvou muito em várias situações, (inclusive com lençinho de papel), enfim Dr. Carlos eu só tenho que agradecer a oportunidade de ter me aceitado como bióloga e acreditar que eu poderia ser uma pesquisadora científica proporcionado todas as condições para que eu possa crescer profissionalmente e pessoalmente, tudo que eu escrever aqui será pouco para agradece-lo.

A todo o pessoal do departamento de Patologia, Ellen, Ruy, Tatiana, Maina e Dra. Marisa pelo convívio nas madrugadas e pela participação especial na análise histológica deste estudo.

A amiga Denise Frediani e Hermes Barbeiro pela força e pela grande contribuição nas análises de citocinas e proteínas.

Existe uma outra grande família que me sustenta e que me dá forças para vencer a cada dia, a família Perseverança e Amigos do Bem, agradeço imensamente a dona Guiomar, Alcione, Tia Eunice e toda a eLimpeza pelo trabalho espiritual e social com as 2000 crianças, as 10.000 famílias no sertão e a casa Perseverança, graças a Deus tenho este cantinho onde recomponho minhas energias e posso estar sempre bem e disposta para seguir o que está direcionado para minha vida.

Algumas pessoas muito especiais compartilham deste propósito de vida e estão sempre ao meu lado por isso eu não posso esquecer das minhas grandes amigas, Keit, Vivian, Eliete e Eliana.

Esta tese não poderia ser concluída se não tivesse o apoio do departamento de Pneumologia, da Pós graduação na figura do Professor Mario Terra, da Universidade de São Paulo, Diretoria dos Lims, das agências de fomento Fapesp, CNPq e Finep e tantas outras pessoas que eu possa ter esquecido.....

Enfim todo este tempo agregando conhecimentos espero poder retribuir com este trabalho que foi elaborado, executado e finalizado com muito sacrifício, muito trabalho, mas acima de tudo muito carinho.

Gratidão Eterna...

Sumário

Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas e quadros

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	FISIOPATOLOGIA DA SDRÁ.....	2
1.2	- TRATAMENTO SDRÁ - VENTILAÇÃO MECÂNICA	7
1.3	- MODELOS EXPERIMENTAIS DE SDRÁ.....	9
1.4	- MODELOS EXPERIMENTAIS DE SDRÁ DURANTE TEMPO PROLONGADO	14
2	HIPÓTESES	18
2.1	HIPÓTESE - MODELOS EXPERIMENTAL.....	18
2.2	- HIPÓTESE – ESTUDO	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	PRINCIPAL	20
3.2	SECUNDÁRIOS.....	20
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	LOCAL DE ESTUDO	22
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	22
4.3	PREPARO DO ANIMAL	23
4.3.1	Medicação pré-anestésica, higiene e tricotomia	23
4.3.2	- Indução e acesso às vias aéreas.....	23
4.3.3	Ventilação Mecânica	24
4.3.4	Acesso vascular central e arterial	25
4.3.5	Cistostomia.....	25
4.3.6	Traqueostomia.....	26
4.4	MONITORIZAÇÃO	27
4.4.1	Procedimentos hemodinâmicos	27
4.4.2	Monitoração dos gases arteriais	27
4.4.3	Monitorização respiratória	28
4.5	GRUPOS	29
4.5.1	SHAM	30
4.5.2	LESÃO: (etapa lavagem 1 e 2 + VILI).....	30
4.5.3	VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA 40h (VMP40h).....	34
4.6	- FLUXOGRAMA DO ESTUDO	37
4.7	COLETA E ANÁLISE DE DADOS.....	38
4.7.1	Coleta de sangue para hemograma:.....	38
4.7.2	- Tecido Pulmonar:	38
4.7.3	Hemodinâmica:.....	42
4.7.4	Mecânica Respiratória:.....	42
4.8	SACRIFÍCIO E DESCARTE	43
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	–CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS	46
5.2	– TROCAS GASOSAS E MECÂNICA PULMONAR.	56
5.2.1	- Trocas Gasosas	56
5.2.2	- Mecânica Pulmonar	59

5.3	RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	61
5.4	ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA ALVÉOLO-CAPILAR.....	65
5.5	LESÃO HISTOLÓGICA	69
6	DISCUSSÃO	72
6.1	O MODELO.....	72
6.2	LESÃO TECIDUAL.....	75
6.3	ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE DA MEMBRANA ALVÉOLO-CAPILAR	76
6.4	RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	76
6.5	– DISFUNÇÃO FISIOLÓGICA	78
7	- CONCLUSÃO.....	80
8	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

Lista de abreviaturas:

et al. (e outros)

Lista de símbolos:

mmHg (milímetros de mercúrio)

cmH₂O (centímetros de água)

mL (mililitros)

Kg (quilogramas)

cm (centímetros)

pg (picograma)

mg (miligramas)

Lista de siglas:

ARDSnet (do inglês “Acute Respiratory Distress Syndrome Network”)

BAL (*broncoalveolar lavage*)

CCEA (conferência do consenso europeu americano)

ELWI – (*Extra Lung Water index*)

FiO₂ (fração inspirada de oxigênio)

LBA (lavado broncoalveolar)

LPA (lesão pulmonar aguda)

LPIV (lesão pulmonar induzida pelo ventilador)

PaCO₂ (pressão parcial de gás carbônico)

PaO₂ (pressão parcial de oxigênio)

PEEP (pressão expiratória final positiva, do inglês “positive end-expiratory pressure”)

SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo)

TC (tomografia computadorizada)

TIE (tomografia de impedância elétrica)

UTI (unidade de terapia intensiva)

VILI (*Ventilator induced Lung Injury*)

VM (ventilação mecânica)

VM P40hs – Ventilação mecânica protetora 40 h

Lista de Figuras

Figura 1 - Fisiopatologia da SDRA.....	3
Figura 2 -Gráfico de progressão da SDRA ao longo do tempo.....	5
Figura 3 - Cinética de citocinas após a infusão de endotoxina em modelo experimental.....	6
Figura 4 Monitoração e intubação do animal	24
Figura 5 - Animal pronto para início do protocolo	26
Figura 6 Logística do número de animais utilizados no estudo, em azul total de animais em cada grupo, em vermelho animais que apresentaram algum problema, ou animais que foram utilizados para padronização do protocolo, em verde os animais que realmente entraram neste estudo.	29
Figura 7 – <i>Tabela VILI</i> utilizada para controlar os parâmetros ventilatórios baseados na oxigenação durante a ventilação lesiva.....	32
Figura 8-Fluxograma e resumo do protocolo de estudo, em amarelo os momentos que serão comparados e o momento da coleta do tecido em cada grupo.	37
Figura 9 - Pulmão retirado da caixa torácica ao final do protocolo, identificação da regiões para análise de peso seco/úmido, histologia e citocinas.	39
Figura 10 – Caracterização dos animais e da lavagem total pulmonar nos 3 grupos.(média ± erro padrão).....	47
Figura 11 A – Grupo Sham A1=Anterior, A2 =Posteriors, B Grupo Lesão B1= Anterior, B2 Posterior, C Grupo VMP40h, C1= Anterior, C2+ Posterior.....	48
Figura 12 - Evolução daPEEP (média ± padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	49
Figura 13 - Evolução da pressão de platô (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	50
Figura 14 Evolução da Volume Corrente por kg (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	51
Figura 15 – Evolução da temperatura (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	52

Figura 16 - Evolução da frequência cardíaca (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	53
Figura 17 - Evolução da da pressão de artérial média (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.....	54
Figura 18 - Evolução da da pressão de artéria pulmonar média (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	55
Figura 19- Evolução da PaO ₂ /FiO ₂ (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h...	56
Figura 20 - Evolução da PaCO ₂ (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h...	57
Figura 21 - Evolução da PaO ₂ /FIO ₂ (A) e PaCO ₂ (B) Comparação dos animais ..	58
Figura 22 – Evolução da complacência Pulmonar (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.....	59
Figura 23 - Evolução da complacência pulmomonnar Comparação dos animais	60
Figura 24 Figura 5.14 – Polimorfonucleares (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	61
Figura 25Figura 5.15 – Interleucinas 1β, 6 e 8 no BAL(mediana e IQ). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) nos tempos basal lesão e vmp40h	62
Figura 26 – Interleucinas 6 e 8 no tecido (mediana e IQ). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h).....	63
Figura 27 - Níveis de plaquetas (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	64
Figura 28 - Evolução dos níveis de proteína no bal. Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	65
Figura 29 - Dosagem de proteína no Bal (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	66
Figura 30 - Evolução dos níveis de ELWI no sangue. Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.	67

Figura 31 - Peso seco/úmido (media e erro padrão) nos 3 grupos (Sham, Lesão e VMP40h).	68
Figura 32 – Escores histológicos (mediana e IQ) nos 3 grupos (Sham, Lesão e VM40h) em duas regiões pulmonares.	69
Figura 33 - Representação histológica das principais características histopatológicas da SDRA nos grupos SHAM, Lesão e VM40h (aumento 100 x).	70

Lista de Tabela e quadros

Tabela 1 Caracterização dos animais e da lavagem total pulmonar nos 3 grupos.(média \pm erro padrão)	47
Quadro 1 - Nova definição da SDRA[2]	2
Quadro 2 - Principais semelhanças, diferenças e questões técnicas dos modelos de SDRA[22]	11
Quadro 3 - Quadro apresentando os parâmetros ventilatórios utilizados durante todo o estudo.	28

RESUMO:

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) apresenta alta taxa de mortalidade em UTI. Sua principal característica é alteração da permeabilidade da membrana alvéolo capilar, com liberação de agentes inflamatórios, disfunção de surfactantes e da aeração pulmonar, queda da complacência e dos níveis de oxigenação. Frequentemente evolui com necessidade de suporte ventilatório. Vários modelos experimentais foram propostos na tentativa de reproduzir as mesmas características da SDRA encontradas em pacientes, porém com pouco sucesso. Tem sido difícil reproduzir modelos estáveis, e por períodos prolongados. Assim, o nosso objetivo foi validar um novo modelo de SDRA, submetido a um período de observação e estabilização de 40 horas de ventilação mecânica protetora, testando a reprodutibilidade das principais características da apresentação clínica da SDRA. Realizamos o estudo em suínos, divididos em 3 grupos : SHAM (não submetido a Lesão), LESÃO (submetido a lavagem total pulmonar e ventilação lesiva por 3 horas) e VMP40 (submetido a Lesão e 40hs de ventilação protetora segundo a estratégia ARDSNET). Observamos que os níveis de PaO₂ e complacência tiveram queda significativa após a lesão mantendo esta queda ao final de 40 horas. Os níveis de citocinas IL1, IL8 e IL6 tiveram um aumento significativa logo após a lesão, mantendo aumento significativo de IL1 e IL8 nas 40 horas de observação. Os níveis de polimorfonuclear no bal também tiveram um aumento significante, mantido

nas 40 horas. Uma significativa alteração da permeabilidade alveolo-capilar foi demonstrada pelo aumento de proteínas no lavado broncoalveolar, aumento da água extravascular pulmonar, e aumento da relação peso seco/úmido que foram persistentes após 40hs da estratégia protetora ARDSnet. A lesão histológica foi evidenciada pela presença de todos os componentes clássicos: membrana hialina, hemorragia alveolar, infiltrado inflamatório e edema alveolar, também mantidos por 40hs. Conclusão: O modelo desenvolvido apresentou características clínicas e fisiopatológicas similares a pacientes com SDRA grave, mantidas por um período de 40 horas de ventilação protetora, mostrando assim que este modelo pode ser utilizado para estudos de SDRA e estratégias de ventilação mecânica protetora por período prolongado.

ABSTRACT:

Validation of severe and persistent acute respiratory distress syndrome (ARDS) porcine model

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) has high mortality in the ICU. Its main features comprise the disruption of the alveolo-capillary membrane with permeability alterations, release of inflammatory agents, and physiological dysfunctions like surfactant function degradation, loss of compliance and reduced PaO₂ levels demanding ventilatory support. Several experimental models were developed in an attempt to simulate the same characteristics of ARDS in patients, but could not reproduce the complex, florid characteristics or the persistent damage for long periods. This study aimed to validate a new ARDS model in our laboratory, submitted to an stabilization/observation period of 40 hours period of protective mechanical ventilation (according to the protective ARDSnet strategy), during which we tested the persistence of the main physiopathological characteristics of ARDS. We conducted the study in pigs divided into 3 groups : SHAM (not injured), INJURY (total lung lavage and injurious mechanical ventilation for 3hs) and MVP40 (injury protective mechanical ventilation for additional 40hs- ARDSNET strategy). Respiratory-system compliance and PaO₂ significantly decreased after injury, with a persistent drop till the end of 40hs. The levels of IL1, IL6 and IL8 cytokines presented a significant increase immediately after injury, with persistent levels of IL1 and IL8 after 40hs. Polymorphonuclear cells in the BAL were also increased after injury, with

persistent levels after 40 hours. Gross alterations in the alveolo-capillary permeability were demonstrated by increased levels of proteins in the bronchoalveolar lavage, increased extravascular lung water and an increased wet/dry lung-weight ratio that remained elevated after 40hs of protective strategy. Histological injury was confirmed by visualization of hyaline membranes, frequent alveolar hemorrhage, alveolar edema and massive inflammatory infiltration. Conclusion: The proposed model reproduced the clinical and physiopathological alterations found in patients with ARDS. The alterations persisted for at least 40hs of protective ventilation strategy. Thus, this model can be used for long term studies of ARDS and protective ventilation strategies.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Ashbaugh em 1967 publicou a primeira descrição da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), caracterizada como um quadro de início agudo com infiltrado bilateral observado na radiografia de tórax, hipoxemia refratária e complacência pulmonar reduzida porém, até hoje a SDRA ainda continua sendo alvo de intensa investigação.[1]

Com o objetivo de melhorar a definição, determinar o grau de gravidade e estabelecer o tratamento da SDRA foi publicada em 2012 uma nova definição [2] baseada no grau de intensidade de alguns sinais clínicos, estratificando a SDRA como leve, moderada e grave (quadro 1). Preenche os critérios de SDRA os pacientes com doença pulmonar de instalação aguda (menor que 7 dias) apresentando opacidade bilateral na radiografia de tórax, não resultante de derrame pleural ou atelectasia, com edema pulmonar de origem não explicada por hipervolemia ou causa cardíaca e que tenham fator de risco para a ocorrência da síndrome.[2]

SDRA	Oxigenação
Leve	$200 < PaO_2/FiO_2 \leq 300 + PEEP/CPAP \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Moderada	$100 < PaO_2/FiO_2 \leq 200$ com $PEEP \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Grave	$100 < PaO_2/FiO_2$ com $PEEP \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

Quadro 1 Nova definição da SDRA[2]

1.1 Fisiopatologia da SDRA

A nova definição da SDRA facilitou o diagnóstico, porém o conhecimento da fisiopatologia e seu tratamento ainda permanecem obscuros ou em contradição, mas o que se sabe é que o comprometimento da barreira alvéolo-capilar com alteração da permeabilidade da membrana e consequente extravasamento de líquido para o interstício pulmonar é a sua principal característica. Quando a quantidade de líquido extravasado ultrapassa a capacidade de drenagem linfática, forma-se o edema intersticial. A instalação do edema terá como resultado o aparecimento de dispnéia de instalação rápida que vem acompanhada de infiltrado difuso associado à diminuição de complacência do sistema respiratório e aumento do *shunt* pulmonar, [3, 4].

A alteração fisiopatológica pode ser observada na figura abaixo.

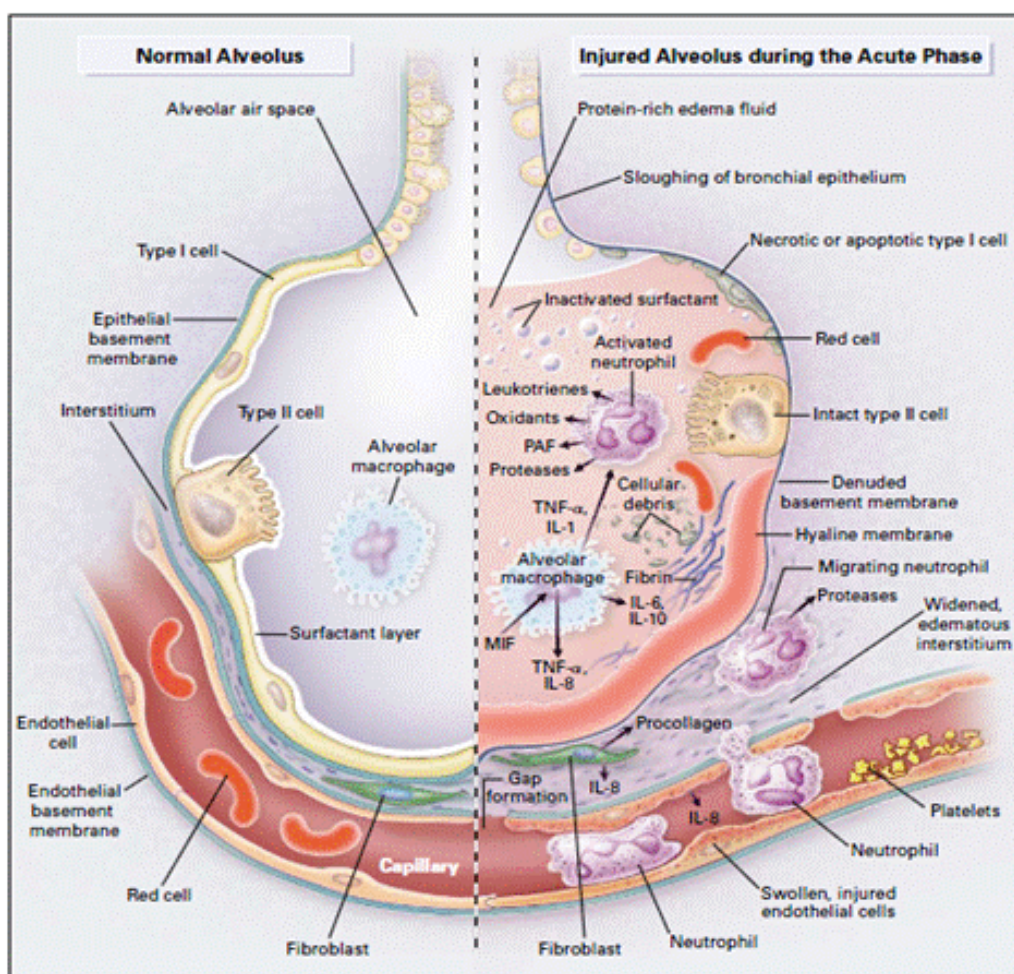


Figura 1 - Fisiopatologia da SDRA

A evolução de todo este processo acontece em 3 fases distintas conforme mostra a figura 2. As fases fibroproliferativa e fibrótica que sucedem à inflamatória tornam o quadro mais prolongado e de difícil tratamento [5].

