

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

**TESTES RÁPIDOS DE MATURIDADE
PULMONAR NO ASPIRADO GÁSTRICO DE
RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS PARA O
DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DO
DESCONFORTO RESPIRATÓRIO**

INAH WESTPHAL BATISTA DA SILVA DANIEL
inah_s@yahoo.com

PORTO ALEGRE
2008

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

**TESTES RÁPIDOS DE MATURIDADE
PULMONAR NO ASPIRADO GÁSTRICO DE
RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS PARA O
DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DO
DESCONFORTO RESPIRATÓRIO**

INAH WESTPHAL BATISTA DA SILVA DANIEL

Dissertação de Mestrado
apresentado à faculdade
de medicina da PUCRS
para obtenção do título de
Mestre em Medicina,
concentração em
Pediatria.

Orientador: Dr. Humberto Holmer Fiori

Co-orientador: Dr. Renato Machado Fiori

PORTO ALEGRE
2008

MESTRANDA: Inah Westphal Batista da Silva Daniel
Endereço: Avenida Othon Gama D'Eça, 891 / apto 203
Florianópolis / SC - CEP.: 88015-240
e-mail: inah_s@yahoo.com
TELEFONE: (51) 84311991 / (48) 84251991
ÓRGÃO FINANCIADOR: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (CAPES)
CONFLITO DE INTERESSE: NENHUM

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D184a Daniel, Inah Westphal Batista da Silva

Testes rápidos de maturidade pulmonar no aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros para o diagnóstico de síndrome do desconforto respiratório / Inah Westphal Batista da Silva Daniel. – Porto Alegre, 2008.
103 p.

Diss. (Mestrado) – Fac. de Medicina, PUCRS
Orientador: Dr. Humberto Holmer Fiori

1. Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-Nascido. 2. Doenças do Prematuro. 3. Surfactantes Pulmonares. I. Título.

CDD 618.92011

Bibliotecário Responsável

Ginamara Lima Jacques Pinto
CRB 10/1204

*“Senhor, dê-me serenidade para aceitar as coisas que não posso
mudar, coragem para mudar as coisas que posso e sabedoria
para distinguir umas das outras.”*

(Oração da Serenidade)

Dedicatória

*Ao meu amado marido, pelos sonhos que cultiva e que faz da
nossa vida uma eterna caminhada em busca de dias ainda mais
perfeitos.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Dr. Renato Machado Fiori** pela atenção, incentivo e sabedoria, que foram fundamentais no decorrer deste trabalho.

A meus **pais e irmãos**, pelo exemplo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Humberto Holmer Fiori** pela sua orientação.

Aos **plantonistas da UTI-neonatal e residentes de pediatria** do Hospital São Lucas da PUCRS que auxiliaram na coleta e armazenamento dos aspirados gástricos.

Às **enfermeiras e técnicas de enfermagem da UTI-neonatal** do Hospital São Lucas da PUCRS pelo apoio dispensado.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (**PUCRS**) pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela possibilidade de concluir o mestrado como bolsista.

Ao **Laboratório de Hematologia** do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo suporte durante a realização das contagens dos corpos lamelares.

Às secretárias **Carla Carmo de Melo Rothmann** e **Ana Clara da Silveira Cardoso**, por gerarem um ambiente de amizade e cooperação.

Ao **Dr. Renato Stein**, Dra. **Anna Cláudia Drews** por terem cedido o diluente no início do nosso projeto e ao colega **Gustavo Leivas** por ter me ensinado como proceder a diluição.

A todos aqueles que deixei de citar mas, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO	2
1.1 Desenvolvimento pulmonar	2
1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório	4
1.3 Surfactante Pulmonar	9
1.4 Testes de Maturidade Pulmonar	15
1.4.1 Contagem de Corpos Lamelares	16
1.4.2 Teste de Microbolhas Estáveis	26
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CAPÍTULO II

5 METODOLOGIA	46
5.1 Apreciação do Projeto de Pesquisa	46
5.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	46
5.3 Delineamento	47
5.4 População e Amostra	47
5.5 Procedimentos	48
5.5.1 Cadastro dos pacientes	48
5.5.2 Coleta do aspirado gástrico	49
5.5.3 Processamento das amostras	50
5.5.3.1 Contador automático de células (Sysmex XT-1800i)	51
5.5.4 Análise dos dados	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL	57
RESUMO	58
ABSTRACT	60
INTRODUÇÃO	62
PACIENTES E MÉTODOS	64
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

CAPÍTULO IV

7 CONCLUSÃO	81
--------------------------	-----------

ANEXOS

Anexo A – Ficha de cadastro do paciente	83
Anexo B – Planilha de coleta de dados (pacientes sem SDR)	84
Anexo C – Planilha de coleta de dados (pacientes com SDR)	85

APÊNDICES

Apêndice A - Carta de aprovação pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança – PUCRS	87
Apêndice B - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS	88

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1 -** Alvéolos com e sem surfactante, evidenciando a tendência ao colapamento alveolar naquele sem surfactante no qual a tensão superficial é maior.
- Figura 2 -** Ciclo de vida do surfactante pulmonar.

Capítulo II

- Figura 1 -** Aparelho contador hematológico de células Sysmex XT1800i

Capítulo III

- Figura 1 -** Contagem de corpos lamelares em aspirado gástrico de pacientes com e sem Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR), diluído em solução de Dithiothreitol (DTT) e Soro Fisiológico (SF).
- Figura 2 -** Curva ROC da Contagem de Corpos Lamelares para diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR), considerando diferentes pontos de corte.
- Figure 3 -** Curva ROC para o teste de microbolhas estáveis (TME) para diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) considerando diferentes pontos de corte.