A fase exsudativa ou inflamatória, é o início da SDRA. Nela há um grande influxo de líquido rico em proteínas, inicialmente para as paredes alveolares e depois para o espaço alveolar. O acúmulo deste líquido rico em fibrina decorrente da quebra de integridade da barreira alvéolo-capilar, tanto pela lesão endotelial quanto pela epitelial propicia à formação da membrana

hialina na superfície alveolar. O infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos e participação de macrófagos ocupa todo o espaço alveolar o que, associado à lesão dos pneumócitos tipo II inativam a produção de surfactante promovendo áreas de atelectasia e redução das trocas gasosas levando a insuficiência respiratória grave. A duração desta fase é em torno de 7 dias. A maioria dos pacientes que melhoram do quadro de SDRA nesta fase apresentam resolução completa da lesão pulmonar, pois com o controle do processo inflamatório, o edema é reabsorvido pelo epitélio cuja integridade é inicialmente restaurada pelos pneumócitos tipo II que depois irão se diferenciar em pneumócitos tipo I. [4, 5]

Na fase fibroproliferativa há a diminuição do edema, acúmulo de miofibroblastos e produção de matriz extracelular no interior dos alvéolos, que ficam preenchidos por tecido conjuntivo. Nas paredes alveolares ocorre hiperplasia de pneumócitos tipo II e acúmulo de colágeno e fibronectina. [5, 6]

Em aproximadamente 5% dos pacientes a fase fibroproliferativa pode evoluir para fibrose, em geral com um padrão difuso de espessamento das paredes alveolares. Os pacientes manifestam alterações mecânicas, bioquímicas e histológicas evidenciadas pela fibrose com a presença de colágeno, hipoxemia progressiva e falência de múltiplos órgãos resultando em 80% de mortalidade nesta fase. [5, 6]

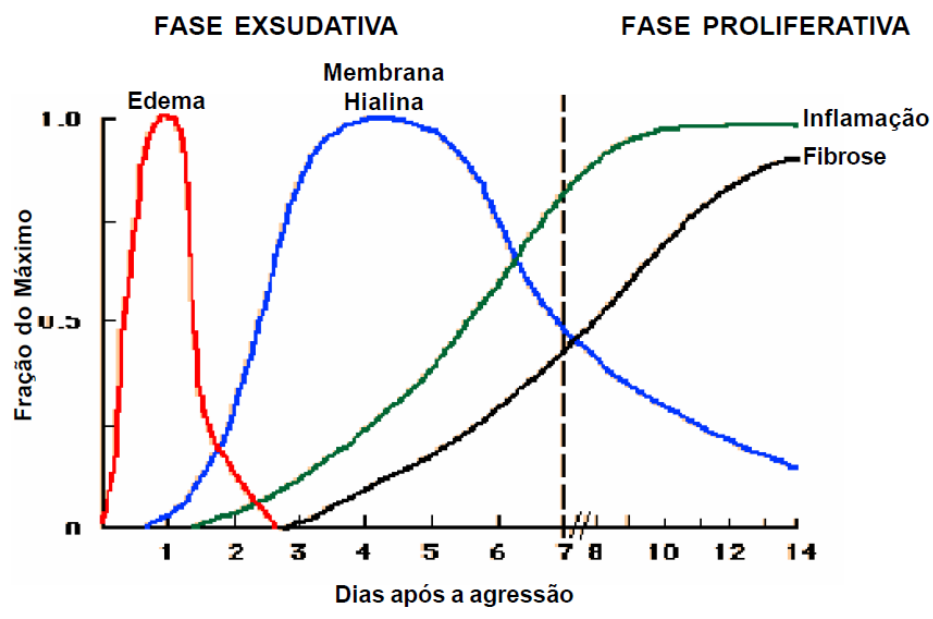
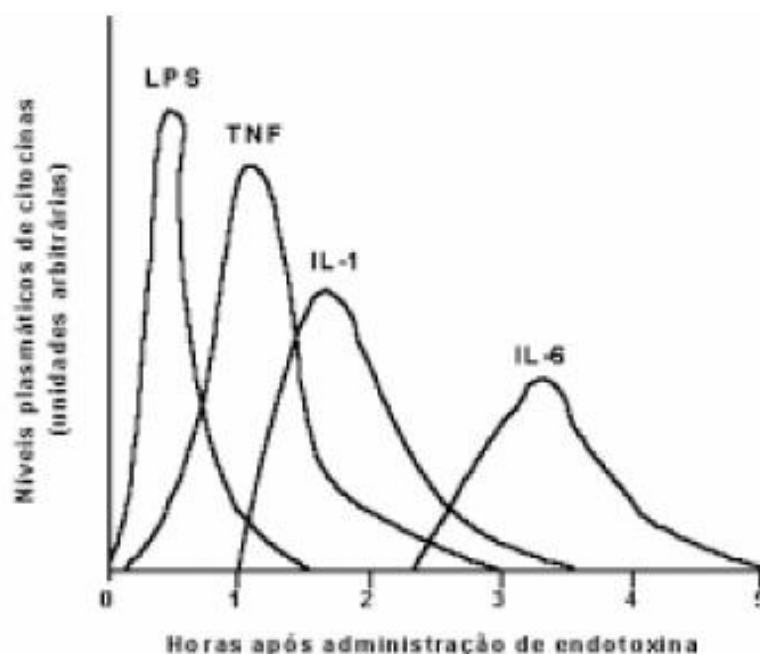


Figura 2 -Gráfico de progressão da SDRA ao longo do tempo

Durante todo o processo da instalação e evolução da doença muitos marcadores, sejam inflamatórios, anti-inflamatórios, fibróticos ou de reparo, são liberados como indicadores do início do processo. [7]

Estudos clínicos de SDRA sugerem que o aumento da taxa de mortalidade está relacionado aos níveis elevados de citocinas no curso da doença. Altas concentrações de citocinas IL1 β , TNF α , IL6 e IL8 no sangue e no Lavado Broncoalveolar (LBA) foram encontradas em pacientes que evoluíram para óbito. [7, 8]. Isso pode ser explicado porque as citocinas são proteínas produzidas por diversos tipos celulares agindo com pró-inflamatórias, desencadeando o processo inflamatório ou até mesmo como anti-inflamatório. De qualquer forma, elas são responsáveis por manter a organização da resposta inflamatória e podem interagir com diversos receptores de superfície sinalizando eventos que resultam em síntese de novas proteínas ou estímulos de novas citocinas (figura 1.3).



Fonte: Abbas¹⁵ (1994)

Figura 3 - Cinética de citocinas após a infusão de endotoxina em modelo experimental

Cada citocina possui uma ou várias funções específicas: a Interleucina 8 é um citocina proinflamatória e quimiotática responsável pelo sequestro de neutrófilos para o espaço alveolar, portanto está diretamente ligada aos níveis de polimorfonucleares encontrados no Lavado Broncoalveolar (LBA)[9, 10]; a interleucina IL1 β está relacionada ao mecanismo de reparo com o estímulo da formação fibroblástica e redução do edema [11, 12]; a interleucina IL6 possui a propriedade pleiotrópica podendo ser proinflamatória, controlando a resposta inflamatória local na fase aguda ou anti-inflamatória, dependendo do receptor ativado, exibindo um efeito regenerativo na resolução do processo inflamatório.[13, 14]

O descontrole de todo o processo envolvendo estas citocinas e outros marcadores pode resultar em excessiva amplificação da cascata de

inflamação e super produção de marcadores inflamatórios que, conseqüentemente, ativarão o sistema imune, levando ao desbalanço no sistema vascular de coagulação, insuficiência renal e pancreatite aguda, principiando a falência de múltiplos órgãos[8] [12].

Em vista dos agravantes da doença existe a necessidade primária de suporte ventilatório, sendo esta a principal forma de tratamento

1.2 - Tratamento SDRA - Ventilação mecânica

O objetivo principal da Ventilação Mecânica (VM) é promover as condições necessárias para que haja uma perfeita troca gasosa, porém alguns estudos sugerem que a VM pode causar um dano alveolar estrutural e funcional através da lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV), termo mais utilizado em inglês *VILI (Ventilator-induced lung Injury)*. [15]

Os principais mecanismos da LPIV são barotrauma ou volutrauma ocasionado pela hiperdistensão alveolar, o atelectrauma ocasionado pela PEEP e volume corrente baixos e o biotrauma ocasionado pela liberação de mediadores inflamatórios levando a conseqüências sistêmicas. [15]

Dreyfuss *et al* [16] em 1985 mostraram que ventilando ratos com 45cmH₂O, usando PEEP mais baixas ou ZEEP, o edema pulmonar e a permeabilidade de membrana aumentavam, fatos evidenciados pelos níveis de proteínas alveolares.

O estudo de Halter *et al*, mostrou em modelo animal de SDRA com *Tween* que durante a VILI ocorre a instabilidade alveolar (recrutamento e

derecrutamento) sendo que a partir das três primeiras horas a lesão é causada pelo processo inflamatório, levando em conta a utilização de PEEP baixa e volume corrente (V_T – do inglês *tidal volume*) alto.[17]

Assim, na tentativa de diminuir o dano alveolar ocasionado pela VM e consequente diminuição da taxa de mortalidade da SDRA na UTI, alguns estudos clínicos foram realizados[18, 19]. O estudo de Amato *et al* [19] conseguiu diminuir a mortalidade da síndrome utilizando a estratégia “*Open Lung Approach*”, que associava o uso de baixo V_T com PEEP titulada pela curva pressão-volume, visando manter o pulmão recrutado. O grupo americano ARDSNET [18] também publicou uma nova estratégia tendo como base o uso de baixo V_T (6mL/Kg ou menor) para manter a pressão de platô menor que 30cmH₂O. Neste estudo o ajuste da PEEP era baseado em uma tabela de PEEP e FIO₂, com objetivo de escolher a menor PEEP para a condição do paciente, o que frequentemente determina atelectasia nesses pacientes.

Jesus Villar em 2014 fez uma revisão sobre a incidência de SDRA após a publicação da estratégia ARDSNET utilizando a nova definição de Berlin e mostrou que a incidência e a mortalidade da SDRA não foram alteradas após este estudo e a taxa de mortalidade ainda continua maior que 40%[20]

Estudos diversos utilizando recrutamento alveolar, PEEP, posição prona , oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO – do inglês extracorporeal membrane oxygenation) e outros foram realizados com o

intuito de determinar o melhor tratamento [2] mas ainda persistem controvérsias sobre qual seria a estratégia de ventilação protetora que poderia beneficiar o paciente sem causar agravamento do seu quadro clínico.

Diante das incertezas e dúvidas que persistem, se torna necessário a realização de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* para testar hipóteses antes de serem avaliadas em seres humanos. Além disso, devido à complexidade do acometimento dos pacientes críticos, a apresentação da SDRA concomitante a outras insuficiências orgânicas e à limitação dos estudos histopatológicos que são realizados somente nos pacientes graves que vão a óbito, o entendimento fisiopatológico do desenvolvimento da doença tem certa limitação nos estudos realizados em seres humanos. Desta forma o uso de modelos animais de SDRA pode fazer a conexão dos estudos em laboratório com estudos clínicos.[21]

1.3 - Modelos Experimentais de SDRA

Os estudos científicos com animais foram datados por volta de 1865 onde Claude Bernard publicou o livro sobre os princípios do uso de animais como modelo de estudo de fisiologia humana, enfatizando a aplicabilidade da experimentação animal ao humanos. As limitações para se investigar uma doença humana podem envolver aspectos éticos ou inerentes à própria doença.

A maior dificuldade nos estudos experimentais com SDRA é estabelecer o modelo que melhor reproduza todas as condições fisiopatológicas, que seja padronizado e de fácil aplicação, dependendo do animal a ser utilizado, não conseguiremos transpor tais resultados para o ser humano. Por exemplo, algumas espécies de animais que possuem macrófagos intravasculares apresentam uma resposta inflamatória diferente dos humanos .[22, 23]

Nos últimos anos vários estudos foram realizados para o melhor conhecimento das semelhanças e diferenças dos modelos animais existentes (Quadro 2).

Wang *et al* [24] em 2008, descreveram os aspectos histopatológicos de três modelos experimentais: 1) lavagem total do surfactante; 2) injeção intravenosa de ácido oleico; e 3) LPS intravenoso (em porcos, cães e ovelha). No modelo de LPS não era claro se a lesão nestes animais poderia causar alterações fibroproliferativas como a da SDRA em humanos. O modelo de lavagem total do surfactante teve como característica principal, a diminuição da complacência pulmonar e a hipoxemia, mas não demonstrava lesão epitelial ou infiltrado neutrofílico que pudesse ser comparado a uma SDRA grave, a menos que uma segunda forma de lesão, tais como endotoxina bacteriana ou ventilação mecânica, fosse associada. O modelo de ácido oleico apresentava características bem semelhantes à SDRA, sendo útil ao estudo das consequências da lesão pulmonar e avaliação de estratégias de tratamento, no entanto, sua etiologia não é comum ser encontrada em pacientes com de SDRA.

Modelo	Semelhanças com SDRA	Diferenças com SDRA	Questões técnicas
Ácido oleico	Fases aguda e de reparação com achados histopatológicos e fisiológicos semelhantes à SDRA humana.	Em humanos, a embolia gordurosa é uma causa rara de SDRA. Não representa modelo de fisiopatologia de SDRA por sepse.	Boa reprodutibilidade. Exige injeção intravenosa de ácido oleico, o que pode ser difícil em pequenos animais.
LPS	Resposta inflamatória neutrofílica com aumento de citocinas intrapulmonares.	Alterações leves na permeabilidade alvéolo-capilar	Muito reprodutível.
Aspiração ácida	Ruptura da barreira alvéolo-capilar com infiltrado neutrofílico.	Humanos aspiram conteúdo gástrico, não é ácido puro.	Muito reprodutível. Estreita diferença entre doses lesivas e não lesivas.
Hiperóxia	Fase aguda da lesão epitelial e infiltrado neutrofílico seguidos de proliferação de células tipo II e cicatrização.	Em pulmões humanos normais, 100% de oxigenação não induziu lesão pulmonar, não é claro se a hiperóxia está envolvida na patogênese da SDRA.	Boa reprodutibilidade. Demanda equipamentos especiais para administrar e monitorar a concentração de gás desejada.
Bleomicina	Lesão inflamatória aguda seguida de fibrose reversível.	Não há formação de membrana hialina. Relevância fisiopatológica não está muito clara.	Boa reprodutibilidade.
Lavagem salina	Depleção de surfactante. Redução de complacência pulmonar. Troca gasosa afetada.	Sem estímulo adicional há uma lesão mínima da permeabilidade e pouco recrutamento de PMN.	Animais precisam ser anestesiados, intubados e ventilados durante todo o procedimento e após.

Quadro 2 Principais semelhanças, diferenças e questões técnicas dos modelos de SDRA[22]

Em 2008, Matute-Bello *et al* [22] descreveram as principais características dos modelos de SDRA mais utilizados na pesquisa científica, sendo que os modelos mais consistentes com as características do humano

foram a fase aguda da instilação de ácido oleico, da aspiração ácida e da hiperóxia. Infelizmente, apenas uma fração dos casos de SDRA é causada pela embolia gordurosa (modelado por instilação de ácido oleico); os seres humanos raramente aspiram suco gástrico com pH igual a 1,5 ou menor e o papel da hiperóxia como causa de LPA/SDRA em seres humanos é incerto. Assim sendo, esses autores concluíram que os modelos animais são de extrema importância para a compreensão da SDRA, porém nenhum dos modelos disponíveis é capaz de reproduzir com exatidão a manifestação da doença [22, 25]

Qual é o melhor modelo animal de SDRA?

Idealmente, os modelos animais de SDRA devem reproduzir os mesmos mecanismos e consequências da doença em humanos, incluindo as mudanças fisiológicas e patológicas que ocorrem, principalmente em relação à alteração da permeabilidade de membrana alvéolo-capilar [21] conforme representado na figura 2.

A melhor forma de definir a lesão em modelos animais seria o desenvolvimento de critérios padronizados para animais, considerando as características específicas de cada modelo[22, 26]

Em 2011, a American Thoracic Society[26] após um workshop, aplicou um questionário para 29 especialistas em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda baseado nas principais características de SDRA, concluindo que um bom modelo animal de SDRA deveria preencher quatro critérios principais.

- Evidência histológica de lesão tecidual (principalmente a formação de membrana hialinae infiltrado neutrofílico);
- Alteração de permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, representada por alteração proteica no lavado broncoalveolar, água extravascular pulmonar e peso seco/úmido
- Resposta inflamatória (níveis alterados de mieloperoxidase, marcadores inflamatórios no tecido pulmonar e sangue)
- Disfunção fisiológica (alteração de troca gasosa)

Sabendo-se que o principal componente do tratamento da SDRA é o suporte ventilatório, estudos experimentais que avaliam estratégias ventilatórias durante longo período de tempo (horas) necessitam utilizar modelos animais de SDRA que preencham os critérios acima.

Alguns autores sugerem que o modelo de lavagem pulmonar é de fácil realização, podendo ser utilizado em várias espécies. No entanto, este modelo isoladamente não representa o quadro típico da SDRA, sendo necessário associá-lo a outro tipo de injúria[27] .

Krause *et al* [10] avaliaram a água extravascular pulmonar em modelo de SDRA, modificando o modelo clássico de lavagem pulmonar acrescentando duas lavagens pulmonares depois de 30 minutos da sequência inicial, baseado na recuperação do sistema surfactante neste período, o que determinou uma lesão um pouco mais grave.

Alguns estudos[14, 26, 28] têm estabelecido modelos associando mais de um tipo de insulto, visando causar uma lesão mais acentuada. Por

exemplo, a lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica fica muito mais grave quando acompanhada de lavagem pulmonar ou pela injeção de LPS [14].

No entanto, quando se associa mais de um insulto é necessário titular o grau de lesão, pois com lesões muito graves, muitos animais morrem devido a insuficiência respiratória, cardiovascular ou barotrauma[21].

Goldman et al verificaram o efeito pleiotrópico da IL6 um modelo utilizando dois tipos de lesão, (LPS e VILI) e demonstraram que a combinação de dois insultos fornece resultados clinicamente relevante refletindo a SDRA em humanos, não observado em modelos únicos. [14]

1.4 - Modelos Experimentais de SDRA durante tempo prolongado

Sabendo-se que o principal componente do tratamento da SDRA é o suporte ventilatório, estudos experimentais que avaliam estratégias ventilatórias por longo período de tempo (horas) necessitam utilizar modelos animais de SDRA que preencham os critérios definidos pela ATS.

O estudo de Spieth et al,[29] comparou duas estratégia de ventilação mecânica protetora (ARDSNET e OLA) por um período de 24 horas de vm utilizando o modelo clássico de lavagem, concluindo que as duas estratégia não apresentaram diferenças na mecânica pulmonar e inflamação, somente o grupo OLA apresentou melhor oxigenação, porém o modelo de lavagem é de fácil recrutamento o que pode ter colaborado para a melhora do grupo em questão.

Muellenbach *et al*, 2009, mostrou o efeito do modelo de lavagem pulmonar em porcos ventilados durante 24 horas demonstrando presença de hipoxemia e níveis elevados de marcadores inflamatórios. No entanto, o colapso pulmonar era facilmente recrutável e as alterações histológicas no tecido pulmonar eram discretas, não reproduzindo as características da SDRA em humanos.[30]

O estudo de Wolf *et al* [31] mostrou alteração histológica com formação de membrana hialina utilizando um modelo de lavagem total pulmonar seguida ventilação lesiva utilizando volume corrente de 20mL/Kg e ZEEP e compararam duas estratégias de ventilação mecânica, a estratégia ARDSNET e a estratégia guiada pelo Tomografia de Impedância Elétrica, durante 6 horas, porém este período foi insuficiente para marcar alguma diferença significativa entre as estratégias.

Assim sendo, com o objetivo de realizar estudos de estratégias ventilatórias durante períodos prolongados em modelo animal de SDRA. Tendo como base os critérios discutidos anteriormente, procuramos desenvolver um modelo experimental em porcos que fosse de fácil reprodução e apresentasse características clínicas de pacientes com da SDRA presente.

Adaptando o modelo de lavagem pulmonar total [10, 32], associamos um modelo de ventilação lesiva (volume corrente elevado com PEEP baixa) que determina lesão pulmonar através da abertura e fechamento alveolar cíclico, liberando, assim, principalmente as citocinas IL 1 β , IL6 e IL8[3, 8, 33]. A ventilação lesiva foi baseada em uma tabela que associa pressões

inspiratórias elevadas com PEEP ajustada para manter a PaO_2 entre 55 e 65 cmH_2O e minimizar o risco de perda do animal.

O desenvolvimento deste modelo faz parte de um projeto maior de nosso grupo que avalia diferentes estratégias de ventilação protetora, utilizando a tecnologia da Tomografia de Impedância Elétrica, com o objetivo de definir estratégias para minimizar a lesão causada pela ventilação mecânica que possam beneficiar os pacientes com SDRA. Este modelo foi de fundamental importância para esses estudos que avaliam longos períodos de ventilação mecânica.

HIPÓTESE

2 -HIPÓTESES

2.1 Hipótese - Modelos Experimental

Um modelo adequado de SDRA, que reproduza a experiência clínica de UTI, deve ser capaz de produzir hipoxemia persistente (por períodos maiores do que 40 horas), associado à persistência de pelo menos um dos componentes de lesão pulmonar (lesão histológica, alteração de permeabilidade e inflamação).

2.2 - Hipótese – Estudo

Um modelo de SDRA que envolva dois componentes de agressão controlada (remoção de surfactante e estresse mecânico), ambos titulados de acordo com a resiliência de cada animal, garantindo uma oxigenação mínima para sua sobrevivência durante o período de lesão, pode ser um ótimo modelo para uso em estudos experimentais de estratégias ventilatórias protetoras por longos períodos (muitas horas ou dias).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Principal

Validar um modelo proposto de SDRA grave, de acordo com as similaridades encontradas em pacientes e testar sua estabilidade em porcos submetidos a protocolos de ventilação mecânica protetora por 40 horas.

3.2 Secundários

Após 40 horas de ventilação mecânica:

- Caracterizar sua repercussão na mecânica do sistema respiratório e nas trocas gasosas
- Caracterizar o processo Inflamatório local e sistêmico
- Caracterizar alterações histológicas no tecido pulmonar
- Caracterizar alterações de permeabilidade na membrana alvéolo-capilar

METODOLOGIA

4 . METODOLOGIA

4.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Pneumologia Experimental LIM-09 do Hospital das Clínicas da no setor - UTI de Animais na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Delineamento do estudo

Utilizamos animais suínos, fêmeas da raça “Landrace”, com peso entre 30-35kg. Os animais foram adquiridos da Granja RG (Mogi das Cruzes) que entregava os animais no dia inicial do experimento, sendo os mesmos sacrificados respeitando a legislação, ***Lei Municipal N° 10.309, de 22 de abril de 1987 e Estadual N° 11.977, de 25 de agosto de 2005***. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPEPesq) do Hospital das Clínicas sob o processo (003/06).

A escolha da espécie suína foi pela grande semelhança morfológica com os pulmões humanos [34] e pela similaridade do comportamento hemodinâmico[35]

4.3 Preparo do animal

4.3.1 Medicação pré-anestésica, higiene e tricotomia

Após contenção manual dos animais, eram aplicadas as medicações pré-anestésica por injeção intramuscular da solução contendo: midazolam 0,5 mg/kg, cetamina 5,0 mg/kg e acepromazina 0,1 mg/kg. Inicialmente, era realizada assepsia com solução degermante de polivinilpirrolidona-iodo (Povidine Degermante®) e álcool, em seguida tricotomia na região lateral dos membros inferiores e posteriores, local onde eram posicionados os eletrodos para a monitorização cardíaca.

4.3.2 - Indução e acesso às vias aéreas

Após sedação e pesagem, os animais eram colocados na mesa cirúrgica em posição supina e eram obtidos os acessos venosos periféricos (auricular direito e esquerdo), por onde eram infundidas drogas sedativas, analgésicas, bloqueador neuromuscular e fluidos.

A indução anestésica era realizada com Propofol 3,0 mg/kg, seguida de intubação orotraqueal com laringoscópio, introdução de cânula traqueal (nº 7,5mm com balonete) (Figura 4.1) e início de infusão venosa contínua de cetamina 1,7mg/kg/h, midazolam 0,3mg/kg/h, fentanila 0,02mg/kg/h e pancurônio 0,4mg/kg/h.

Os níveis de hipnose, analgesia e relaxamento muscular eram avaliados durante o experimento, através de dados indiretos como pressão arterial sistêmica, frequência cardíaca e movimentos do animal.



Figura 4 Monitoração e intubação do animal

4.3.3 Ventilação Mecânica

Após a intubação, os animais eram mantidos sob assistência ventilatória mecânica no aparelho Newport E-500 (Newport Medical Instruments, Inc, Costa Mesa, CA, EUA) em modo pressão controlada com os seguintes parâmetros ventilatórios: volume corrente de (V_T) 8-10 mL/Kg, fração inspiratória de oxigênio (FIO_2) de 1, pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 5 cmH₂O, pressão de platô ($P_{PLATÔ}$) menor que 25 cmH₂O, frequência respiratória (f) entre 20 e 40 (movimentos respiratórios por minuto – rpm) para manter uma PaCO₂ entre 35 a 45 mmHg.

4.3.4 Acesso vascular central e arterial

Antes da obtenção dos acessos centrais era administrado amiodarona (150 mg em 10 minutos) para prevenção de arritmias cardíacas durante a passagem dos cateteres.

O acesso venoso era realizado através de punção das veias jugular esquerda, para administração de cristalóides e colóides e da jugular externa direita para obtenção das medidas de pressão média da artéria pulmonar capturada através do cateter de Swan-Ganz (Edwards® LifeScience, Irvine, EUA), conectados ao monitor multiparamétrico (Dixtal DX2020 – Brasil).

A artéria femoral era puncionada para passagem do cateter conectado ao equipamento PiCCO® plus (Pulsion Medical Systems AG, Munique, Alemanha), para obtenção das medidas de pressão arterial invasiva, água extravascular e coleta de gasometria arterial. A calibração deste equipamento para medidas de água extravascular foi realizada através da técnica de termodiluição transpulmonar. Consistia na instilação de 10 mL de solução salina a 0,9% (temperatura menor que 8°C) pelo cateter venoso central sendo registrada a curva de termodiluição. Este equipamento forneceu parâmetros contínuos como: variação de pressão de pulso e água extravascular pulmonar.

4.3.5 Cistostomia

Foi realizada cistostomia para monitorização de diurese, além de medidas de higiene do local. A técnica utilizada foi uma incisão longitudinal

entre o sexto e sétimo pares de mama; após localização da bexiga era introduzida e fixada uma sonda vesical nº 14, que permaneceu acoplada a coletor próprio até o final do experimento.

4.3.6 Traqueostomia

Após a intubação, era realizada a parte final do preparo (figura 4.2) através de um corte longitudinal na direção do terceiro anel traqueal, era introduzida uma cânula orotraqueal nº 7,5.

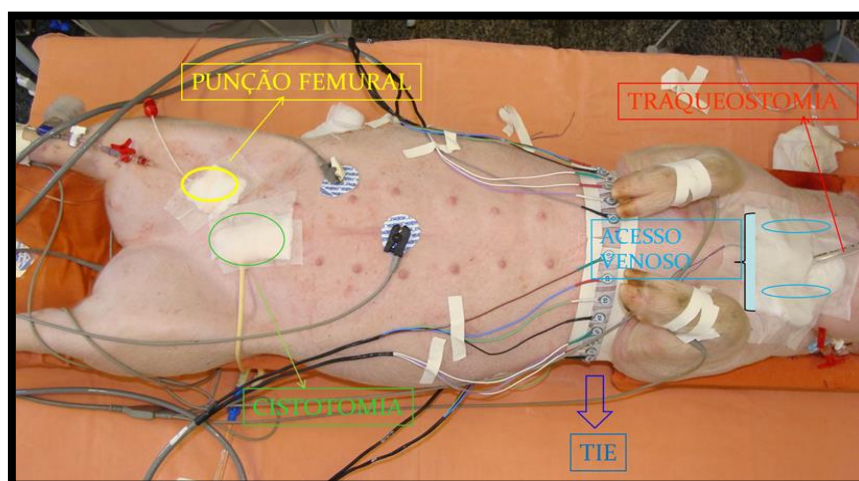


Figura 5 - Animal pronto para início do protocolo

4.4 - Critério de inclusão/exclusão

Após o preparo os animais eram submetidos a uma manobra de recrutamento alveolar utilizando PEEP de 15 cmH₂O e P_{PLATÔ} de 35 cmH₂O durante dois minutos, sendo ventilados com PEEP de 10 cmH₂O e P_{PLATÔ} de 20 cmH₂O e após 10 minutos era obtida amostra de sangue arterial para verificação da análise de gases sanguíneos. Foram considerados animais sem problemas respiratórios quando a soma da pressão arterial de gás

carbônico (PaCO_2) com a pressão arterial de oxigênio (PaO_2) estivesse acima de 400 mmHg. Se a somatória fosse inferior, o animal era excluído do procedimento.

4.4 Monitorização

4.4.1 Procedimentos hemodinâmicos

A “otimização hemodinâmica” (anexo I) foi baseada na obtenção dos seguintes parâmetros:

- Saturação venosa de oxigênio (SvO_2) > 45%
- Pressão arterial média (PAM) > 65 mmHg
- Variação da pressão de pulso < 10 %

Resumidamente, conforme necessário era infundido solução de hidroxietilamida colóide (Voluven®) para manter PAM e variação da pressão de pulso estáveis durante o protocolo. Quando indicado, foram utilizadas drogas vasoativas: noradrenalina (até dose máxima de 200 $\mu\text{g}/\text{min}$) e/ou Dobutamina (5 – 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$).

Detalhes dessa abordagem estão apresentados em fluxograma específico: “ressuscitação hemodinâmica” (anexo II) e foi seguido durante todo o protocolo de estudo.

4.4.2 Monitoração dos gases arteriais

Análise laboratorial e bioquímica foi feita após coleta de sangue arterial em seringa heparinizada, 0,5mL, utilizando o aparelho ABL800FLEX® (Radiometer Medical Aps, Dinamarca). Este aparelho fornecia os dados de pH, PaO_2 , PaCO_2 , HCO_3^- , excesso de base (BE), SO_2 ,

hemoglobina (Hb) e hematócrito (Htc), além de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e lactato.

Um oxímetro de pulso era colocado na cauda do animal, para acompanhamento em tempo real da saturação periférica de oxigênio (SpO₂).

4.4.3 Monitorização respiratória

A ventilação mecânica seguiu o protocolo apresentado no Quadro 3

Etapa do protocolo	PEEP (cmH ₂ O)	PPlatô (cmH ₂ O)	Pressao de Distensao (cmH ₂ O)	FIO ₂ (%)	f	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
Preparo	5	15-20	10-15	1	25		
RECRUTAMENTO – 2 min	15	35	20	1	20		
GASO - INCLUSÃO	10	20	10	1	25	>400	35-45
BASAL	5-10	15-20	10-15	1	25		
LAVAGEM 1	7	30	23	1	25	<100	<50
VILI 30 min	7	42	35	1	20		
RECRUTAMENTO – 2 min	35	50	15	1	20		
LAVAGEM 2	16	31	15	1			
LESÃO - VILI 3 h	TABELA VILI*			1	20	55 - 65	
RECRUTAMENTO – 2 min	35	50	15	1	20		
GASO PADRÃO – lesão I	15	30	15	1	25		
GASO PADRÃO – lesão II	10	25	15	1	25	<100	<50
VMP40h - VENTILAÇÃO MECÂNICA 40h	PROTOCOLO ARDSNET			1	20-40	55-80	35-45
RECRUTAMENTO – 2 min	35	50	15	1	20		
GASO 40h – I	15	30	15	1	25		
GASO 40h – II	10	25	15	1	25		

Quadro 3 apresentando os parâmetros ventilatórios utilizados durante todo o estudo. * Tabela VILI será apresentada a seguir. Em azul momento da análise ao longo do tempo, em amarelo análise no tempo da gasometria padrão

A monitorização da mecânica respiratória era realizada através da captação dos sinais de pressão e fluxo do aparelho NiCO₂(Philips EUA), obtidos pelo sensor previamente calibrado de acordo com as orientações do fabricante. Estes dados foram transferidos ao programa LaBVIEW (National Instruments, EUA) para os cálculos de complacência e resistência do sistema respiratório.

4.5 Grupos

Para o estudo utilizamos 68 animais conforme a figura 4.3, que foram divididos 3 grupos Sham, Lesão e VMP40h descritos a seguir.

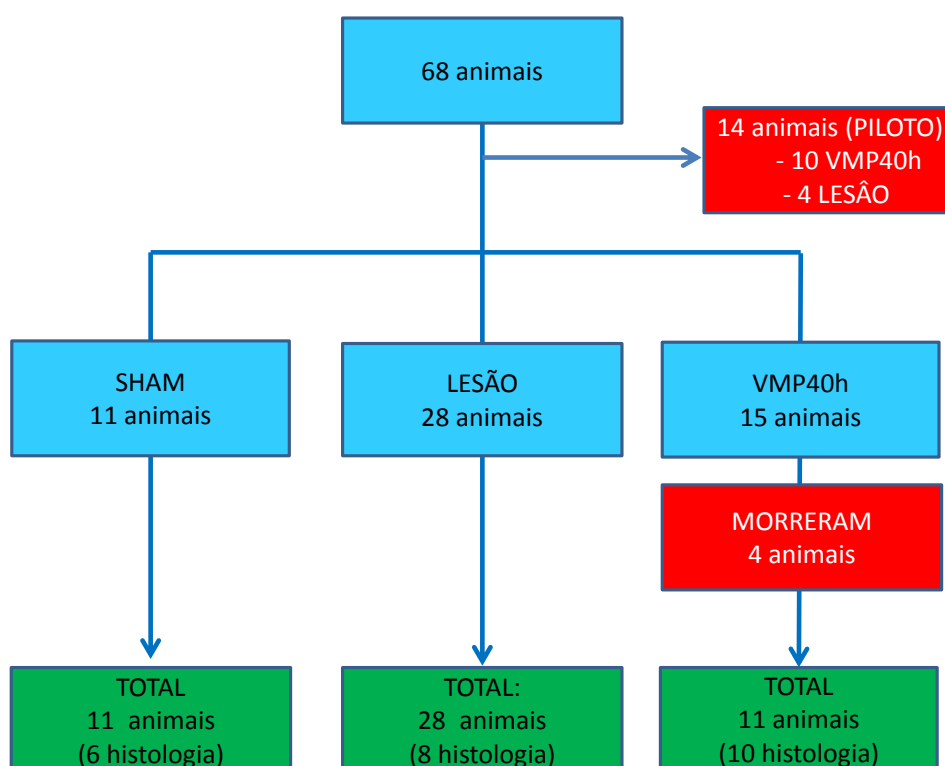


Figura 6 Logística do número de animais utilizados no estudo, em azul total de animais em cada grupo, em vermelho animais que apresentaram algum problema, ou animais que foram utilizados para padronização do protocolo, em verde os animais que realmente entraram neste estudo.

4.5.1 SHAM

Os animais foram anestesiados e preparados conforme o protocolo descrito. Após o preparo, sem indução da lesão pulmonar, os animais foram sacrificados e o pulmão retirado para análise histológica, análise de citocinas e relação peso seco/úmido. O tempo de ventilação mecânica entre o início do preparo e o sacrifício do animal foi de 2 horas. O pulmão de seis desses animais foi enviado para análise histológica.

4.5.2 LESÃO: (etapa lavagem 1 e 2 + VILI)

Neste grupo tivemos 32 animais sendo que 4 animais fizeram parte do estudo para adequação do protocolo de lesão (estudo piloto).

O protocolo de lesão consistia de 4 etapas:

4.5.2.1 Lavagem total pulmonar 1

Após coleta de dados basais e estabilização hemodinâmica dos animais, os parâmetros ventilatórios foram ajustados conforme o Quadro 1 e a lesão pulmonar foi iniciada através da lavagem pulmonar para retirada do surfactante. Esta técnica foi padronizada por Lachmann e colaboradores (Lachmann, 1980 #8) e consistia na retirada do surfactante por meio de lavagens consecutivas com solução salina aquecida.

Com a mesa cirúrgica em posição de *Trendelenburg*, com inclinação de 35 graus e o animal em posição supina, o tubo traqueal foi desconectado do ventilador e realizado a instilação de 30 mL/kg de solução salina aquecida a 37°C através de uma mangueira de 35 cm conectada a um funil.

A seguir, o líquido era drenado, inicialmente pela gravidade e, posteriormente, pela aspiração das vias aéreas com sonda nº 14. Essa era realizada até a obtenção do retorno de pelo menos 90% da solução infundida.

As lavagens eram realizadas em intervalos de 5 minutos, até que se obtivesse uma PaO_2 menor que 100 mmHg estável por no mínimo 10 minutos.

4.5.2.2 Ventilação lesiva durante 30 minutos

Após a detecção dos níveis de PaO_2 abaixo de 100 mmHg, os animais eram submetidos à ventilação lesiva com volume corrente (em torno de 20 mL/kg de peso corpóreo), $P_{\text{PLATÔ}}$ de 42 cmH₂O e PEEP de 7 cmH₂O durante 30 minutos.

Como os animais desenvolviam intensa hipoxemia (saturação abaixo de 70%), ao final do período de 30 minutos era realizada uma manobra de recrutamento alveolar durante dois minutos com PEEP de 35 cmH₂O e $P_{\text{PLATÔ}}$ de 50 cmH₂O.

4.5.2.3 Lavagem total pulmonar 2

O objetivo desta etapa foi retirar o surfactante remanescente e produzido neste período de 30 minutos (Krause, 2005 #133). O procedimento foi o mesmo da lavagem 1, realizado uma única vez, com otimização dos parâmetros ventilatórios (PEEP de 16 cmH₂O e $P_{\text{PLATÔ}}$ de 31 cmH₂O) para melhora da oxigenação.

4.5.2.4 Ventilação lesiva durante três horas (*TABELA VILI*)

Após a lavagem 2, os animais foram submetidos a ventilação lesiva de acordo com a figura 4.4 (*TABELA VILI*) com alto volume corrente (em torno de 20 mL/kg de peso corpóreo) e baixa PEEP durante três horas, visando a uma PaO₂ entre 55-65mmHg. Resolvemos adotar a nomenclatura de LPIV em inglês para facilitar a comunicação.

Exemplificando, quando os níveis de PaO₂ estivessem abaixo de 55 mmHg aumentava-se a PEEP e a pressão de platô correspondente na tabela, quando a PaO₂ estivesse acima de 65 mmHg abaixava-se PEEP e a pressão correspondente. Este procedimento foi seguido durante as 3 horas de ventilação.

The diagram shows a central table with two columns: PEEP (cmH₂O) and Pplat (cmH₂O). To the left of the table is a red arrow pointing upwards, labeled $PaO_2 \leq 55mmHg$. To the right of the table is a red arrow pointing downwards, labeled $PaO_2 \geq 65mmHg$.

PEEP cmH ₂ O	Pplat cmH ₂ O
17	48
15	48
13	48
11	48
9	46
7	44
5	42
3	42
1	42

Figura 7 – *Tabela VILI* utilizada para controlar os parâmetros ventilatórios baseados na oxigenação durante a ventilação lesiva

O tempo de lesão foi baseado em um estudo realizado neste laboratório onde se observou que em três horas de ventilação lesiva havia maior resposta inflamatória representada pela liberação de marcadores inflamatórios (IL8 e IL1) no lavado broncoalveolar [36]

Durante as 3 horas de ventilação lesiva, foi coletado gasometria arterial a cada 15 minutos para controle da oxigenação e eventuais ajustes de pressão (PEEP e Plato), seguindo os seguintes critérios (Quadro 1):

- Ventilação mecânica lesiva por no máximo 3 horas:
 - ✓ PaO_2 mantida entre 55-65 mmHg.
 - ✓ Se $\text{PaO}_2 < 45$ mmHg, a PEEP era elevada em 4 cmH_2O .
 - ✓ Se $\text{PaO}_2 > 80$ mmHg, a PEEP era reduzida em 2 cmH_2O .
- Se após 90 min, a PEEP necessária para garantir a oxigenação mínima atingisse 17 cmH_2O , o procedimento era interrompido e considerava-se a lesão instalada

4.5.2.5 Gasometria Padrão Lesão I e II

Ao final das 3 horas era realizada uma manobra de recrutamento alveolar (MRA) com PEEP de 35 cmH_2O e $P_{\text{PLATÔ}}$ de 50 cmH_2O , durante dois minutos, seguido do ajuste do ventilador para PEEP 15 cmH_2O e a $P_{\text{PLATÔ}}$ em 30 cmH_2O por 10 minutos. Após este tempo era coletada a gasometria e a PEEP era reduzida para 10 cmH_2O e a $P_{\text{PLATÔ}}$ para 25 cmH_2O por 10 minutos. Os dados de gasometria e os parâmetros respiratórios e fisiológicos eram anotados.

Os animais eram considerados com SDRA quando a PaO_2 , na PEEP de 10 cmH_2O , estivesse abaixo de 100 mmHg. Caso esse parâmetro não fosse alcançado, mais uma hora de ventilação lesiva era realizada seguindo os parâmetros da tabela. Ao final desta uma hora, nova gasometria arterial padrão era realizada seguindo os procedimentos descritos acima.

Gasometrias também eram realizadas ao final do protocolo de 40 horas de VM para compararmos a evolução das tocas gasosas.