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

Tabela 1 - Características dos pacientes ao nascimento

Tabela 2 - Contagem de corpos lamelares (CCL) e teste de microbolhas estáveis (TME) em aspirado gástrico de pacientes com e sem a Síndrome do desconforto respiratório (SDR)

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Aspirado Gástrico
ANOVA	Análise de Variância
CCL	Contagem de Corpos Lamelares
CL	Corpos Lamelares
CPAP	<i>Continuous Positive Airway Pressure</i> (Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas)
DM	Diabetes mellitus
DMH	Doença da Membrana Hialina
DP	Desvio-padrão
DTT	Dithiothreitol
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FiO₂	<i>Fraction of Inspired Oxygen</i> (Fração de Oxigênio Inspirado)
fL	Fentolitro
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
HSL	Hospital São Lucas
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade Gestacional
L/E	Lecitina/esfingomiolina
LA	Líquido Amniótico
mbe	Microbolhas Estáveis
µl	Microlitro
OMS	Organização Mundial da Saúde

PN	Peso de Nascimento
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ROC	<i>Receive Operator Characteristic</i>
RNPT	Recém-Nascido Prematuro ou Pré-Termo
RNT	Recém-Nascido a Termo
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório
SP-A	Proteína A do Surfactante
SP-B	Proteína B do Surfactante
SP-C	Proteína C do Surfactante
SP-D	Proteína D do Surfactante
TDx-FLMII	relação surfactante/albumina (miligrama de surfactante por grama de albumina)
TME	Teste de Microbolhas Estáveis
TTRN	Taquipnéia Transitória do Recém-Nascido
VM	Ventilação Mecânica

RESUMO

Objetivo: avaliar os valores obtidos na contagem de corpos lamelares (CCL) e teste de microbolhas estáveis (TME), realizados em aspirado gástrico de prematuros com e sem Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) e propor pontos de corte em cada teste para predição dessa síndrome.

Métodos: foi realizado um estudo prospectivo, incluindo 63 pacientes (34 com SDR), com idade gestacional entre 24 e 34 semanas nascidos no Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, no período entre outubro de 2007 e junho de 2008.

Resultados: utilizando-se um ponto de corte na CCL de 42.000 corpos lamelares/ μ l para predição do diagnóstico de SDR, observou-se uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 86%. Para o TME, com um ponto de corte de 14 microbolhas/ mm^2 , obteve-se uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 86%. Associando-se os dois testes em série, a sensibilidade e a especificidade foram de 86% e 98%, respectivamente.

Conclusão: os pontos de corte sugeridos neste trabalho mostraram que a CCL e o TME apresentam adequada acurácia diagnóstica, podendo ser usados como preditores de SDR, reduzindo as entubações e uso de surfactante desnecessários, além de serem testes de rápida e fácil realização.

Descritores: Microbolhas, Síndrome do desconforto respiratório, Surfactante pulmonar, Recém-Nascido, Prematuro

ABSTRACT

Objectives: the aim of this research was to evaluate the lamellar body counts (LBC) and stable microbubble test (SMT) performed on gastric aspirates from preterm babies with and without Respiratory Distress Syndrome (RDS), and to propose cutoff value for these tests for RDS prediction.

Methods: a prospective study including 63 patients (34 with RDS), with gestational age between 24-34 weeks, born at the Hospital São Lucas, Pontificia Universidade Católica of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, from October 2007 through June 2008.

Results: when a cutoff value of 42.000 lamellar body/ μ l was used to predict RDS, the LBC showed a sensibility of 92% and a specificity of 86%. For the SMT with a cutoff value of 14 microbubble/ mm^2 , the sensibility was 94% and the specificity 86%. Using both tests in series the sensibility and specificity changed to 86% and 98%, respectively.

Conclusion: the cutoff values suggested in this research showed that LBC and SMT have adequate accuracy and could be used as predictors tests for SDR, reducing the the unnecessary intubation and surfactant use, beyond been fast and easy tests.

Key Words: Microbubble, Respiratory distress syndrome, Pulmonary surfactant, Newborn, Premature.

Capítulo I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Desenvolvimento pulmonar

A maturidade fetal consiste no pleno desenvolvimento dos diversos órgãos e sistemas fetais que, no seu processo fisiológico normal, completa-se entre 37 e 40 semanas de gestação. A maturidade do sistema respiratório fetal ocorre em torno da 35ª semana de gestação, quando as adaptações anatômicas e funcionais permitem ao recém-nascido prematuro (RNPT) sobreviver ao ambiente extra-uterino¹.

O desenvolvimento pulmonar normal pode ser dividido em cinco períodos (embrionário, pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar)¹⁻⁴:

- Período embrionário: inicia com o aparecimento do botão pulmonar, entre o 26º e 28º dia após a fecundação. Este botão irá se dividir em dois brotos que posteriormente se ramificarão para a formação dos brônquios principais. Próximo à 6ª semana após a fecundação, todos os segmentos broncopulmonares tornam-se identificáveis.

- Período pseudoglandular: nesta fase há a formação de todos os condutos aéreos e o aparecimento do esboço acinar. As células que revestem a árvore brônquica são ricas em glicogênio, sendo que esta reserva tem sido relacionada posteriormente com a síntese das substâncias surfactantes. Os ramos axiais dos segmentos broncopulmonares continuam a dividir-se e, na 16ª semana de gestação, assumem um aspecto morfológico semelhante ao pulmão adulto. Ao final deste período, a maioria das estruturas pulmonares está formada, exceto as unidades para as trocas gasosas.
- Período canalicular: surgem as primeiras estruturas relacionadas ao brônquio terminal. Com 24 semanas, algumas células que revestem o ácino diferenciam-se em pneumócitos tipo I e II. O pneumócito tipo I é uma célula com funções principalmente relacionadas ao revestimento alveolar. O pneumócito tipo II é uma célula rica em corpúsculos lamelares, que são estruturas intracelulares ricas em lipídeos e que armazenam as substâncias surfactantes. Ao final deste período, o pulmão fetal já apresenta certa capacidade de realizar trocas gasosas, embora ainda esteja imaturo.
- Período sacular: compreende desde a 28ª semana até o nascimento. No início desse período, as vias aéreas terminam em um grupo de sacos terminais que vão se diferenciar no termo da gestação em ductos alveolares e alvéolos. Ocorre

expansão importante do espaço respiratório, resultando em rápido aumento da superfície destinada às trocas gasosas.

- Período alveolar: inicia-se ao redor da 36^a semana de gestação e continua até os oito anos de idade. O maior aumento no número de alvéolos ocorre nos dois primeiros anos de vida.

1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) ou Doença da Membrana Hialina (DMH) é o distúrbio respiratório mais comum em recém-nascidos prematuros⁵⁻⁸.

A SDR é resultante primariamente da deficiência quantitativa ou qualitativa de surfactante, cuja síntese e liberação estão relacionadas com a maturidade pulmonar que é vital para o estabelecimento da função respiratória ao nascimento⁹⁻¹¹. Essa deficiência leva a atelectasias progressivas, perda de capacidade residual funcional, alterações na relação ventilação-perfusão e uma distribuição desigual da ventilação¹². É uma condição progressiva, durante as primeiras horas e dias de vida¹³.

O risco de desenvolver SDR é inversamente proporcional à idade gestacional (IG), variando de 5% a 95% nos RNPT^{14, 15}. Segundo Grenache e Gronowski¹⁶, a SDR ocorre em mais de 60% dos RNPT com 29 semanas, 20% daqueles com 34 semanas e menos de 5% se IG maior ou igual a 37 semanas.

Fanaroff et al¹⁷ relatou os seguintes incidências de SDR em relação ao peso de nascimento (PN):

- 44% em RNPT entre 501-1500 g
- 71% em RNPT entre 501-750 g
- 55% em RNPT entre 751-1000 g
- 37% em RNPT entre 1001-1250 g
- 23% em RNPT entre 1251-1500 g

Além da prematuridade, outros fatores aumentam o risco de SDR como sexo masculino, diabete materna, asfixia ao nascimento, raça branca, sepse, descolamento prematuro da placenta, eritroblastose fetal, gestações múltiplas^{14, 15}, enquanto que o uso do corticóide antenatal entre 24-34 semanas diminui este risco^{7, 18}. O uso de corticóide antenatal, além de reduzir a incidência e a gravidade da SDR também é capaz de reduzir a mortalidade neonatal e a hemorragia peri-intraventricular (HPIV)¹⁹⁻²¹.

Clinicamente a SDR se apresenta como esforço respiratório precoce, cianose, gemência, retração esternal/costal e taquipnéia que pode evoluir para falência respiratória. Um outro achado comum é a necessidade progressiva de oxigenioterapia. O diagnóstico pode ser confirmado com radiografia de tórax que apresentará a imagem clássica de “vidro fosco” e broncogramas aéreos²².

Chapman⁹ levou em conta os seguintes critérios para o diagnóstico de SDR em seu trabalho:

- Início precoce de esforço respiratório que requer mais de 30% de oxigênio suplementar por período superior a 24 horas;

- Retrações, gemência e sons respiratórios anormais durante respiração espontânea ou evidência de pobre expansão pulmonar em ventilação mecânica (VM);
- Radiografia de tórax com achados de perda de volume pulmonar, broncogramas aéreos, infiltrado difuso ou reticular;
- Culturas negativas e ausência de anomalias congênitas que pudessem confundir o diagnóstico.

A evolução clínica depende da gravidade do quadro, do peso e da IG ao nascimento. Quando não complicada, caracteriza-se por uma piora progressiva dos sintomas até o segundo ou terceiro dia de vida, com início da resolução em torno das 72 horas²³.

O manejo da SDR deve providenciar intervenções que aumentem o número de sobreviventes enquanto diminuem os potenciais efeitos adversos²². Mais de 500.000 crianças nascem prematuramente, nos Estados Unidos (EUA), a cada ano e muitas terão SDR ao nascimento²⁴. Em 2003, o índice de mortalidade infantil por SDR nos EUA foi de 20 para cada 100.000 nascidos vivos²⁵, significativamente menor do que relatado em 2002¹⁶. Mesmo com o uso rotineiro de corticóide antenatal e tratamento pós-natal com surfactante, a SDR continua sendo uma das maiores causas de mortalidade neonatal²⁶.

O tratamento consiste em suporte ventilatório com adequada expansão pulmonar, oxigenioterapia, medidas de suporte e reposição de surfactante. A administração de surfactante no estágio inicial da doença

pode diminuir as lesões decorrentes do colapso e re-expansão pulmonares, além de reduzir a necessidade de VM^{22, 27}.

Pulmões com função normal do sistema surfactante toleram milhares de insuflações por ventilação (manual ou mecânica) sem lesão significativa, enquanto que pulmões com pouco surfactante sofrem graves lesões com a mesma ventilação²⁸. A seqüela clínica do aumento de suporte ventilatório pode continuar e tem risco significativo para RNPT que lutam para desenvolver competência respiratória²⁹.

O primeiro relato de reposição terapêutica de surfactante ocorreu em 1980 e muitos outros trabalhos foram lançados logo em seguida³⁰⁻³², porém somente em 1990 o FDA (Food and Drugs Administration) aprovou a primeira droga surfactante exógena, o Exosurf^{*18}.

Experimentos com surfactante em RNPT têm incluído aqueles entre 23 e 34 semanas de IG e/ou PN entre 500 g e 2000 g. Os resultados do subgrupo menor de 30 semanas e/ou menos de 1250 g de PN indicaram que a terapia surfactante reduziu o índice de mortalidade mais efetivamente neles e naqueles RNPT com PN inferior a 1250 g do sexo masculino³³.

Desde a introdução de preparados surfactantes, as possibilidades da terapia de reposição de surfactante têm aumentado^{34, 35}. Em recém-nascidos com SDR a resposta clínica à terapia com surfactante depende da qualidade do material exógeno, da severidade da doença e da hora oportuna do tratamento³⁶.

* GlaxoSmithKline, Middlesex, Inglaterra.

A terapia de reposição de surfactante para o tratamento da SDR pode ser dividida em 2 estratégias, baseada no tempo de nascimento: profilática e de resgate^{18, 37}.

O tratamento profilático com surfactante (em até 30 minutos após o nascimento, antes do surgimento dos sintomas) oferece a vantagem de rapidamente estabilizar o *pool* de surfactante e melhorar a mecânica pulmonar. A desvantagem é que crianças que não desenvolveriam SDR seriam entubadas e receberiam uma droga não necessária¹⁸.

O tratamento de resgate evita o excesso de terapia, tratando somente aqueles com diagnóstico de SDR. É subdividido em precoce (em até 2 horas de vida) e tardio (mais de 2 horas de vida). A desvantagem dessa modalidade é que até a definição de SDR e administração de surfactante poderá ocorrer agravamento da lesão pulmonar¹⁸.

Para RNPT com menor risco de SDR, como os nascidos entre 28 e 30 semanas, o tratamento profilático com surfactante pode resultar em excesso de tratamento em mais de 35% dos pacientes¹⁸.

Estudos clínicos têm mostrado que o tratamento profilático com surfactante ao nascimento é superior ao tratamento de resgate tardio³⁷⁻³⁹. Soll e Morley realizaram uma metanálise em 2007 e concluíram que a administração profilática de surfactante em RNPT com risco de desenvolver SDR (menores que 30-32 semanas) comparada com a modalidade de administração de resgate teve incidência diminuída de pneumotórax, enfisema intersticial e morte³⁷. Estes autores concluem também que não está claro o exato critério para julgar quem deverá receber surfactante profilático.

1.3 Surfactante Pulmonar

O papel do surfactante começou a ser mencionado por Neergard apud Clements, Avery¹² e Obladen⁴⁰, um fisiologista que escreveu em 1929 sobre “a força retrátil do pulmão, dependente da tensão superficial do alvéolo”.