4.5.3 VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA 40h (VMP40h)

4.5.3.1 ESTRATÉGIA DE VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA

ARDSNET:

A estratégia ARDSNET foi a escolhida por ser reconhecida mundialmente como uma ventilação protetora sendo utilizada na maioria da UTIs.

Neste grupo utilizamos 25 animais, sendo que 10 foram considerados estudo piloto para a padronização dos protocolos de hidratação, ressuscitação, anestesia, ventilação etc, 4 animais morreram nas primeiras 15 horas, (1 caso de embolia gasosa, 3 casos de pneumotórax). Os porcos, após a instalação da lesão, foram ventilados com a "estratégia ARDSnet" [18] durante 40 horas. Ou seja, foi utilizado o modo volume controlado, com volume corrente inicial de 6 mL/kg. A frequência respiratória foi ajustada para manter a PaCO_2 entre 35 e 45 mmHg. O objetivo era manter a pressão

de platô menor ou igual a 30 cmH₂O. A FIO₂ e a PEEP foram ajustadas em conjunto, de acordo com tabela PEEP/FiO₂ (Figura 4.5) ,a fim de obter uma PaO₂ entre 55–80 mmHg ou uma saturação periférica de oxigênio (SpO₂) entre 88–95%. Como ajuste inicial, foi usada uma PEEP de 14 cmH₂O e uma FIO₂ de 1. Os ajustes fisiológicos relacionados com a ventilação foram seguidos de acordo com a descrição protocolada da estratégia ardsnet (anexo III).

FIO ₂	PEEP
0,3	5
0,4	5
0,4	8
0,5	8
0,5	10
0,6	10
0,7	10
0,7	12
0,7	14
0,8	14
0,9	14
0,9	16
0,9	18
1	20
1	22
1	24




Figura 4.5 Tabela PEEP/FIO₂ utilizada na estratégia protetora ARDSNET, a seta vermelha indica qual a PEEP iniciamos o protocolo após a lesão

4.5.3.2 Cuidados adicionais neste grupo

- **Profilaxia de infecção**

Anibiótico durante o período de estudo - ampicilina 1 grama por via endovenosa a cada 6 horas e gentamicina 150 mg/kg por via endovenosa 1 vez ao dia;

- **Profilaxia de Tromboembolismo pulmonar:**

Heparina não fracionada 3.000 UI via SC 12/12 hs;

- **Umidificação das vias aéreas**

Umidificador aquecido;

- **Aspiração de vias aéreas:**

Aspiração por sistema fechado (*“Trach care”*® infantil) somente quando necessário (presença de secreção visível na ausculta pulmonar ou visualizada na curva de monitoramento do ventilador);

- **Nutrição:**

Solução fisiológica glicosada a 5% por SNG 500mL em 24h.

- **Hidratação:**

A solução de manutenção (SG5% 1000mL em 24 h. associado a NaCl 20% 30mL e KCl 19,1% 10mL) era infundida por via endovenosa.

4.6 - Fluxograma do Estudo

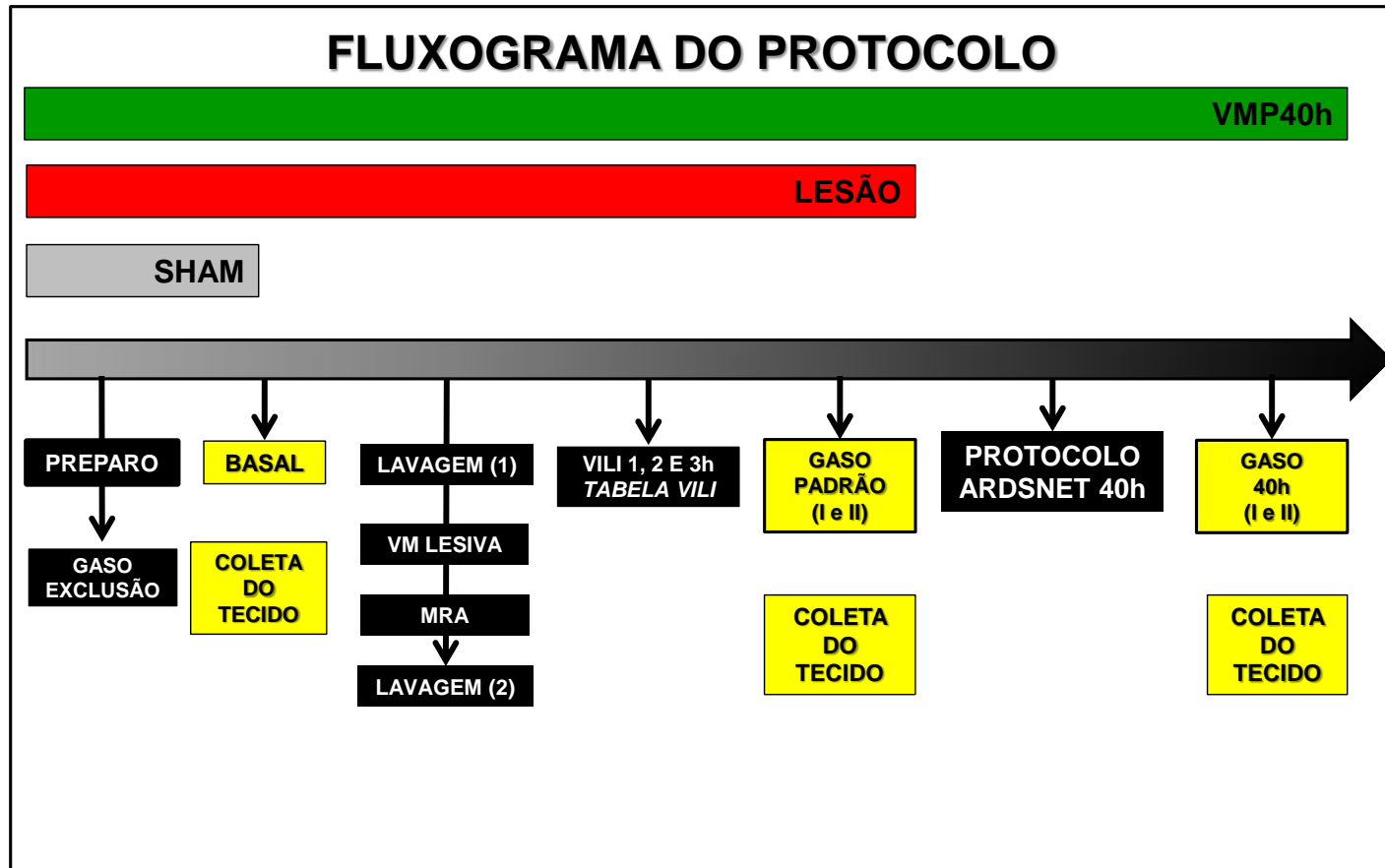


Figura 8-Fluxograma e resumo do protocolo de estudo, em amarelo os momentos que serão comparados e o momento da coleta do tecido em cada grupo.

4.7 Coleta e Análise de Dados

4.7.1 Coleta de sangue para hemograma:

O sangue foi coletado em tubo contendo EDTA, em seguida encaminhado para o laboratório do Instituto Central do Hospital das Clínicas para ser processado e realizado o exame de hemograma e dosagem de plaquetas. Esta coleta foi realizada nos tempos basal, gaso padrão lesão II, 0, 3, 6, 12, 24, h e gaso 40h II.

4.7.2 - Tecido Pulmonar:

4.7.2.1 Exsanguinação

Ao final do protocolo de lesão/ventilação os animais receberam uma dose adicional de sedação endovenosa. Na sequência, foram exsanguinados por canulação da aorta abdominal, seguido de esternotomia mediana para acesso aos pulmões. No momento da retirada, o pulmão foi mantido em pressão positiva contínua de 10 cmH₂O. Os pulmões foram retirados em bloco (figura 4.7), juntamente com o tubo traqueal, e submetidos a uma manobra de recrutamento pulmonar fora da caixa torácica com pressão inspiratória de 25 cmH₂O por 1 minuto. Após esta manobra, o tubo traqueal era pinçado e a cânula desconectada do ventilador mecânico. Em seguida, o brônquio fonte direito era clampeado e seccionado. Do pulmão direito eram retirados fragmentos das regiões do lobo médio, anterior e posterior e armazenados temporariamente em nitrogênio líquido e

transportados para freezer mantido em temperatura de -80°C até o momento da análise de citocinas.

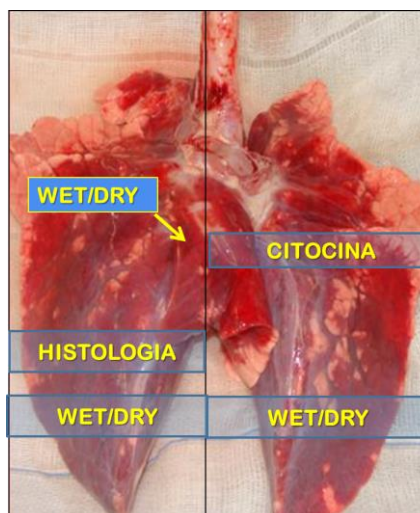


Figura 9 - Pulmão retirado da caixa torácica ao final do protocolo, identificação da regiões para análise de peso seco/úmido, histologia e citocinas.

4.7.2.2 Histologia

Após a dissecação, o bloco contendo traqueia, brônquio fonte esquerdo e o pulmão esquerdo foi conectado a um sistema pressurizado e o pulmão recrutado com formalina tamponada a 10% a uma pressão de 25 cmH₂O. O bloco foi mantido ligado ao sistema a uma pressão 10 cmH₂O para fixação dos tecidos por 48 horas. Em seguida, o pulmão foi seccionado e fragmentos das regiões anteriores e posteriores foram coletados, processados rotineiramente e embebidos em parafina para representação histológica. Cortes histológicos sagitais com 5 μm de espessura de cada região foram corados por Hematoxilina & Eosina para avaliação histológica.

A análise semi-quantitativa foi realizada observando 10 campos de cada lamina corada com HE, em aumento de 100 e 400x.

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz por patologista experiente em afecções pulmonares. Foram analisados cinco parâmetros histológicos em cada região representada (regiões dependente e não-dependente do ápice e base do pulmão esquerdo), sendo eles:

- 1) exsudato neutrofílico: neutrófilos presentes no interstício pulmonar e nos lúmens alveolares;
- 2) membrana hialina: extensão do parênquima alveolar comprometido por membrana hialina;
- 3) edema peri-vascular: avalia a intensidade da expansão da adventícia vascular e linfáticos peri-vasculares por edema;
- 4) hemorragia intraalveolar: avalia a extensão do parênquima alveolar comprometido por hemorragia recente;

De acordo com a intensidade dessas alterações, o patologista atribuiu um valor para cada parâmetro: 0, ausência; 1, mínimo (focal); 2, leve; 3, moderado; 4, intenso. Era definido, dessa forma, o escore de gravidade da lesão pulmonar em cada região examinada.

4.7.2.3 Citocinas no Tecido :

O tecido pulmonar era previamente macerado e pulverizado através da técnica com nitrogênio líquido e mantido em solução tampão até o momento da análise, pelo método de Elisa, utilizando-se kits comerciais da marca R&D para dosagens de IL8 e IL6. A leitura das placas era realizada no aparelho Spectra Molecular Device (EUA). As dosagens de IL1 β foram realizadas através do método Luminex. A Tecnologia Luminex™ xMAP baseia-se no uso de microesferas recobertas com anticorpos específicos

analisadas em um sistema de lasers óticos, utilizamos kit Cytokine/Chemokine-Millipore PCYTMAG, devido a sua maior sensibilidade para esta citocina.

A normalização dos resultados era realizada através da dosagem de proteína realizada no mesmo material biológico, pelo método tradicional de Bradford [37]

4.7.2.4 Peso Seco/Úmido – (Wet/Dry)

Utilizamos seis animais de cada grupo para a análise de edema através da técnica de peso seco/úmido [17]. Para isso retiramos um fragmento de 10cmx5cm dos lobos direito, esquerdo e acessório e mantivemos em freezer a -20°C até a análise. O fragmento era pesado e colocado em estufa com temperatura controlada a 60°C. Novas pesagens eram feitas a cada 24 horas e após um período de 72 horas era calculada a relação entre o peso final e inicial.

4.7.2.5 Lavado Broncoalveolar :

A coleta do lavado broncoalveolar (BAL) era realizada com o auxílio de broncoscópio flexível de 5mm de diâmetro (BF30, Olympus® EUA) impactado no brônquio do lobo médio. Para a realização do lavado, foram instiladas 3 alíquotas de 20mL de solução fisiológica no segmento, seguido da aspiração do conteúdo que era transferido para um tubo de 50 mL (Falcon®) e homogeneizado de forma simples. A seguir, 15 mL do material

era separado para análise citológica total e diferencial e o volume restante era centrifugado (por 10 minutos em 3000-3500 rotações por minuto), aliquotado em tubo 1,5-2mL (eppendorf®) e armazenado em freezer em temperatura de -80°C até o momento da dosagem de citocinas. As análises de citocinas IL6 e IL8 foram realizada através da técnica de ELISA, utilizando-se kit comercial R&D® e para dosagem de IL1 β foi utilizada técnica luminex.

A citologia do BAL foi analisada através de técnicas padronizadas no Instituto Central do Hospital das Clínicas. A coleta do Bal foi realizada nos tempos basal, gaso padrão II, 0h, 6, 12, 24, 36h e 40h II

A análise proteica do lavado broncoalveolar era realizada através do método de Bradford.[37]

4.7.3 Hemodinâmica:

Os dados hemodinâmicos foram coletados de forma contínua, havendo a calibração da água extravascular do equipamento PICCO nos momentos basal, pós lavagem 1, pós 30 minutos lavagem 1, pós lavagem 2, a cada hora durante a ventilação lesiva, durante todo o protocolo vm40h e nas etapas da gasometria padrão I e II.

4.7.4 Mecânica Respiratória:

Os dados de pressão, fluxo e volume foram coletados através do sensor conectado ao aparelho NiCO₂ e armazenados em computador, pelo programa de aquisição desenvolvida em linguagem LABVIEW®. Estes

dados foram analisados *off-line* em sistema de análises desenvolvida em LABVIEW®. Este software permitiu a escolha de ciclos respiratórios e a criação de um ciclo respiratório médio, a partir do qual era obtidas a medida de mecânica respiratória (complacência).

4.8 Sacrifício e descarte

Após o sacrifício, o animal era envolto em um saco plástico branco leitoso, próprio para descarte de materiais infectantes e identificado. Posteriormente, era transportado e depositado no coletor de lixo da Central de Lixos Infectantes da Faculdade de Medicina da USP, onde era encaminhado pra incineração pela empresa coletora.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o pacote estatístico SPSS para Windows versão 17 (SPSS, Chicago, EUA). Foram consideradas significantes as análises com $P < 0,05$.

As variáveis foram testadas para normalidade e expressas como média \pm erro padrão ou mediana e intervalo interquartil (IQ; percentil 25-75%) conforme o caso.

Para as análises das variáveis fisiológicas no tempo, foram avaliados os animais do grupo lesão e VMP40h, sendo utilizado uma análise multivariada de regressão linear mista (“mixed model”), comparando três tempos (Basal, Vili3h e 40h). Foi realizada uma análise post hoc com correção de sidak para a comparação entre esses três tempos.

Para as variáveis relacionadas ao tecido pulmonar (histologia, peso seco/úmido e as interleucinas no tecido), também foi utilizado uma análise multivariada de regressão linear mista (“mixed model”). Dois fatores foram avaliados: o grupo (Sham, Lesão e VMP40h) e região (anterior e posterior). Foi realizada uma análise post hoc com correção de sidak para a comparação desses fatores.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com a evolução temporal do grupo lesão e do grupo VMP40h (nos momentos: basal, vili3h (LESÃO) e 40h – VMP40h) e comparação entre os grupo Sham, Lesão e VMP40h. Seguindo as principais característica da SDRA: alteração de trocas gasosas e mecânica pulmonar, processo inflamatório, alteração de permeabilidade da membrana alvéolo capilar e lesão histológica.

5.1 –Caracterização dos animais

Analisando as características dos animais não tivemos diferença no peso entre os 3 grupos ($31,5 \pm 2,19$ kg), o número de lavagens pulmonares para induzir a lesão e volume residual de cada lavagem, também não apresentaram diferenças significantes entre os grupos em (tabela 1).

VARIÁVEL	SHAM	LESÃO	VMP40h	P
Número de animais	11	28	11	
Peso (kg)	31,5±0,2	31,4 ± 0,1	31,7 ± 0,2	0,403
Nº de Lavagens	-----	8,3 ± 0,2	7,9 ± 0,3	0,231
Volume residual da lavagem (mL)	-----	703 ± 15	742 ± 18	0,113

Tabela 1 Caracterização dos animais e da lavagem total pulmonar nos 3 grupos.(média ± erro padrão)

Na figura 11 temos um exemplo representativo da macroscopia dos pulmões dos animais não submetidos à lesão (grupo Sham) e dos animais submetidos ao modelo experimental de SDRA (grupos Lesão e VMP40h), mostrando a persistência da lesão tecidual após 40h de ventilação mecânica protetora.

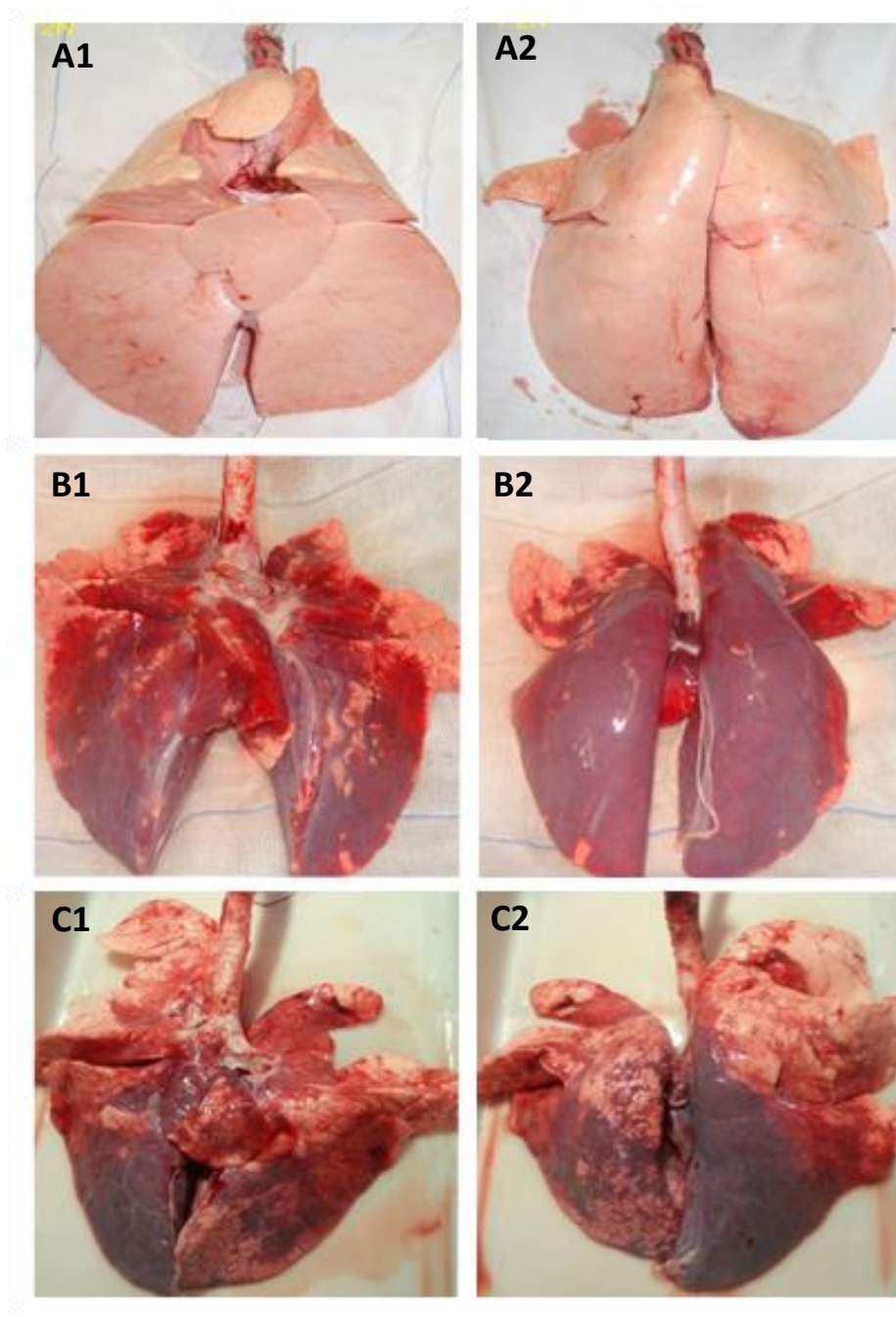


Figura 10 A – Grupo Sham A1=Anterior, A2 =Posterior, B Grupo Lesão B1= Anterior, B2 Posterior, C Grupo VMP40h, C1= Anterior, C2+ Posterior

A PEEP foi mantida conforme o protocolo de lesão houve um diminuição significantes dos níveis durante a estratégia protetora VMP40h, quando comparado ao nível basal.(figura 12)

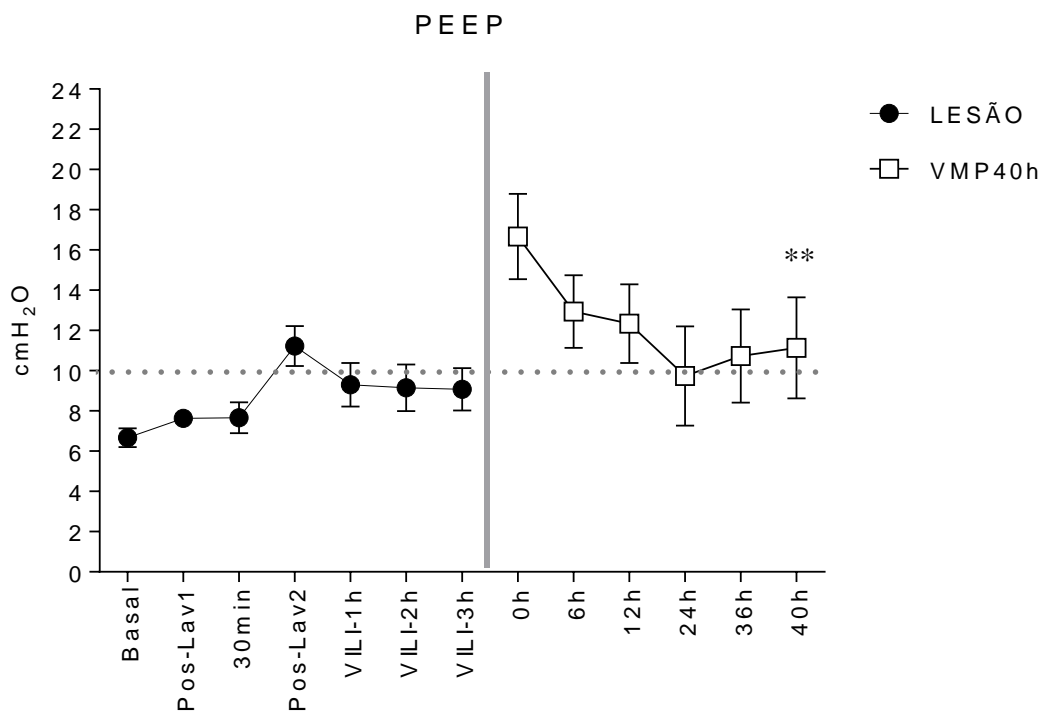


Figura 11 - Evolução da PEEP (média ± padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P<0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P<0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P<0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A pressão de platô aumentou nos momentos da lavagem e manteve-se alta durante as 3 horas de VILI. Durante a estratégia de VMP40h a pressão de platô foi mantido de acordo com o protocolo não ultrapassando a 30 cmH₂O.

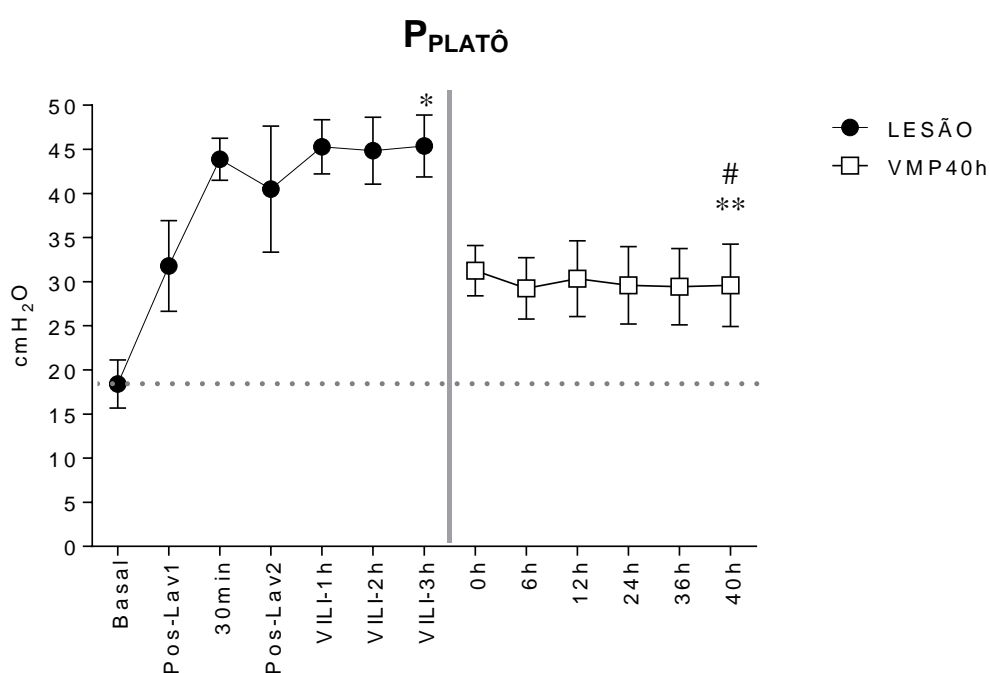


Figura 12 - Evolução da pressão de platô (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P<0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P<0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P<0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

O volume corrente foi significativamente alto nos momentos da lesão e houve queda significativa no período das 3 horas de ventilação lesiva. Durante a estratégia de VMP40h o volume corrente foi mantido de acordo com o protocolo 6mL/kg..(figura 14)

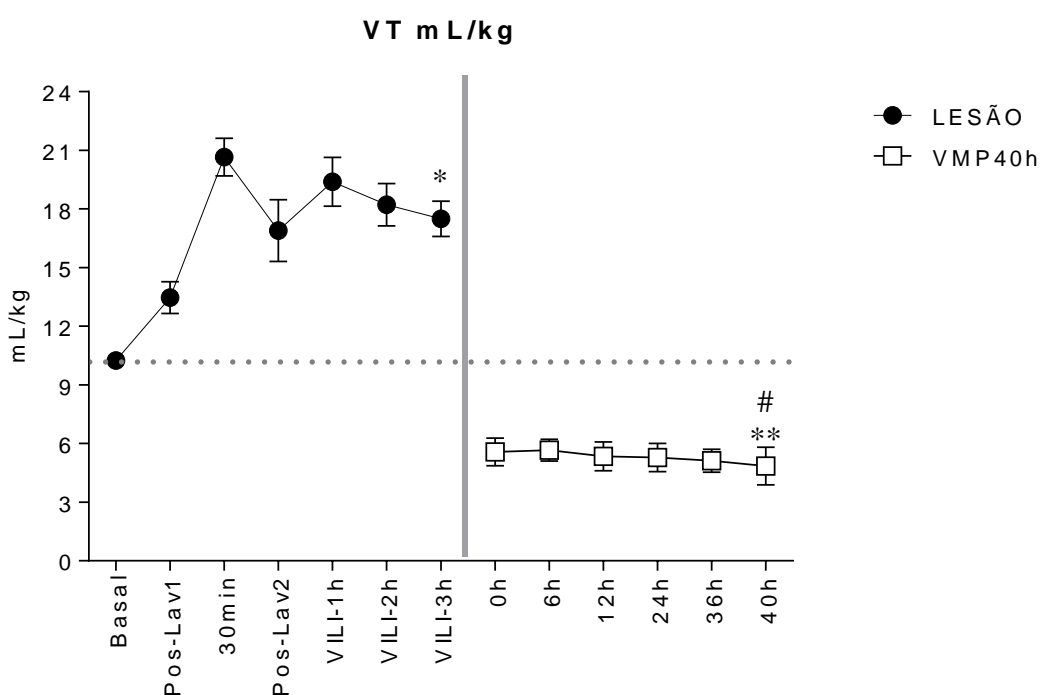


Figura 13 Evolução da Volume Corrente por kg (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* $P < 0,05$ para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** $P < 0,05$ para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

$P < 0,05$ para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A temperatura no grupo Lesão foi estável durante o tempo de lesão, houve um aumento significativo durante as 40h de vm no grupo VMP40H. Este resultado sugere a liberação de algum componente pirogênico, ligado ao processo inflamatório, que aparece somente em fases mais tardias (> 4-6 horas). (figura 15)

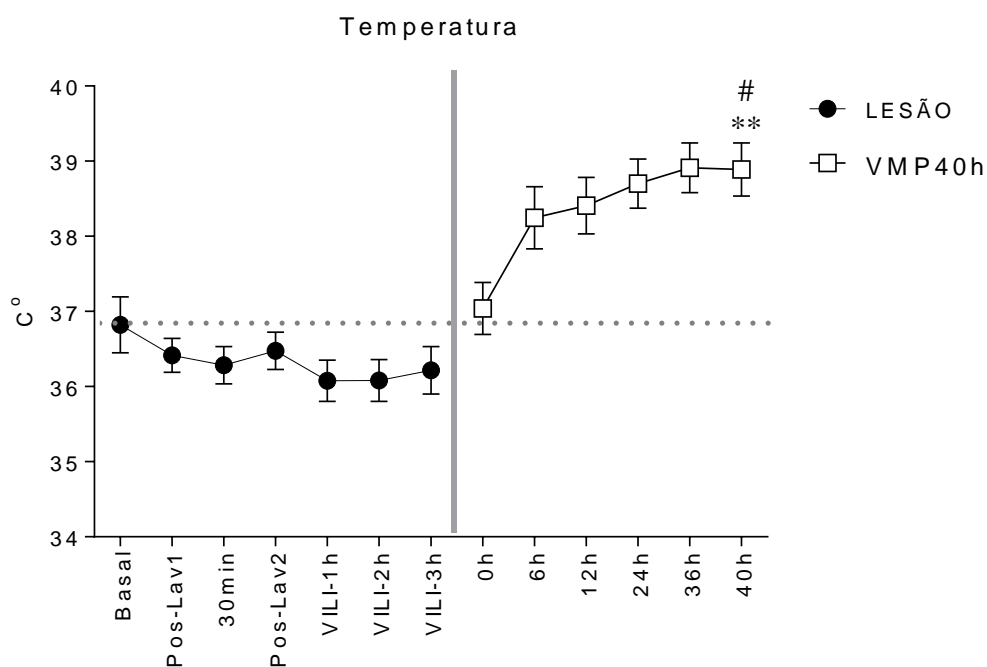


Figura 14 – Evolução da temperatura (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P<0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P<0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P<0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Em relação as alterações hemodinâmicas, a frequência cardíaca apresentou estabilidade durante a lesão. Durante a VM no grupo VMP40h, houve uma queda ao longo do tempo, porém não significativa (P=0,094) (figura 16).

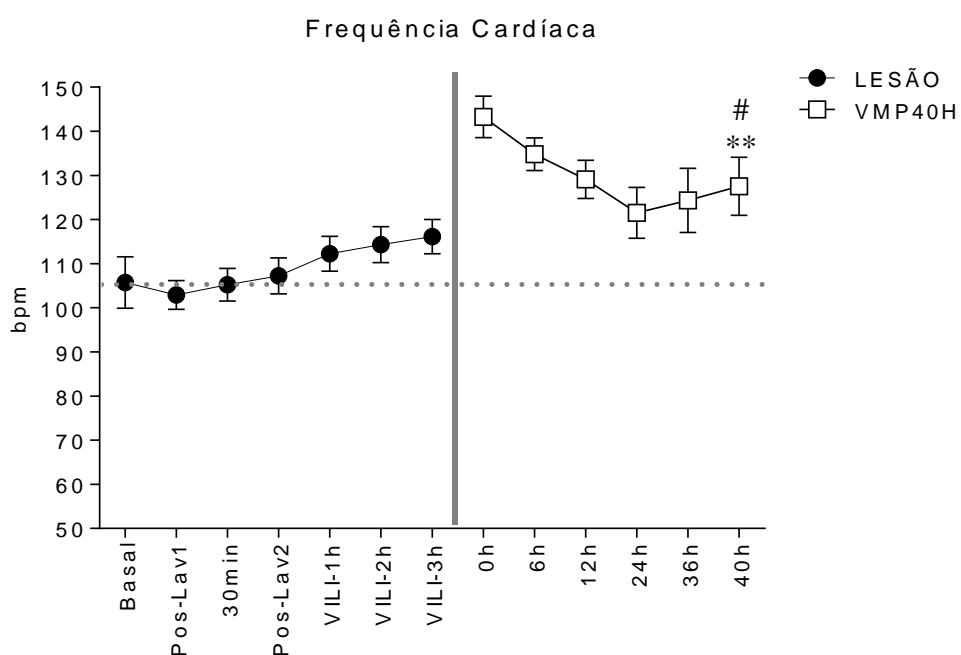


Figura 15 - Evolução da frequência cardíaca (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P<0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P<0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P<0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A pressão arterial média não apresentou diferença significativa durante a lesão, comparada o grupo lesão com o grupo VMP40h, mantendo-se estável nas 40h (figura 17), houve apenas uma diferença significativa no momento 40 horas comparado ao momento basal.

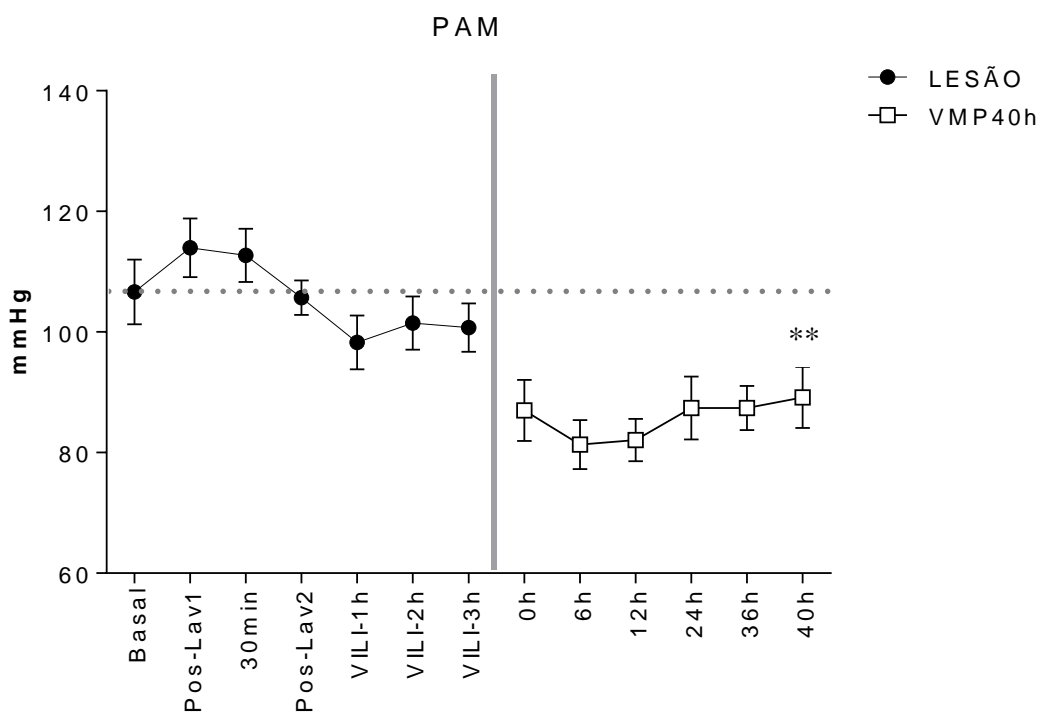


Figura 16 - Evolução da da pressão de artérial média (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h).

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A pressão média da artéria pulmonar (PAP) aumentou consideravelmente durante a lesão, porém houve uma queda após a instalação da estratégia protetora grupo VMP40h, mas os níveis ainda mantiveram-se elevados (figura 18), não retornando ao valor basal após 40h de vm.

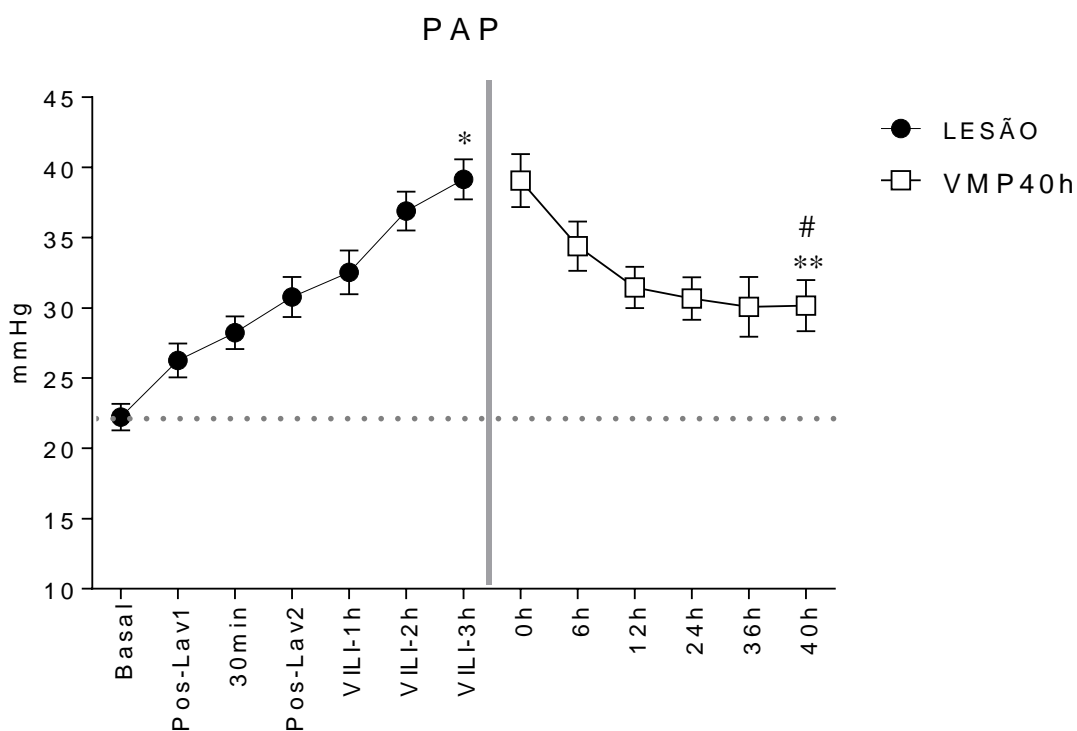


Figura 17 - Evolução da da pressão de artéria pulmonar média (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

5.2 – Trocas Gasosas e Mecânica Pulmonar.