Na década de 40, Greenwald⁴¹ estudou o pulmão de recém-nascidos autopsiados e descreveu a hipoaeração, comparando os pulmões a um órgão maciço, que poderia ser inflado com líquido, mas perdia a arquitetura normal quando inflado com ar.

No final da década de 50, Avery e Mead⁴² propuseram que a deficiência de surfactante pulmonar presente em prematuros determinava o colapamento alveolar, sendo fundamental na patogênese da membrana hialina.

Um salto na terapêutica da SDR ocorreu com Fujiwara em 1980 que utilizou pela primeira vez, em um estudo não controlado, surfactante por via intra-traqueal em prematuros com SDR, com melhora evidente da oxigenação, mostrando a eficácia da nova terapêutica⁴³.

O surfactante pulmonar endógeno é uma substância capaz de estabilizar os alvéolos e bronquíolos durante a fase expiratória, evitando o colapso das vias aéreas distais e a perda do volume pulmonar^{5, 21} (figura 1). Durante a inspiração ele promove o recrutamento alveolar uniforme, reduzindo o gradiente pressórico entre interstício e alvéolo, constituindo um sistema essencial para que ocorra uma efetiva ventilação e troca gasosa⁵.

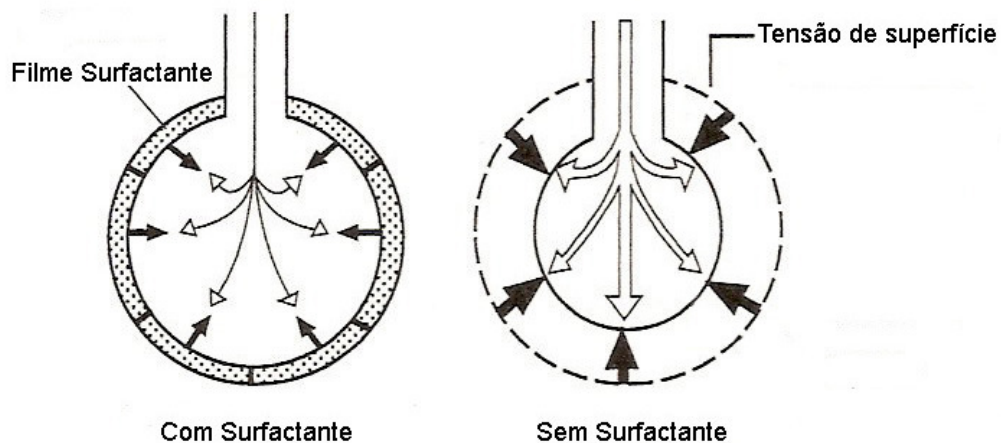


Figura 1: Alvéolos com e sem surfactante, evidenciando a tendência ao colapamento alveolar naquele sem surfactante no qual a tensão superficial é maior (adaptado de Goldsmith e Karotkin⁴⁴)

Surfactantes pulmonares fisiologicamente efetivos têm os três seguintes comportamentos essenciais¹⁸:

1. Capacidade de diminuir a tensão superficial;
2. Habilidade de ser fixado na interface ar-água;
3. Capacidade para dinamicamente distribuir e redistribuir ao longo da interface ar-água durante a respiração.

Todo processo metabólico do surfactante ocorre no pneumócito tipo II, incluindo sua síntese, reciclagem e catabolismo⁴⁵. Após a sua produção, é organizado e armazenado nos corpos lamelares e posteriormente excretado para o espaço alveolar, através de exocitose⁴⁶⁻⁴⁸.

Uma característica própria dos pneumócitos tipo II consiste na presença de grandes corpos lamelares (organelas ricas em lipídios que constituem sítio de estocagem das substâncias surfactantes) que representam 18% a 24% do citoplasma destas células. Os corpos

lamelares (CL) são expelidos dos pneumócitos tipo II por meio de exocitose e convertidos em mielina tubular no lúmen alveolar. Acredita-se que os fosfolípidos sejam transportados dos sítios de síntese para os corpos lamelares por meio de proteínas transportadoras¹ (figura 2).

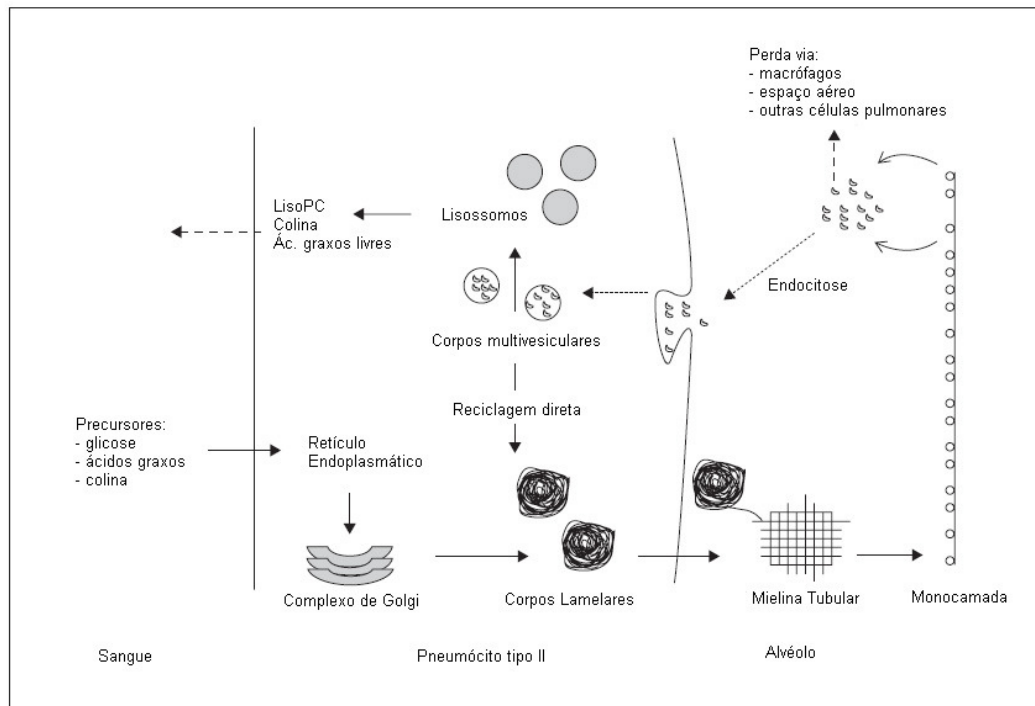


Figura 2: Ciclo de vida do surfactante pulmonar (Adaptado de: Zimmermann et al.⁴⁹)

Os corpos lamelares são organelas com composição muito similar ao surfactante. Aparecem primeiramente no citoplasma dos pneumócitos fetais, entre 22 e 24 semanas de gestação, tornam-se mais numerosos e são continuamente secretados no alvéolo fetal⁴⁶. A sua contagem tem sido relacionada com a IG, de forma a se tornar um método adequado para avaliar a maturidade pulmonar fetal⁵⁰.

Os movimentos respiratórios fetais carregam os corpos lamelares presentes no alvéolo para o líquido amniótico (LA)⁴⁶. O feto deglute este líquido, fazendo com que o conteúdo gástrico desses recém-nascidos

contenha também corpos lamelares, estimando assim a quantidade de surfactante produzida⁵¹.

O surfactante é uma molécula complexa, composta por fosfolipídios (80%), lipídios neutros (10%) e proteínas específicas (10%). Entre as propriedades da porção fosfolipídica, formada basicamente por fosfatidilcolina, destacam-se: capacidade de reduzir a tensão superficial alveolar, estabilidade durante a compressão, rápida absorção e capacidade de formar rapidamente a camada de fosfolipídio após a dispersão em água⁴⁵.

Quando a fina camada de surfactante é comprimida e descomprimida durante os movimentos respiratórios, os fosfolipídeos insaturados e os componentes das proteínas surfactantes cedem à pressão e precedem um aumento de dipalmitilfosfatidilcolina, levando a uma redução da tensão superficial a níveis muito mais baixos, com formação de vesículas surfactantes. As vesículas menores são capturadas principalmente pelas células tipo II e reutilizadas para nova síntese de surfactante. Em condições normais aproximadamente 50% do surfactante presente no espaço alveolar está na forma de grandes agregados ativos e 50% na forma de pequenas vesículas¹.

As proteínas que compõem o surfactante são quatro: Proteína A (SP-A), Proteína B (SP-B), Proteína C (SP-C) e Proteína D (SP-D). A SP-B e SP-C atuam na redução da tensão superficial alveolar e são hidrofóbicas. As demais possuem característica hidrofílica e apresentam propriedades imunomodulatórias^{14, 45, 52}. Especificamente a SP-A aumenta a função fagocítica dos macrófagos alveolares e a resistência do

complexo surfactante lipídico contra inibidores de atividade de superfície das células alveolares tipo II¹⁵. Deficiência de SP-B também tem sido reconhecida como uma causa hereditária rara de desconforto respiratório letal⁵³ e mais recentemente outras anomalias genéticas levando a falência respiratória na infância têm sido reconhecidas e caracterizadas⁵⁴.

A quantidade de surfactante pulmonar diminui com a idade, porém não de maneira significativa. É interessante notar que prematuros com SDR possuem uma quantidade de surfactante aproximada de 1 a 5 mg/kg⁵⁵, semelhante à observada em adultos, no entanto dez vezes menos do que em recém-nascidos a termo (RNT) e bastante inferior à dose utilizada para tratamento da SDR. Isso mostra a necessidade de um *pool* maior no momento do nascimento, para assegurar uma função adequada¹¹.

O advento da terapêutica de reposição com surfactante exógeno possibilitou reduzir de modo significativo a mortalidade dos prematuros que apresentam a SDR. Atualmente, a instilação traqueal do surfactante faz parte da rotina médica no manuseio clínico de neonatos que apresentam imaturidade pulmonar⁵⁶.

O índice de mortalidade por SDR diminuiu aproximadamente 50% durante a última década com o advento da terapia com surfactante⁵⁷.

A combinação de CPAP nasal precoce e terapia surfactante pode retardar a progressão da síndrome melhorando a função pulmonar, demonstrado pelo aumento do índice de PO₂, diminuição do PCO₂ e redução da necessidade de VM¹³.

RNPT com IG igual ou menor a 30 semanas têm se beneficiado tanto com tratamento profilático quanto terapêutico, no entanto, RNPT que receberam surfactante profilático tiveram menor incidência e severidade do desconforto respiratório. Também ocorreram menores complicações da SDR como morte, pneumotórax e enfisema intersticial pulmonar³³.

Os surfactantes exógenos disponíveis para uso clínico ou laboratorial são classificados em naturais e sintéticos. Os naturais (de origem animal) são obtidos por extração com solventes orgânicos, utilizando pulmões bovinos ou suínos e não contêm SP-A nem SP-D em sua composição. Estas proteínas são perdidas no processo de isolamento lipídico, por serem hidrossolúveis. Já os surfactantes sintéticos não possuem nenhuma proteína, tendo uma composição lipídica própria¹.

Tanto surfactantes derivados de animais quanto sintéticos são benéficos para profilaxia e terapia da SDR em RNPT. O tratamento com surfactante derivado animal tem várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos livres de proteína: menor índice de mortalidade e pneumotórax, além de menor FiO_2 e necessidade de VM. Novos surfactantes sintéticos que contêm proteínas ou peptídeos que imitam a atividade proteica do surfactante estão sob investigação^{33, 58}. De acordo com Sweet et al²², surfactantes naturais devem ser usados em preferência aos sintéticos.

1.4 Testes de Maturidade Pulmonar

Testes para estimar a maturidade pulmonar do RNPT vêm sendo estudados para que não seja administrado surfactante exógeno a todos os prematuros com menos de 32 semanas de gestação, mas somente àqueles que apresentem testes indicando imaturidade pulmonar. A estes pacientes seria então administrado surfactante precocemente, assim que os testes demonstrassem imaturidade e antes que o paciente apresentasse sinais de sofrimento respiratório⁵⁹.

De acordo com Kopelman et al⁵⁶, o estabelecimento de um critério diagnóstico preciso da SDR esbarra na dificuldade de se obter um método propedêutico simples e prático para avaliar a maturidade pulmonar.

Desde que o primeiro teste de maturidade pulmonar fetal foi descrito há mais de duas décadas, avanços na metodologia têm produzido testes diagnósticos sensíveis que sejam rápidos e precisos. Infelizmente os testes disponíveis continuam demonstrando baixa especificidade diagnóstica e permanecem com pouca predição de imaturidade pulmonar fetal¹⁶.

O teste de maturidade pulmonar fetal ideal deve ser acurado e preciso, relativamente livre de interferências, um bom preditor de maturidade e imaturidade, tecnicamente exato, realizável 24 horas por dia e de baixo custo⁹.