5.2.1 - Trocas Gasosas

Os níveis de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, permaneceram baixos durante todo procedimento da lesão e houve diferença significativa quando comparamos com os tempos basal e ao final da lesão (VILI3h) mostrando uma pequena melhora ao longo do grupo VMP40h, porém os níveis não ultrapassaram de 170mmHg, apresentando diferença entre o tempo vili3h e 40h (Figura 19)

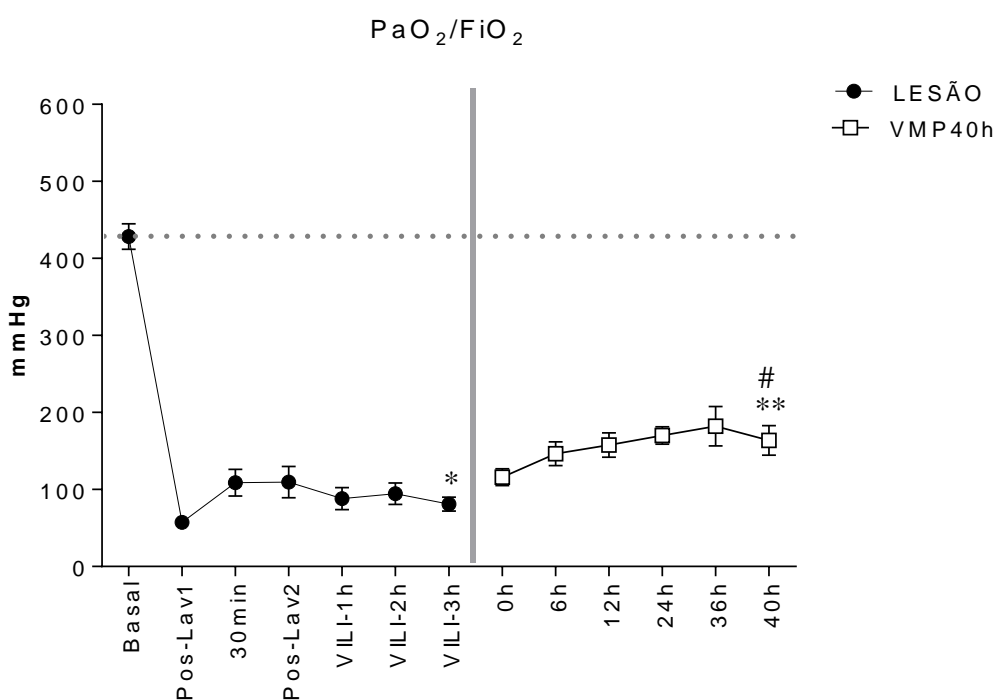


Figura 18- Evolução da $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Os níveis de PaCO₂ (Figura 20), permaneceram baixos durante toda procedimento da lesão ocasionado pelo volume corrente alto utilizado (20ml/kg). Quando comparamos no grupo lesão os tempos basais e VILI3h não encontramos diferença significativa porém ao compararmos no grupo VMP40h momento vili3h com o momento 40h houve diferença significativa.

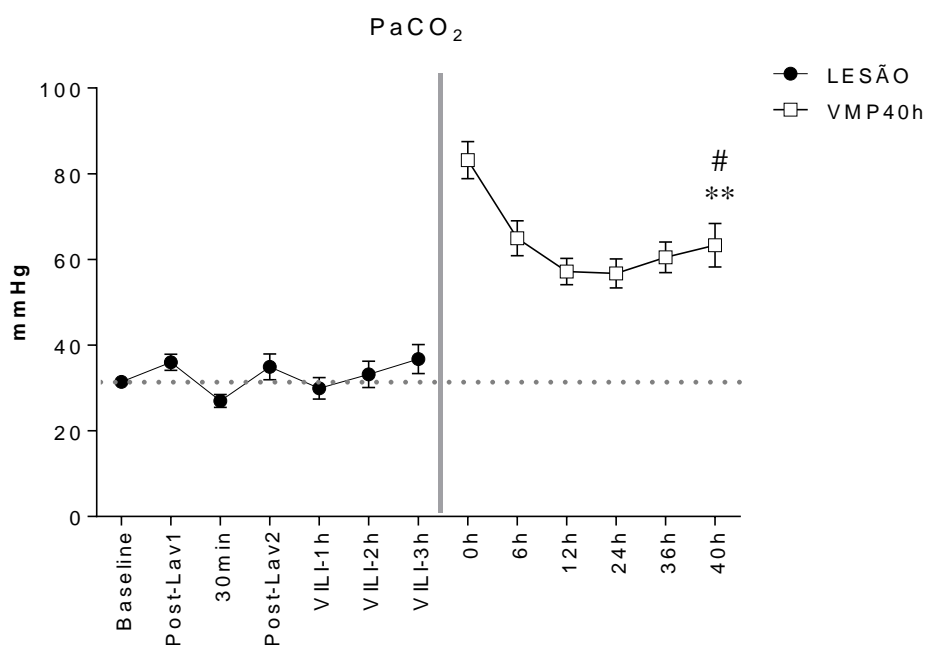


Figura 19 - Evolução da PaCO₂ (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Quando comparamos os níveis de PaCO_2 e PaO_2 , nos momentos onde era realizada a gasometria padrão (medida com peep 10 cmH_2O), observamos que os níveis de PaO_2 tiveram uma queda significativa e mesmo após 40 horas os níveis estavam abaixo de 200mmHg porém os níveis de PaCO_2 , foram aumentando ao longo do tempo apresentando diferença significativa. (Figura 21)

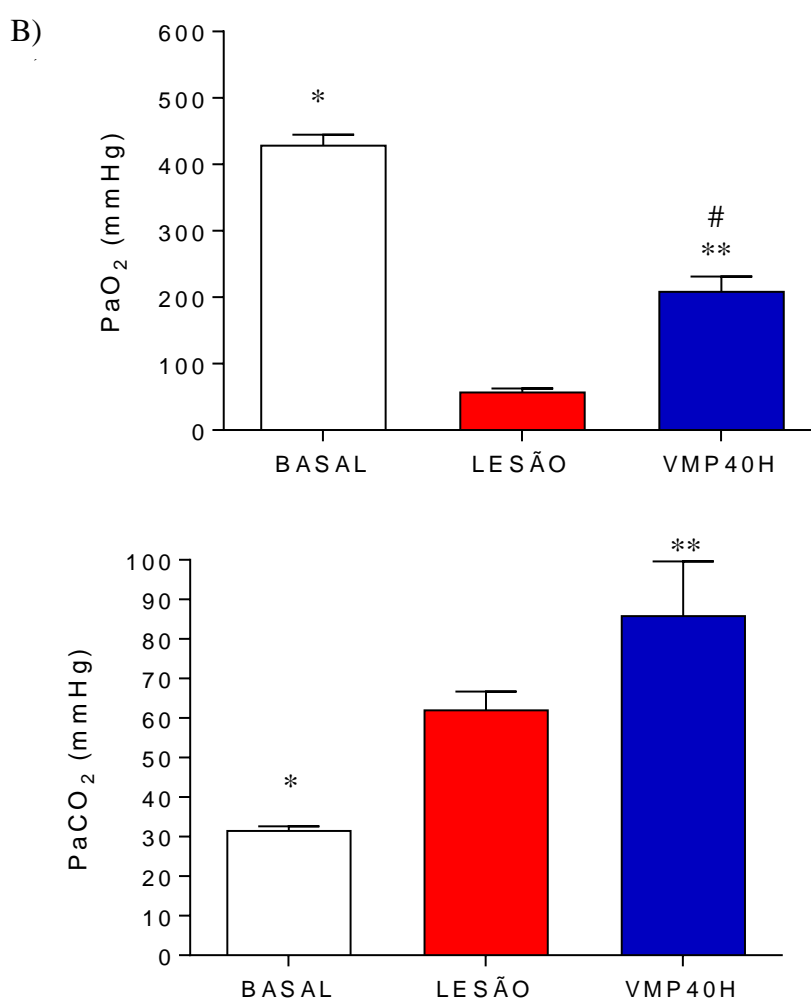


Figura 20 - Evolução da $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ (A) e PaCO_2 (B) Comparação dos animais

grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Gaso Padrão LesãoII e Gaso 40h II

* $P < 0,05$ para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** $P < 0,05$ para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

$P < 0,05$ para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

5.2.2 - Mecânica Pulmonar

O resultado da análise de mecânica mostrou uma queda significativa da complacência pulmonar durante e após a lesão que permaneceu no grupo VMP40h (Figura 22). Observamos que após os 30 minutos da primeira etapa da lesão (antes da 2 lavagem) houve aumento da complacência a pulmonar, demonstrando a recuperação do sistema surfactante.

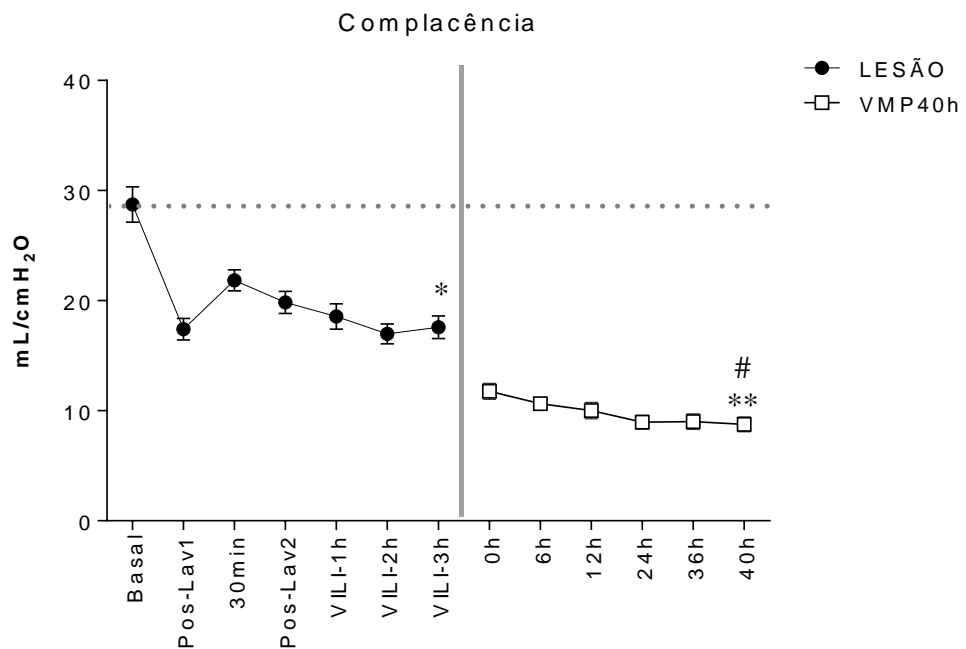


Figura 21 – Evolução da complacência Pulmonar (média ± erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempo (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Os resultados da análise de mecânica realizada nos tempo da gasometria padrão lesão II e gaso 40h apresentaram queda significativa quando comparamos com a medida basal (Figura 23)

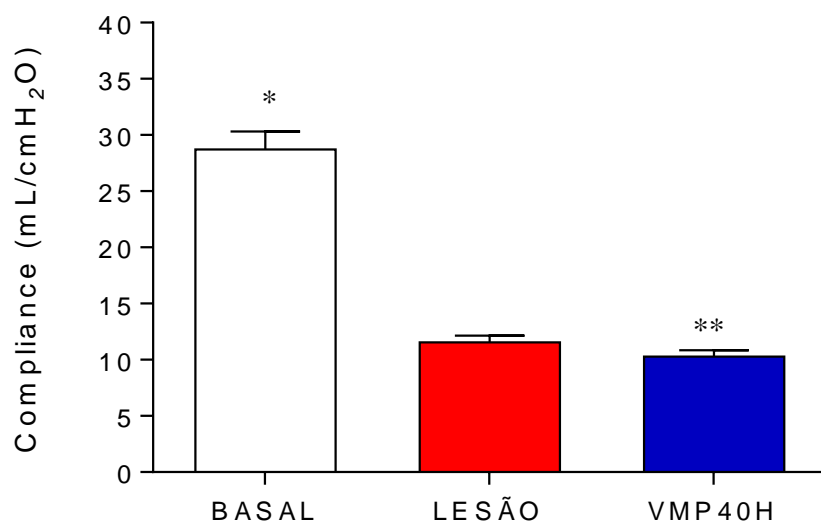


Figura 22 - Evolução da complacência pulmomonar Comparação dos animais grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Gaso Padrão LesãoII e Gaso 40h II)

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

5.3 Resposta Inflamatória

Os dados de resposta inflamatória foram observados no tecido pulmonar, lavado broncoalveolar (BAL) e sangue, através das análises de citocinas, polimorfonucleares e plaquetas.

A análise de polimorfonucleares (Figura 24) em relação a porcentagem de leucócitos no BAL mostrou um aumento significativo dos níveis quando comparamos ao tempo basal com Lesão, estes níveis permaneceram elevados no grupo VMP40h, evidenciando a reposta inflamatória ainda em processo.

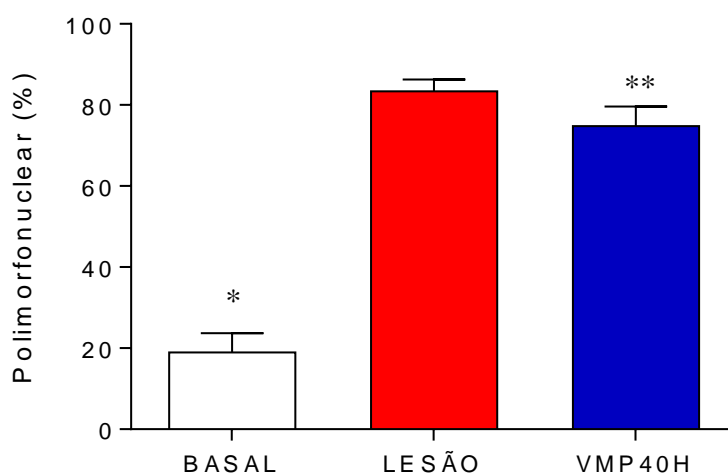


Figura 23 Figura 5.14 – Polimorfonucleares (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.
* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.
** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.
P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A análise de citocinas no BAL (figura 25) mostrou que houve aumento na IL6 após a lesão, porém no grupo vmp40h observamos que houve uma diminuição significativa destes níveis. A Interleucina 8 e interleucina 1 apresentaram o mesmo comportamento com aumento dos níveis pós lesão entretanto mantiveram-se elevadas no grupo VMP40h sugerindo persistência do processo inflamatório.

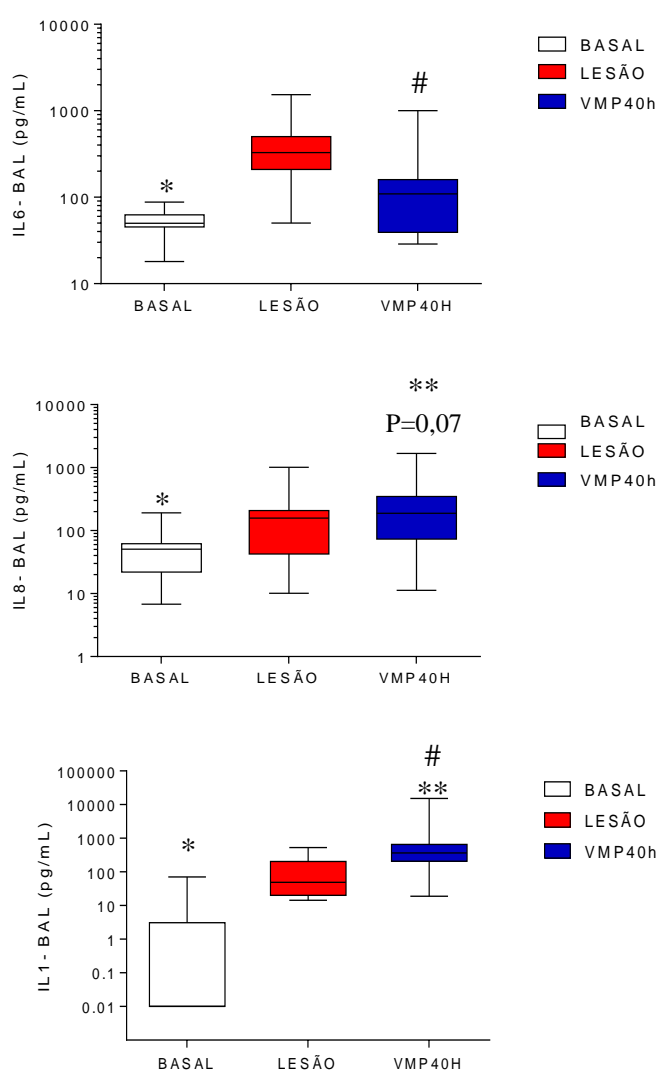


Figura 24Figura 5.15 – Interleucinas 1 β , 6 e 8 no BAL (mediana e IQ). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) nos tempos basal lesão e vmp40h .

* P < 0,01 para diferença entre tempo basal grupo lesão

** P < 0,05 para diferença entre tempo basal e grupo vmp40h

P < 0,01 para diferença entre grupo lesão e grupo vmp40h

A análise de citocinas no tecido pulmonar (regiões anterior e posterior) foi realizada com a correção pelos níveis de proteína encontrados na mesma amostra, onde houve aumento na IL6 e IL8 quando comparamos o grupo SHAM com o grupo Lesão e diminuição quando comparamos o grupo vm40h. Não houve diferença entre as regiões em ambas as interleucinas (Figura 26).

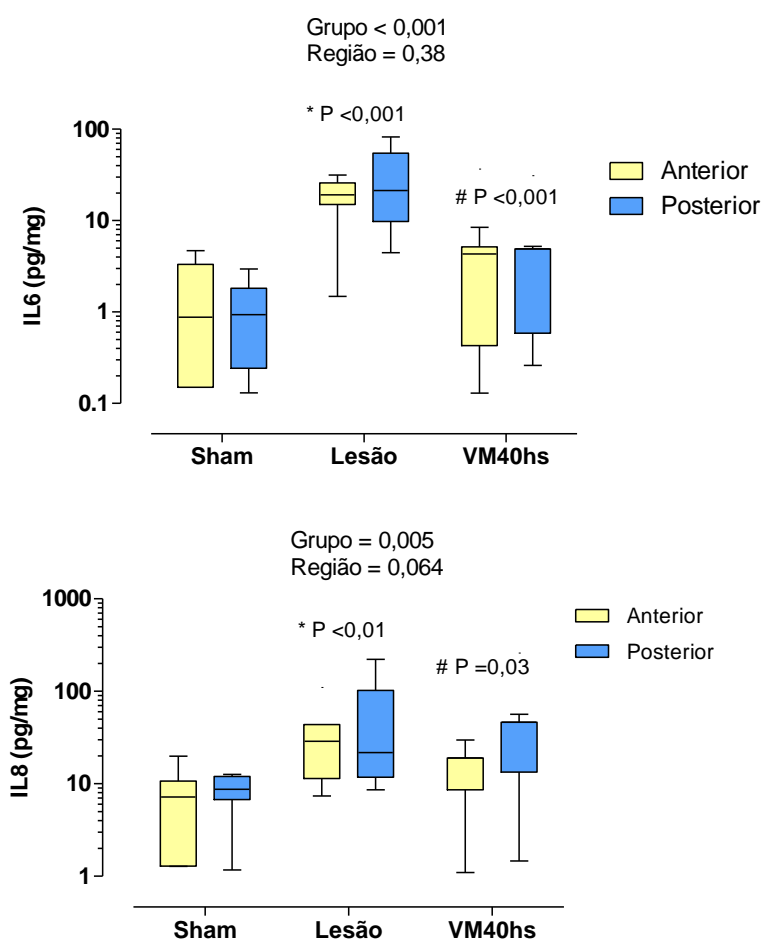


Figura 25 – Interleucinas 6 e 8 no tecido (mediana e IQ). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h)

* P < 0,01 para diferença entre grupo sham e lesão

** P < 0,05 para diferença entre grupo sham e vmp40h

P < 0,01 para diferença entre grupo lesão e vmp40hl

A contagem total de plaquetas do sangue, teve um queda siginificante quando comparamos o basal ao grupo lesão e permanecendo esta queda no grupo VMP40h. (figura 27)

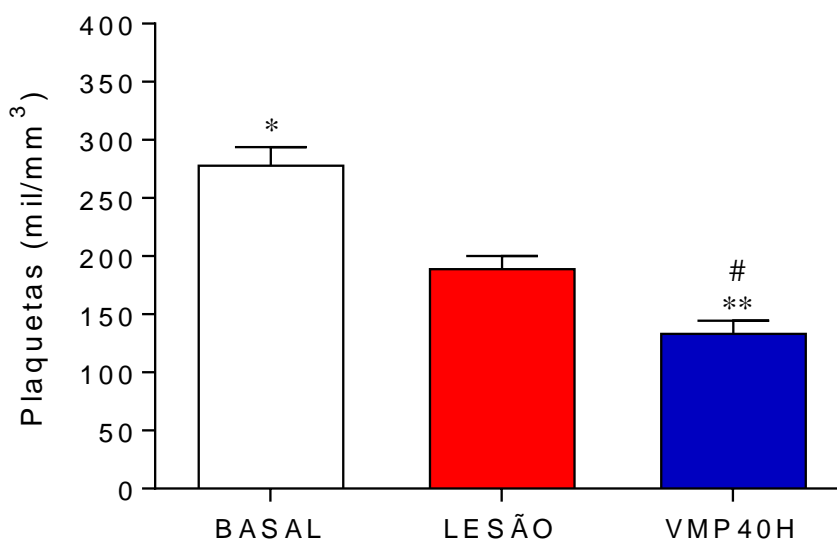


Figura 26 - Níveis de plaquetas (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h).
* P para diferença entre tempo basal e Vili3h.
** P para diferença entre tempo basal e VMP 40h.
P para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

5.4 Alteração da Permeabilidade da Membrana Alvéolo-Capilar

A alteração da permeabilidade da membrana alvéolo capilar foi evidenciada pela concentração elevada de proteínas do lavado broncoalveolar, água extravascular pulmonar no sangue e pelo peso seco/úmido do tecido.