Vários testes para avaliação da maturidade fetal têm sido desenvolvidos, grande parte destes em LA, sendo eles^{34, 60}:

- Métodos e medidas de concentração do surfactante: fosfolipídio total, lecitina, proteína do surfactante, contagem de corpos lamelares;
- Medida de uma substância em relação a um componente de referência: índice lecitina/esfingomielina (L/S), palmitato/estearato, fosfatidilglicerol/fosfolipídio total;
- Métodos biofísicos de mensuração: medida de tensão superficial, teste de estabilidade da espuma, teste de microbolhas estáveis, polarização fluorescente;
- Medidas indiretas de surfactante: densidade óptica a 650 nm, estabilidade da bolha em éter.

1.4.1 Contagem de Corpos Lamelares

A contagem de corpos lamelares (CCL) no LA, através do contador de células, foi descrita em 1989 por Dubin⁶¹ como um teste de triagem para avaliação de maturidade pulmonar fetal, sendo um teste rápido, de baixo custo e possível de ser realizado com um pequeno volume de amostra³⁸. Desde este tempo, CCL é utilizada nas instituições e a sua utilidade para determinar a maturidade pulmonar tem sido descrita em estudos retrospectivos e prospectivos⁶². Muitas pesquisas têm demonstrado a alta correlação entre a CCL e outros métodos usados para testar a maturidade pulmonar fetal⁶³, como o método tradicional TDx-

FLMII (relação surfactante/albumina - miligrama de surfactante por grama de albumina)⁹ ou a polarização fluorescente¹⁰.

A similaridade do tamanho do corpo lamelar (1,7 a 7,3 fl ou 1 a 5 μm) com o tamanho da plaqueta (5 a 7 fl ou 2 a 4 μm) permite o uso do contador de células hematológicas automatizado para quantificar o número de corpos lamelares. Esta técnica, utilizando LA, tenta estimar a produção de surfactante intra-útero e assim predizer o grau de maturidade pulmonar fetal¹⁶.

Em outro trabalho, Dubin⁶⁴ considerou que quando a CCL é considerada madura, os testes mais custosos e demorados como índice L/S e PG são desnecessários.

As vantagens da CCL incluem: rapidez, objetividade, necessidade de pequeno volume de amostra, disponibilidade universal de instrumento, menor dependência de técnica, baixo custo e reproduzível nos equipamentos de laboratório hospitalar^{62, 63, 65}.

A centrifugação é um passo na técnica de Gluck para a determinação de L/S porém não deve ser usado para a CCL por causar importante diminuição destas partículas⁵⁰. Centrifugações demoradas ou com forças aumentadas eliminam mais surfactante. Entretanto, os corpos lamelares poderão depositar-se no fundo do recipiente se a amostra for deixada em repouso. As amostras devem ser completamente agitadas antes de serem divididas ou testadas⁶⁶.

Dubin⁶¹ relatou que a centrifugação de amostras de LA, a 500 x g durante cinco minutos, poderia diminuir a CCL em 10% a 40%. Roiz-Hernández et al⁵⁰, citando a mesma velocidade e tempo de centrifugação,

relataram que até 1/3 dos corpos lamelares podem ser perdidos na sedimentação. Neerhof et al⁶⁷ enfatizaram que a centrifugação pode causar confusão e erro, não sendo necessária e devendo ser abandonada.

A contaminação com sangue osmoticamente lisado tem mostrado um efeito insignificante na CCL⁶³. Outro estudo mostrou que a contaminação com sangue altera a maioria dos testes de maturidade pulmonar fetal porque o plasma contém altas concentrações de muitos fosfolipídios⁶⁶. Além do sangue, amostras contendo muco ou mecônio poderiam também alterar a CCL⁶⁷.

Testes quantitativos como CCL podem ser afetados pelo volume de LA, em oligoâmnio a contagem pode estar falsamente aumentada e em polidrâmnio falsamente diminuída^{62, 67}.

Depois da coleta, a amostra no tubo deve ser imersa em gelo seco para transporte ao laboratório. Resfriando as amostras, reduz-se a atividade de qualquer enzima presente que possa degradar os fosfolipídios. Para estudos a longo prazo, o LA pode ser armazenado a -20°C ou -70°C ⁶⁶.

A CCL tem se mostrado estável por até 2 semanas em amostras armazenadas até 4°C ⁶⁸ e por 10 dias em temperatura ambiente¹⁶. O efeito do congelamento não é claro, com apenas um relato indicando não haver mudança⁶⁹ e outro indicando diminuição de 15% na CCL⁷⁰.

Em cada instrumento usado para medida da CCL, o diâmetro da abertura do canal contador de plaquetas pode afetar os valores de ponto de corte^{66, 71}.

Dubin⁶¹ fez uso do aparelho Coulter S + IV[†] para a CCL em LA com e sem centrifugação. Adotando um ponto de corte maior ou igual a 40.000 corpos lamelares/ μ l para maturidade pulmonar fetal, em amostra não centrifugada, obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 69%. Enquanto que o valor para amostra centrifugada foi de 26.000 corpos lamelares/ μ l.

Ashwood et al⁴⁶ coletaram LA e acompanharam 247 recém-nascidos com IG entre 26 e 41 semanas. Destes, 28 desenvolveram SDR e tinham CCL no LA menor ou igual a 55.000 corpos lamelares/ μ l. Cinquenta e nove por cento dos casos sem SDR revelaram contagem maior que este valor. Com o ponto de corte para a CCL maior ou igual a 50.000 corpos lamelares/ μ l, a sensibilidade foi de 96% e a especificidade de 65%. Os autores destacaram que as amostras foram centrifugadas a 400 x g durante dois minutos e que isto poderia diminuir em 8% a contagem.

Dalence et al⁶³ estudaram 130 amostras de LA, com IG entre 26 e 40 semanas, centrifugadas imediatamente após chegada no laboratório a 276 x g durante cinco minutos. O sobrenadante foi processado em triplicata no contador de células. O primeiro valor foi descartado e a média do segundo e terceiro valor foi usada como resultado final. As contagens de corpos lamelares variaram entre 2.000 a 329.000 corpos lamelares/ μ l (média 49.000 corpos lamelares/ μ l). A SDR ocorreu em 12% dos RNPT, todos com CCL menor ou igual a 30.000/ μ l. Recomendam que uma CCL

[†] Coulter Electronics, Flórida, EUA.

superior a 30.000/ μ l seja considerada de baixo risco e inferior a 10.000/ μ l seja de alto risco para SDR.

Greenspoon et al⁷², tendo 70 amostras de LA, processaram-nas no aparelho Coulter JT[‡] e observaram na CCL uma sensibilidade de 100% e 89% de especificidade no ponto de corte superior ou igual a 46.000 corpos lamelares/ μ l para maturidade pulmonar fetal.

Lewis et al⁷¹ avaliaram 209 amostras de LA quanto à CCL. Todas as amostras limpas não foram centrifugadas e aquelas contendo sangue ou mecônio foram centrifugadas a 500 x g durante três minutos (este tempo foi justificado com o argumento de que a centrifugação numa mesma velocidade por cinco minutos poderia diminuir a contagem em até 40%). Utilizaram o analisador hematológico automático Sysmex NE 1500[§] e definiram dois pontos de corte: para imaturidade, uma CCL menor ou igual a 8.000 corpos lamelares/ μ l teve sensibilidade de 39% e especificidade de 100%; para maturidade, uma CCL superior a 32.000 corpos lamelares/ μ l teve sensibilidade de 85% e especificidade de 98%.

Gantar e Babnik⁷³ coletaram aspirado gástrico (AG) de 61 RNPT com IG menor ou igual a 35 semanas e os dividiram em dois grupos (com e sem SDR). Vinte e três pacientes tiveram diagnóstico de SDR e neste grupo a IG, PN e Apgar eram menores, além de baixa CCL (5.000 corpos lamelares/ μ l \pm 3.000, média \pm desvio padrão) e altas concentrações de albumina, bilirrubina e mecônio. No grupo sem SDR a média da CCL foi de 65.000 corpos lamelares/ μ l \pm 29.000/ μ l.

[‡] Coulter Electronics, Flórida, EUA.

[§] Sysmex Corporation, Japão.

Beinlich et al²⁶ compararam três diferentes métodos de maturidade pulmonar em LA para prever SDR: fosfatidilglicerol, concentração de fosfolípido e CCL. Sessenta e oito amostras foram testadas para CCL, imediatamente ou congeladas a 4°C e processadas em 24 horas. A amostra era agitada, centrifugada por cinco minutos a 300 x g e o sobrenadante era medido três vezes no canal eletrônico do contador de células Sysmex K800^{**}, com variação de 6%. Com uma CCL menor que 30.000 corpos lamelares/μl, a fim de prever SDR, a sensibilidade e especificidade encontradas foram de 83% e 67%, respectivamente.

Roiz-Hernández et al⁵⁰ tiveram como objetivo em seu estudo estabelecer a eficácia da medida do número de corpos lamelares na população saudável e achar o limite apropriado para diagnosticar maturidade pulmonar fetal. A prevalência de SDR encontrada foi de 14,8%. O LA foi coletado de 264 gestantes com IG entre 26 a 41 semanas. Após ser filtrado, o líquido foi processado em até uma hora no canal de plaquetas do contador celular Cell-Dyn 3000^{††}, sem centrifugação. Como resultados verificaram que uma CCL maior que 79.000 corpos lamelares/μl aumenta a segurança quanto à maturidade pulmonar e evita falso positivo, enquanto que uma CCL menor que 8.200 corpos lamelares/μl previne falso negativo.

Há muitas diferenças entre esse estudo e os publicados anteriormente, podendo ser devido a diversos fatores, entre eles: gestantes atendidas em trabalho de parto e sem outras patologias, ausência de indicação de amniocentese, amostras não centrifugadas

^{**} Sysmex Corporation, Japão.

^{††} Abbott Laboratories, Illinois, EUA.

(apenas filtradas para retirar os debris do LA) e diferença nos contadores celulares. Com isto, os autores sugerem mais estudos em subgrupos com patologias específicas⁵⁰.

Ross et al⁷⁴ analisaram 123 amostras de LA quanto à CCL, sendo 81 casos considerados maduros (66%) e 42 casos imaturos (34%). Amostras de LA contendo sangue ou mecônio foram excluídas. Foram utilizados dois contadores automáticos de células hematológicas da marca Coulter^{‡‡} (modelos MAXM e Gen-S). Não se encontrou diferença significativa entre os aparelhos. No primeiro, a CCL variou de 2.000 a 193.000 corpos lamelares/ μ l, definindo como ponto de corte para maturidade um valor maior que 41.500 corpos lamelares/ μ l (sensibilidade de 90,5% e especificidade de 87,7%) e para imaturidade um valor menor que 24.000 corpos lamelares/ μ l (sensibilidade de 78,6% e especificidade de 100%). No segundo aparelho, a contagem variou de 2.000 a 130.000 corpos lamelares/ μ l, definindo como ponto de corte para maturidade uma CCL superior a 32.000 corpos lamelares/ μ l (sensibilidade de 90,5% e especificidade de 85,2%) e para imaturidade inferior a 21.000 corpos lamelares/ μ l (sensibilidade de 71,4% e especificidade de 100%).

DeRoche et al⁶⁵ realizaram a CCL em LA de gestações complicadas por diabetes mellitus. Das 236 amostras, apenas 90 tiveram análise de CCL associadas a índice de lecitina/esfingomielina (L/S) e dosagem de fosfatidilcolina (PG). Destas, 76 eram de gestações a termo e 14 pré-termo. Para a CCL as amostras foram centrifugadas a 1000 x g durante dois minutos e o sobrenadante removido e agitado por 60

^{‡‡} Coulter Electronics, Flórida, EUA

segundos. A amostra foi analisada no aparelho Coulter SKTS^{§§} e a CCL variou de 13.000 a 256.000 corpos lamelares/ μ l. Adotando o ponto de corte maior ou igual a 37.000 corpos lamelares/ μ l como maturidade pulmonar fetal, a sensibilidade foi de 81% e a especificidade de 100%. Concluíram que em gestações complicadas por diabetes mellitus, a CCL é um teste de *screening*, reproduzível para determinar maturidade pulmonar fetal.

Verder et al⁷⁵ avaliaram 108 aspirados gástricos de RNPT entre 23 e 31 semanas de IG, que foram obtidos com até 30 minutos após o nascimento, centrifugados a 500 x g por dois minutos e congelados a -20°C para análise posterior (sem descrição de quanto tempo). Os tubos foram agitados cinco vezes antes da análise e a CCL variou de 0 a 275.000 corpos lamelares/ μ L. Os autores citaram três pontos de corte na CCL para predição de SDR: inferior a 2.000 corpos lamelares/ μ L (sensibilidade de 73% e especificidade de 70%), inferior a 3.000 corpos lamelares/ μ L (sensibilidade de 76% e especificidade de 60%) e inferior a 8.000 corpos lamelares/ μ L (sensibilidade de 84% e especificidade de 53%).