Os níveis de proteína no bal tiveram aumento significativo na lesão e este aumento continuou ao longo das 40 h de VM

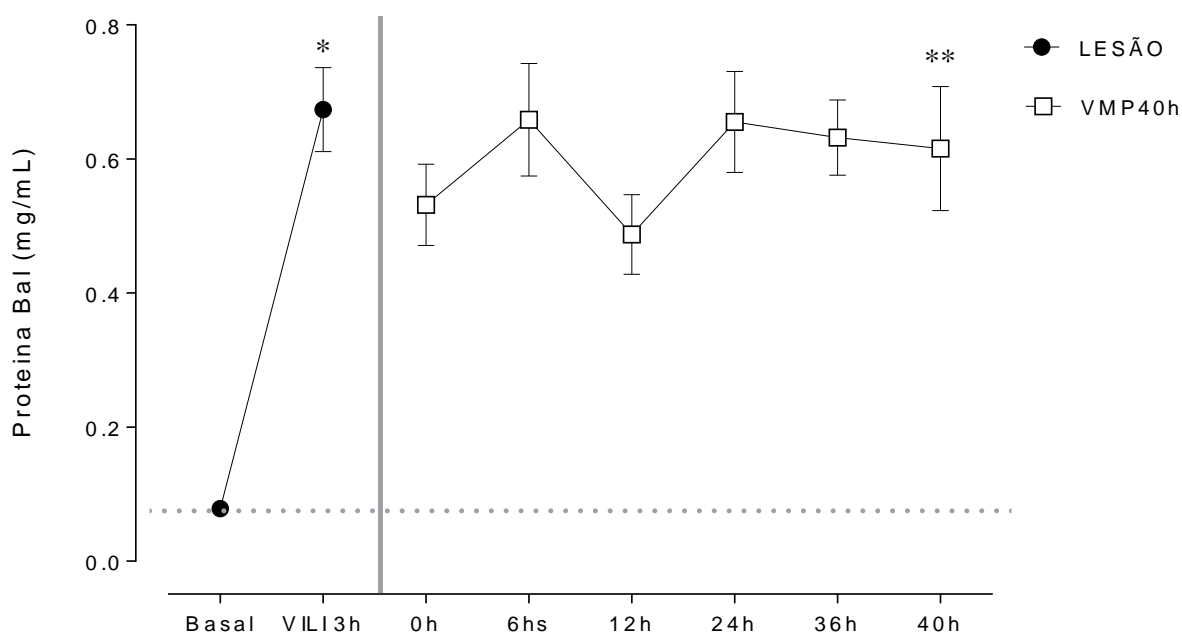


Figura 27 - Evolução dos níveis de proteína no bal. Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Os níveis de proteína no BAL aumentaram após a lesão e mantiveram elevados no grupo VMP40h

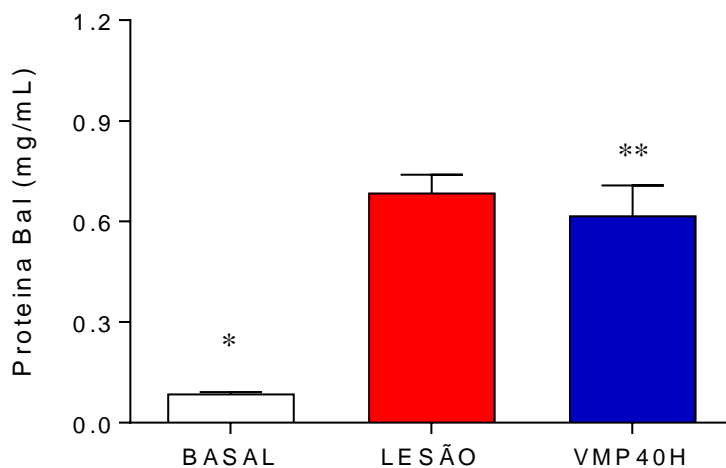


Figura 28 - Dosagem de proteína no Bal (média \pm erro padrão). Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.
* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.
** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.
P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

Os níveis de ELWI – Água extravascular pulmonar medido no sangue aumentaram durante a lesão e tiveram um pequena queda na VMP40 mas mantiveram elevados o tempo todo.

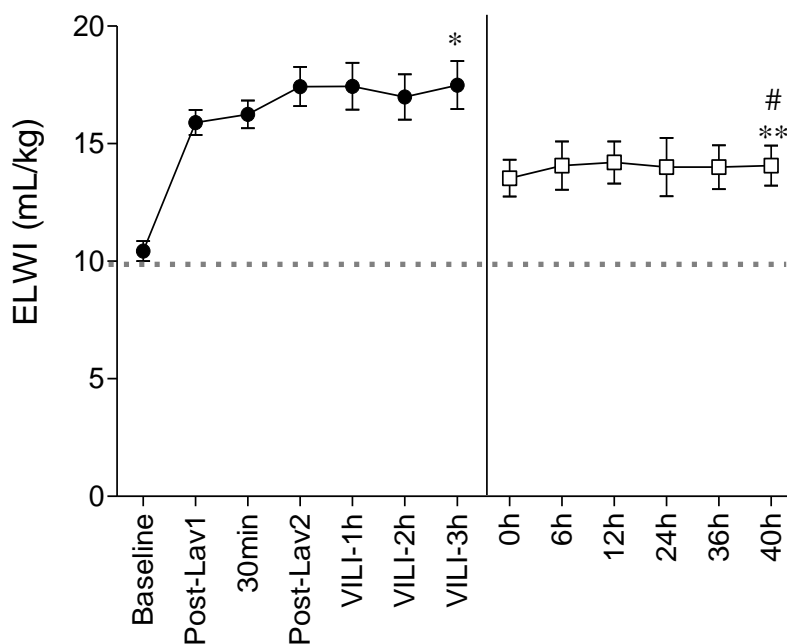


Figura 29 - Evolução dos níveis de ELWI no sangue. Comparação dos animais (grupos Lesão e VM40h) em três tempos (Basal, Lesão (VILI3h) e VMP40h.

* P <0,05 para diferença entre tempo basal e Vili3h.

** P <0,05 para diferença entre tempo basal e VMP 40h.

P <0,05 para diferença entre tempo lesão Vili3h e vmp40h

A relação de peso seco/úmido ficou mais elevada no grupo Lesão quando comparada com o grupo Sham e VMP40h.

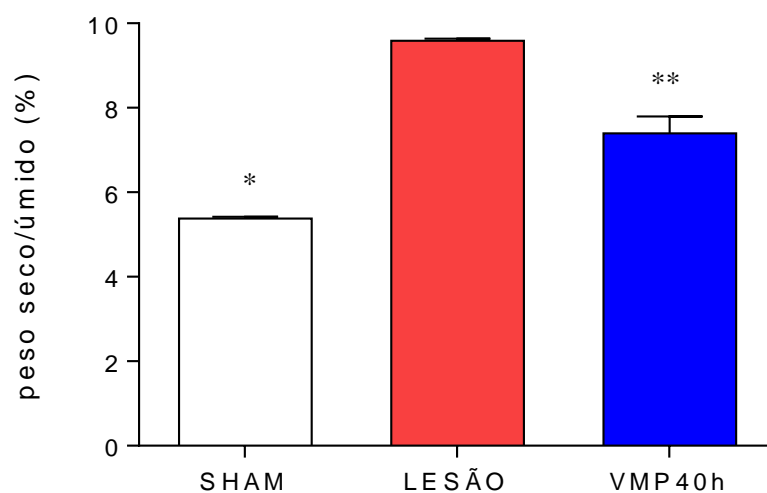


Figura 30 - Peso seco/úmido (média e erro padrão) nos 3 grupos (Sham, Lesão e VMP40h).

* $P < 0,05$ para diferença entre grupo Sham e Lesão

** $P < 0,05$ para diferença entre grupo Sham e VMP40h

$P < 0,05$ para diferença entre tempo VMP40h e Lesão

5.5 Lesão Histológica

Os quatro escores histológicos de inflamação ou lesão pulmonar foram significativamente diferentes entre os grupos pela análise multivariada (figura 34). Em apenas um dos critérios (edema intra alveolar) não houve diferença significativa entre o grupo Sham e o grupo Lesão. Somente foi observada diferença significativa entre os grupos Lesão e VMP40h para o escore de membrana hialina.

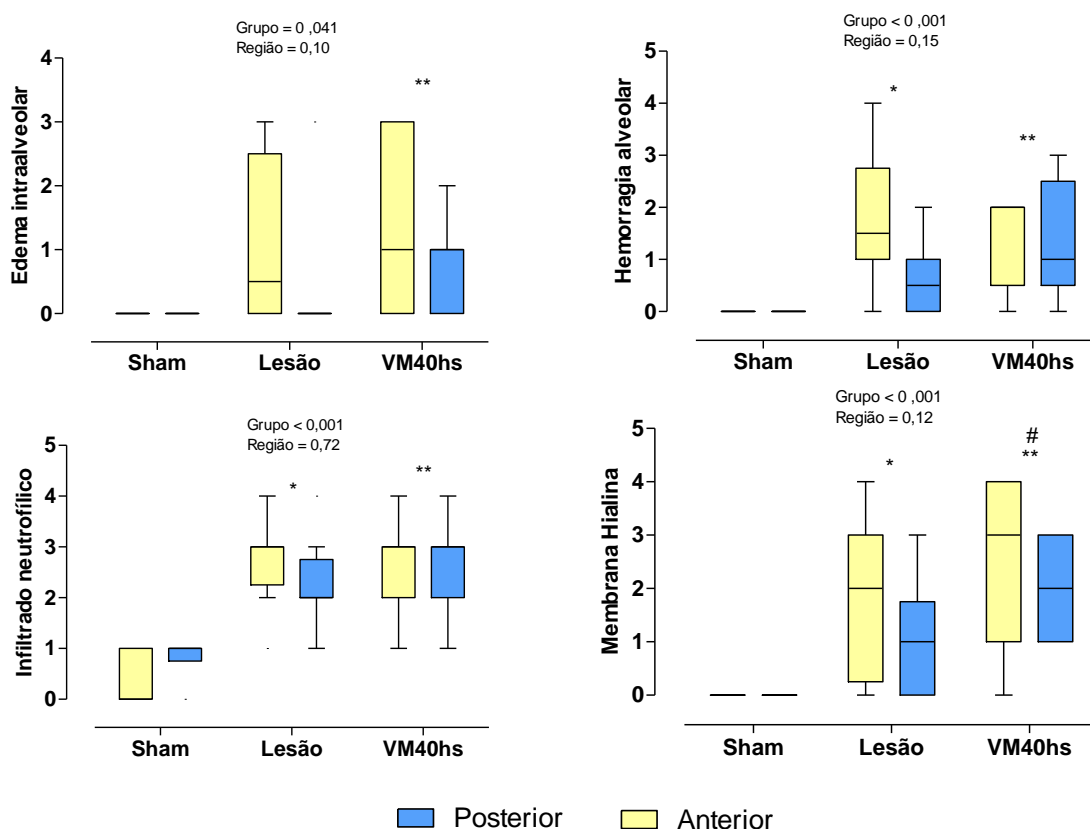


Figura 31 – Escores histológicos (mediana e IQ) nos 3 grupos (Sham, Lesão e VM40h) em duas regiões pulmonares.

* $P < 0,05$ para diferença entre grupo Sham e Lesão

** $P < 0,05$ para diferença entre grupo Sham e VM40hs

$P < 0,05$ para diferença entre tempo VMP40h e Lesão

Escore 0= ausência; 1= mínimo (focal); 2= leve; 3= moderado; 4=, intenso

Todas interações Grupo X região pela análise de “mixed model” foram não significantes

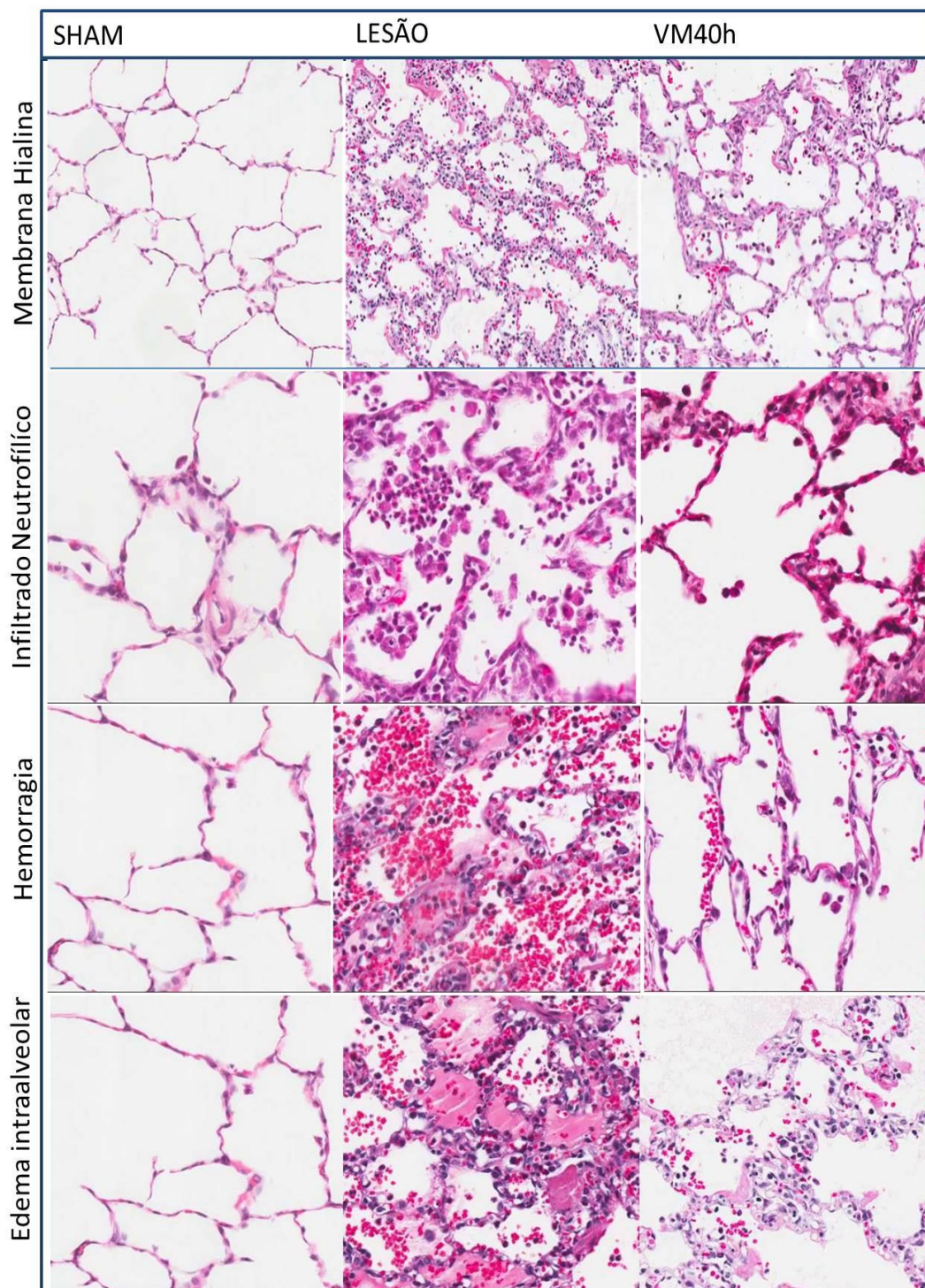


Figura 32 - Representação histológica das principais características histopatológicas da SDRA nos grupos SHAM, Lesão e VM40h (aumento 100 x).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O estudo realizado validou um modelo de SDRA em suíno, estabelecido através da associação de duas formas conhecidas de lesão pulmonar : a lavagem total pulmonar com a extração do surfactante pulmonar seguida da ventilação mecânica com parâmetros definidos para instalação da LPIV. A ventilação lesiva foi guiada pela oxigenação, de forma controlada através de uma tabela que conjugava parâmetros de PEEP mais baixa com Pplatô mais alta a fim de abrir e fechar os alvéolos ciclicamente, mantendo oxigenação mínima necessária para a sobrevivência do animal. A gravidade da lesão foi detectada clinica e laboratorialmente, mostrando-se severa e persistente por 40 horas. Porém, podemos fazer algumas considerações sobre o modelo seguido e as características da SDRA em animais conforme as normas da ATS.

6.1 O Modelo

O estabelecimento do modelo com duas injúrias combinadas vai de encontro às discussões na literatura sobre a o melhor modelo de SDRA [14, 22, 26, 38], ressaltando a importância do conhecimento da etiologia do modelo escolhido. Nós escolhemos o modelo de lavagem total pulmonar por ser de fácil execução, sem efeito hemodinâmico, não demandando a

utilização de drogas ou outro procedimento cirúrgico para sua realização [39].

Em nosso estudo, modificamos o procedimento estabelecido por Lachmann[32], quando acrescentamos, após a lesão (definida como $PaO_2 < 100 \text{ cmH}_2\text{O}$), uma ventilação lesiva por 30 minutos (utilizando PEEP de $7 \text{ cmH}_2\text{O}$ e Pplatô de $42 \text{ cmH}_2\text{O}$). Durante esta ventilação lesiva o V_t atingia em torno de 20 mL/kg . Após este período, realizamos mais uma única vez o procedimento da lavagem total pulmonar[10].

A justificativa para esta segunda lavagem é que o surfactante pulmonar possui duas formas: funcional (*large aggregate*) e não funcional (*small aggregate*). A ventilação mecânica com V_t maior que 15 mL/kg contribui para conversão do *large* em *small* e facilitando a LPIV. Entretanto, se o tempo de ventilação for curto o efeito pode ser inverso e estimular sua produção [40]. Isto vai de acordo com os nossos resultados onde após 30 minutos de LPIV observamos um aumento da complacência pulmonar secundária à melhora do sistema surfactante.

Os modelos animais que utilizam ventilação lesiva são sempre questionados por aplicarem volume corrente alto levando a lesões não individualizadas e muitas vezes, a barotrauma.[26]

Keneyber et al [42] ressalta a importância de normalizar o V_t de acordo com o peso do animal.. A relação entre o volume pulmonar e o peso corpóreo varia de acordo com a idade do animal visto que a composição do surfactante pulmonar é diferente em cada fase de vida. O surfactante

pulmonar num pulmão jovem possui maior quantidade de *large aggregate* do que *small* dificultando assim a instalação da lesão em animais jovens.

O ideal para monitorar qualquer modelo de SDRA com ventilação mecânica lesiva seria a medida da capacidade pulmonar total ao longo do tempo (CPT) [6], porém isso seria inviável em modelos animais. Uma alternativa que buscamos para minimizar a falta da medida de CPT foi a tabela que utilizamos, (com o cuidado de manter a oxigenação mínima possível) onde a ventilação é ajustada de acordo com a resiliência do animal. O foco maior desta tabela é manter a PEEP mais baixa e a pressão de platô mais alta, favorecendo o efeito da abertura e fechamento alveolares cíclicos, conjugado a redução brusca da produção de surfactante causada pelas lavagens pulmonares. Ambos os processos podem ser interrompidos ou continuados dependendo da resposta do animal.

O tempo foi fator determinante ao desenvolvimento do modelo de lesão, as horas de ventilação lesiva foram baseadas nos estudos de Schettino *et al*[36], onde houve estabilização dos níveis de IL8 e IL1 β após o período de 3 horas de VM, e Halter *et al*, mostrando que depois de três horas a lesão é causada pelo processo inflamatório, levando em conta a utilização de PEEP baixa e Vt alto.[17]

Estudo em pacientes têm demonstrado que valores elevados de pressão da artéria pulmonar média (PAP_{média}) podem estar correlacionados com a presença e como marcador de gravidade da SDRA [41]. Os nossos dados demonstraram aumento dos valores PAP_{média} durante a lesão permaneceram elevados (acima de 25cmH₂O) mesmo durante a estratégia

protetora, reproduzindo a gravidade da lesão e sua persistência similar ao estado clínico de pacientes.

As principais características definidas pela da ATS foram destacadas na validação do nosso modelo de SDRA, sendo visualizadas mesmo após 40 horas de VM protetora.

6.2 Lesão Tecidual

As alterações no tecido pulmonar evidenciada em nossos dados foram, formação de membrana hialina, infiltrado neutrofílico, presença de edema e hemorragia que se mantiveram ao longo do grupo VM40h, com exceção do edema. Alguns estudos consideram a resolução do edema como uma etapa da progressão da doença. [6]

Os dados da tese da Dra. Ellen Nascimento[42] foram obtidos nestes mesmos animais e através da análise histológica quantitativa foi estudada progressão microestrutural e molecular da lesão. A tese demonstrou que independente da resolução do edema agudo no grupo VMP40h, a lesão progride. O afluxo de fluidos derivados do plasma continua para o espaço aéreo formando mais membrana hialina, que também pode estar correlacionada com os níveis elevados de IL1 β . O mecanismo de reparo é instalado e conseqüente há diminuição de edema.

;

6.3 Alteração de permeabilidade da membrana alvéolo-capilar

A alteração da permeabilidade da membrana alvéolo capilar é a principal característica da SDRA. Matute Bello *et al* sugerem várias formas de se medir a alteração de permeabilidade em modelos animais [26]. Em nosso estudo, utilizamos 3 métodos provenientes de diferentes amostras biológicas: 1) Água extravascular pulmonar (ELWI), medida através da termodiluição no sangue; 2) Concentração de proteína no lavado broncoalveolar (LBA em português); 3) Medida da relação peso seco/úmido no tecido. Nas três técnicas utilizadas houve o aumento de permeabilidade na lesão bem como a sua persistência durante o grupo VMP 40h.

Os nossos dados de peso seco/úmido tiveram uma queda não significativa no grupo VMP40h, podendo sugerir uma relação com a diminuição do edema também encontrada no tecido pulmonar através da análise histológica.

6.4 Resposta inflamatória

A resposta inflamatória foi marcada por vários fatores encontrados no tecido pulmonar, no LBA e no sangue.

A interleucina 6 aumentou na fase aguda da lesão e teve uma diminuição significativa no grupo VMP40h. Por outro lado, temos outros marcadores evidenciando a continuação da inflamação através de níveis elevados de polimorfonucleares e de outras citocinas como IL8 e IL1 β .

A IL6 é uma citocina pleiotrópica exercendo função proinflamatória ou anti-inflamatória dependendo da sua ligação com receptores específicos [13, 14]. Em nossos dados, podemos sugerir que o efeito anti-inflamatório desta citocina foi reduzido pela progressão da lesão. Assim, para esta confirmação seria necessário um estudo molecular quanto a receptores de membranas. Além disso, conforme a cinética das citocinas, o nível reduzido de IL6 pode ser simplesmente o efeito da resposta inflamatória contrastada com o da liberação de outras citocinas como a IL8 e IL1 β [13, 14].

O aumento da IL8 encontrada no (LBA) e no tecido confirmam o papel desta citocina como fator quimiotático para neutrófilos, sendo responsável pela migração de polimorfonucleares e consequente piora da função pulmonar[9], os nossos dados estão compatíveis com esta informação pois obtivemos um aumento de polimorfonucleares que se manteve elevado no período de 40 horas.

A Interleucina 1 β é responsável pelo mecanismo de reparo do processo de lesão. O pneumócito do tipo II restaura a integridade do epitélio alveolar pela proliferação, migração e diferenciação em pneumócito tipo I, este processo é controlado por vários mediadores incluindo a IL1 β .

Porém, a IL1 β também está muito presente na fase fibrótica, responsável pela migração de fibroblastos para o interstício[43]. Podemos sugerir uma relação entre estes achados, correlacionando com a formação de colágeno e os componentes de matriz extracelular encontrado no trabalho de Nascimento, EC [42]

6.5 – Disfunção Fisiológica

Em relação às trocas gasosas pudemos observar níveis PaO_2 abaixo da normalidade e compatíveis com os valores estabelecidos para a SDRA pela definição de Berlim. A maioria dos modelos animais apresenta como parâmetro único a queda da PaO_2 para definir a instalação da SDRA. Mas, sabemos que a hipoxemia não é uma característica exclusiva da SDRA. Além de que os níveis de PaO_2 podem voltar a normalidade facilmente dependendo dos parâmetros ventilatórios utilizados e quando realizamos as manobras de recrutamento alveolar[26]. Por isso, padronizamos alguns parâmetros respiratórios (PEEP 10 cmH_2O , $P_{platô}$ 25 cmH_2O , frequência respiratória de 25rpm e FiO_2 de 1) no momento da lesão e no final de 40 h, permitindo realizar comparações entre os animais.

A queda da complacência pulmonar foi observada durante a instalação da lesão e permanecendo baixa após as 40 h, confirmando os achados já apresentados por Timenetisky et al que verificou nos mesmos animais a redução das complacências total e regional através da Tomografia Computadorizada e Tomografia de Impedância Elétrica [44].

CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

O modelo que envolve a depleção de surfactante seguido de ventilação lesiva de forma controlada pela oxigenação, apresenta as características clínicas semelhantes a SDRA e pode ser utilizado para os estudos de estratégias protetoras de ventilação mecânica por tempo prolongado. Os achados compatíveis com SDRA grave foram confirmados através de alterações de mecânica pulmonar e evidência de inflamação sistêmica e tecidual, aumento da permeabilidade da membrana alvéolo capilar e lesão histológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE: **Acute respiratory distress in adults.** *Lancet* 1967, **2**(7511):319-323.
2. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: **Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition.** *Jama* 2012, **307**(23):2526-2533.
3. Ware LB, Matthay MA: **The acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 2000, **342**(18):1334-1349.
4. Notter R, Finkelstein, J.N. Holm, B.A.: **Lun Injury , mechanism, pathophysiology and therapy;** 2005.
5. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA: **The acute respiratory distress syndrome.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(8):2731-2740.
6. Matthay MA: **Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014, **189**(11):1301-1308.
7. Ware LB, Koyama T, Zhao Z, Janz DR, Wickersham N, Bernard GR, May AK, Calfee CS, Matthay MA: **Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome.** *Critical care* 2013, **17**(5):R253.
8. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS: **Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.** *Jama* 1999, **282**(1):54-61.

9. Ankermann T, Wiemann T, Reisner A, Orłowska-Volk M, Kohler H, Krause MF: **Topical interleukin-8 antibody attracts leukocytes in a piglet lavage model.** *Intensive care medicine* 2005, **31**(2):272-280.
10. Krause MF, Wiemann T, Reisner A, Orłowska-Volk M, Kohler H, Ankermann T: **Surfactant reduces extravascular lung water and invasion of polymorphonuclear leukocytes into the lung in a piglet model of airway lavage.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2005, **18**(2):129-139.
11. Opal SM, DePalo VA: **Anti-inflammatory cytokines.** *Chest* 2000, **117**(4):1162-1172.
12. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR: **Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **164**(10 Pt 1):1896-1903.
13. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: **IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.** *The Journal of clinical investigation* 1998, **101**(2):311-320.
14. Goldman JL, Sammani S, Kempf C, Saadat L, Letsiou E, Wang T, Moreno-Vinasco L, Rizzo AN, Fortman JD, Garcia JG: **Pleiotropic effects of interleukin-6 in a "two-hit" murine model of acute respiratory distress syndrome.** *Pulmonary circulation* 2014, **4**(2):280-288.
15. Slutsky AS, Ranieri VM: **Ventilator-induced lung injury.** *The New England journal of medicine* 2014, **370**(10):980.
16. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G: **Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats.** *Am Rev Respir Dis* 1985, **132**(4):880-884.
17. Halter JM, Steinberg JM, Gatto LA, DiRocco JD, Pavone LA, Schiller HJ, Albert S, Lee HM, Carney D, Nieman GF: **Effect of positive end-**

- expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. *Critical care* 2007, **11**(1):R20.
18. **Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network.** *The New England journal of medicine* 2000, **342**(18):1301-1308.
 19. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R *et al*: **Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 1998, **338**(6):347-354.
 20. Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM: **The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed?** *Current opinion in critical care* 2014, **20**(1):3-9.
 21. Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S: **Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults.** *European journal of cell biology* 2012, **91**(6-7):590-601.
 22. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR: **Animal models of acute lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**(3):L379-399.
 23. Lopez-Aguilar J, Quilez ME, Marti-Sistac O, Garcia-Martin C, Fuster G, Puig F, Flores C, Villar J, Artigas A, Blanch L: **Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury.** *Intensive care medicine* 2010, **36**(2):347-355.
 24. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K: **Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury.** *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 2008, **40**(4):305-316.
 25. Bastarache JA, Blackwell TS: **Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome.** *Disease models & mechanisms* 2009, **2**(5-6):218-223.

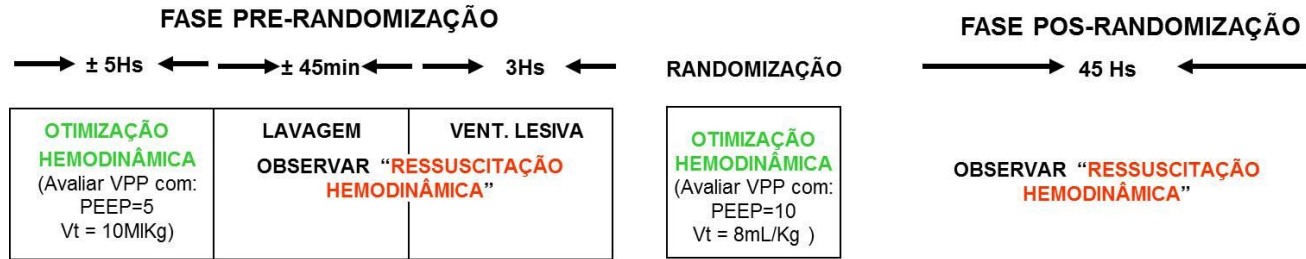
26. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM, Acute Lung Injury in Animals Study G: **An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **44**(5):725-738.
27. Uttman L, Bitzen U, De Robertis E, Enoksson J, Johansson L, Jonson B: **Protective ventilation in experimental acute respiratory distress syndrome after ventilator-induced lung injury: a randomized controlled trial.** *British journal of anaesthesia* 2012, **109**(4):584-594.
28. Glauser FL, Bechard DE, Fisher BJ, Davis D, Fowler AA, 3rd: **Bronchoalveolar lavage in an animal model of acute lung injury. Relationship between enhanced membrane permeability and transvascular neutrophil flux.** *Am J Pathol* 1988, **131**(3):404-410.
29. Spieth PM, Guldner A, Carvalho AR, Kasper M, Pelosi P, Uhlig S, Koch T, Gama de Abreu M: **Open lung approach vs acute respiratory distress syndrome network ventilation in experimental acute lung injury.** *British journal of anaesthesia* 2011, **107**(3):388-397.
30. Muellenbach RM, Kredel M, Zollhoefer B, Johannes A, Kuestermann J, Schuster F, Schwemmer U, Wurmb T, Wunder C, Roewer N *et al*: **Acute respiratory distress induced by repeated saline lavage provides stable experimental conditions for 24 hours in pigs.** *Experimental lung research* 2009, **35**(3):222-233.
31. Wolf GK, Gomez-Laberge C, Rettig JS, Vargas SO, Smallwood CD, Prabhu SP, Vitali SH, Zurakowski D, Arnold JH: **Mechanical ventilation guided by electrical impedance tomography in experimental acute lung injury.** *Critical care medicine* 2013, **41**(5):1296-1304.
32. Lachmann B, Robertson B, Vogel J: **In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome.** *Acta Anaesthesiol Scand* 1980, **24**(3):231-236.

33. Lachmann B: **Open up the lung and keep the lung open.** *Intensive care medicine* 1992, **18**(6):319-321.
34. Hedenstierna G, Hammond M, Mathieu-Costello O, Wagner PD: **Functional lung unit in the pig.** *Respiration physiology* 2000, **120**(2):139-149.
35. Hannon JP, Bossone CA, Wade CE: **Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research.** *Laboratory animal science* 1990, **40**(3):293-298.
36. Schettino IAL, Macedo, C.S.C., Costa, E.LV., Harki, T., Amato, M.P.B.: **Percentage of tidal Recruitment determine by electrical impedance tomography: Correlation with indicator of Acute Lung Injury.** In: *ATS: 2005; San Diego; 2005:* p A 665.
37. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 1976, **72**:248-254.
38. National Heart L, Blood Institute ACTN, Truwit JD, Bernard GR, Steingrub J, Matthay MA, Liu KD, Albertson TE, Brower RG, Shanholtz C *et al*: **Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 2014, **370**(23):2191-2200.
39. Haddad LB, Manzano RM, Rossi Fde S, Freddi NA, Prado C, Rebello CM: **Improvement in ARDS experimental model installation: low mortality rate and maintenance of hemodynamic stability.** *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2012, **65**(3):102-106.
40. Martinez F, Lewis J, Copland I, Engelberts D, Kavanagh BP, Post M, Schurch S, Belik J: **Mechanical ventilation effect on surfactant content, function, and lung compliance in the newborn rat.** *Pediatric research* 2004, **56**(1):19-25.
41. Lai PS, Mita C, Thompson BT: **What is the clinical significance of pulmonary hypertension in acute respiratory distress syndrome? A review.** *Minerva anesthesiologica* 2014, **80**(5):574-585.

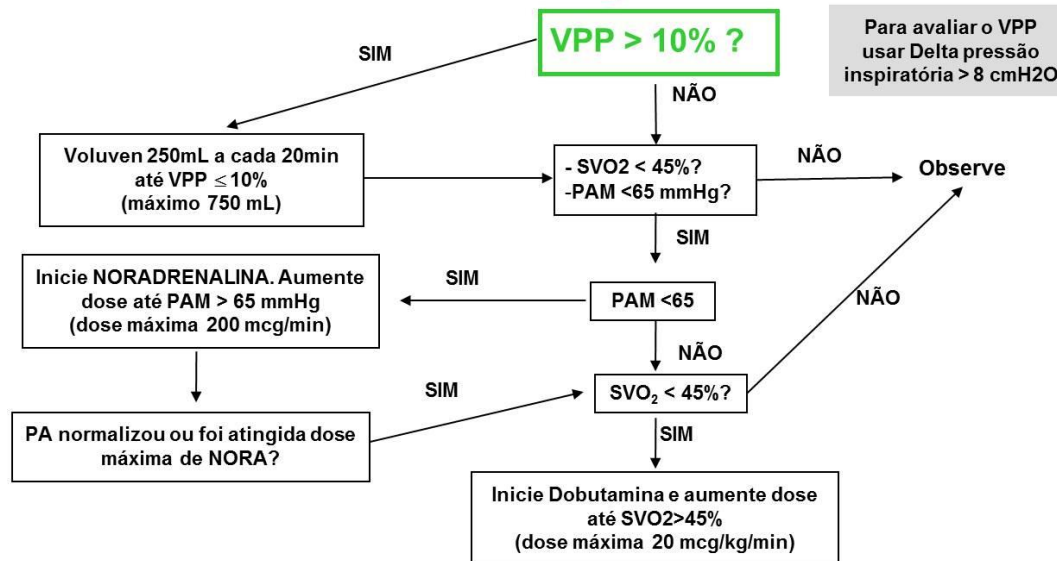
42. Nascimento EC: **Progressão microestrutural e molecular da lesão pulmonar em um modelo de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.** *Doutorado.* Universidade de São Paulo; 2013.
43. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ: **Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **162**(5):1783-1788.
44. Timenetsky K, S Gomes¹, R Belmino¹, A Hirota¹, MA Beraldo¹, JB Borges¹, EL Costa¹, MR Tucci¹, CR Carvalho¹, MB Amato¹: **Long-Term Effects of Two Protective-Ventilation Strategies in an ARDS Model.** *AJCCM* 2009.

-----ANEXOS

ANEXO I

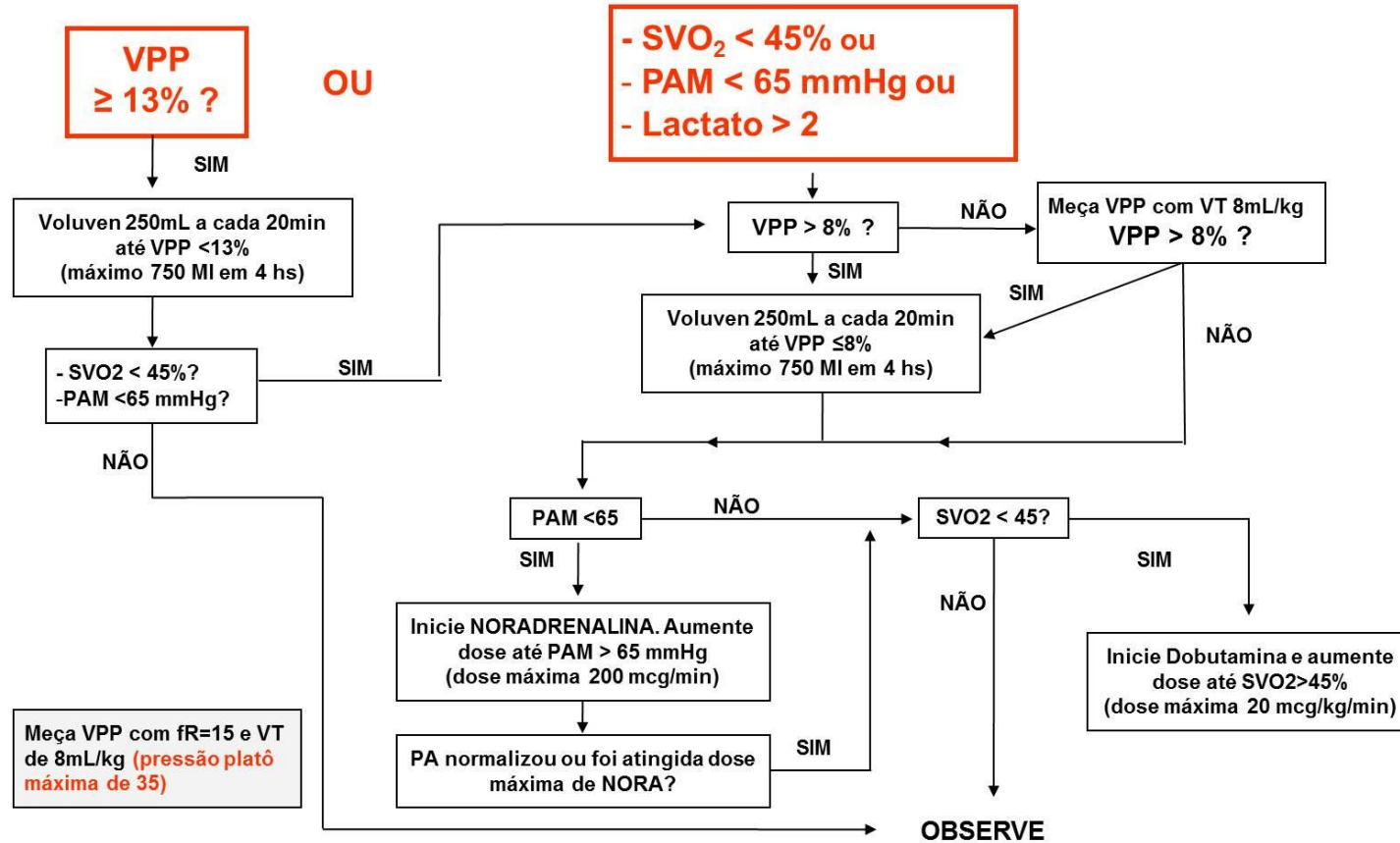


OTIMIZAÇÃO HEMODINÂMICA



ANEXO II

RESSUSCITAÇÃO HEMODINÂMICA



ANEXO III Fluxograma da Estratégia ARDSNET