Chapman et al⁹ estudaram 88 amostras de LA coletadas em até 72 horas antes do nascimento, submetidas ao teste imediatamente ou congeladas a -70°C . As amostras não centrifugadas foram submetidas à análise no aparelho ADVIA 120^{***}. Aquelas que necessitaram de congelamento, antes de serem processadas, foram aquecidas em ar ambiente e agitadas. A prevalência de SDR encontrada foi de 15.9%. A

^{§§} Coulter Electronics, Flórida, EUA.

^{***} Bayer HealthCare, Nova York, EUA.

CCL nos pacientes não doentes (74 pacientes) variou de 6.000 a 369.800 corpos lamelares/ μ L, enquanto naqueles doentes (14 pacientes), oscilou entre 3.100 a 35.365 corpos lamelares/ μ L. Definindo o ponto de corte para maturidade na CCL como igual ou maior que 35.400 corpos lamelares/ μ L, encontraram uma sensibilidade de 100% e especificidade 67.6%.

Segundo Pieruccini et al⁷⁶, a CCL em AG de recém-nascidos a termo e pré-termo é um exame aplicável para seleção dos pacientes prematuros que precisarão de surfactante precocemente.

Ghidini et al⁷⁷ coletaram 102 amostras de LA, que foram processadas a fresco, agitadas por dois minutos e todas as contagens foram realizadas em duplicata. Dezesete pacientes desenvolveram SDR (16,7%), sendo que 11 tinham IG inferior a 35 semanas, três entre 35-37 e três com IG igual ou superior a 37 semanas. Foi verificada significativa correlação entre IG e CCL, bem como entre baixa contagem e o diagnóstico de SDR. Considerando uma CCL maior que 37.000 corpos lamelares/ μ L como limiar para maturidade pulmonar fetal obtiveram uma sensibilidade de 95% e valor preditivo negativo de 98%.

Karcher et al⁷⁸ avaliaram 238 amostras de LA obtidas através de amniocentese e centrifugadas a 500 x g durante cinco minutos, que foram submetidas aos testes de L/S, porcentagem de fosfatidilglicerol, CCL e TDx-FLMII. O resultado da CCL com ponto de corte para imaturidade menor que 30.000 corpos lamelares/ μ L teve uma sensibilidade de 90,9% e especificidade de 89,7%.

Haymond et al¹⁰ elaboraram um estudo retrospectivo (de 1998 a 2004), obtendo 184 amostras de LA, sendo 172 consideradas sem SDR. Os 12 casos compatíveis com SDR tiveram CCL entre 5.000 a 52.000 corpos lamelares/ μ L (apenas uma amostra com valor superior a 50.000 corpos lamelares/ μ L) e IG entre 32 e 36 semanas. No grupo sem SDR, 69 amostras revelaram CCL menor que 50.000 corpos lamelares/ μ L e 103 com valor maior ou igual a 50.000 corpos lamelares/ μ L. Definindo um ponto de corte na CCL para maturidade como sendo maior ou igual a 50.000 corpos lamelares/ μ L, a sensibilidade encontrada foi de 92% e a especificidade de 60%. Se o ponto de corte fosse aumentado para 53.000 corpos lamelares/ μ L, a sensibilidade aumentaria para 100% porém a especificidade diminuiria para 55%.

Hunter et al⁷⁹ examinaram 11 amostras de LA, armazenadas a -70°C (sem especificar o tempo de congelamento) e não centrifugadas, que foram submetidas à CCL: duas contagens manuais e uma através do contador de células Coulter^{†††}. O coeficiente de correlação entre os observadores, para as contagens manuais foi de 0,95 (IC95%: 0,84-0,99); entre Coulter e primeira contagem manual foi de 0,88 (IC95%: 0,62-0,97) e entre Coulter e segunda contagem manual foi de 0,92 (IC95%: 0,73-0,98). Este pequeno estudo piloto tentou demonstrar que a CCL para a maturidade pulmonar fetal usando microscópio óptico (com hemocromocitômetro de Newbauer) tem boa correlação com a CCL usando o contador de células padrão. Um detalhe importante é que não

^{†††} Coulter Electronics, Flórida, EUA.

foram descritas as características dos pacientes incluídos no estudo, como IG ou patologia associada.

Segundo Grenache¹⁶ os estudos da sensibilidade da CCL variam de 83% a 100% e a especificidade de 54% a 89%, dependendo do método e ponto de corte utilizados.

1.4.2 Teste de Microbolhas Estáveis

Uma outra forma de avaliar a maturidade pulmonar é através do Teste de Microbolhas Estáveis (TME). Secreções que contêm surfactante são capazes de formar microbolhas estáveis (mbe) quando agitadas com uma pipeta de Pasteur. Trata-se de uma metodologia simples e rápida, sendo realizada entre cinco a dez minutos. Para este teste podem ser utilizadas amostras de fluido amniótico, traqueal ou gástrico^{6, 80, 81}.

Ao nascimento o aumento da secreção de surfactante ocorre em resposta ao início da respiração que permite o influxo de surfactante recentemente secretado para o líquido amniótico presente no estômago, assim alterando o equilíbrio entre as concentrações no alvéolo e LA⁵¹.

A microbolha estável pode ser produzida apenas pelo surfactante pulmonar e não é influenciada por outros fluidos biológicos como sangue, mecônio, urina e saliva⁵¹. Pattle et al⁸² mostraram que 10% de citrato sanguíneo não produziu redução significativa na contagem de bolhas, 15% de sangue na mistura pode diminuir pela metade a contagem de bolhas e 27% pode reduzi-la a um quarto. Além disso, amostras contendo

mecônio são suspeitas e a centrifugação reduziu o índice de microbolhas estáveis em LA.

A acidez do AG não é considerada como capaz de alterar a formação de bolhas se a amostra for obtida precocemente após o nascimento, pois o pH gástrico em até 30 minutos após o nascimento é relatado como sendo neutro, similar ao LA⁵¹.

Há a necessidade de um método diagnóstico, rápido e acurado para identificar RNPT deficientes de surfactante ao nascimento e, de acordo com Verder et al³⁶, o TME pode ser esta ferramenta. Os primeiros estudos a respeito da acurácia do TME foram promissores, mas a experiência clínica está limitada a poucos centros^{51, 83}.

O TME, desenvolvido por Pattle et al⁸² em 1979, ganhou interesse renovado na era da terapia surfactante e tem sido mostrado como um teste acurado para determinar RNPT deficientes de surfactante que desenvolverão SDR, quando utilizado LA, AG ou aspirado traqueal⁸⁴⁻⁸⁶. A grande limitação para uso de fluido traqueal é a necessidade de entubação e a complexidade para obter a amostra⁶.

A técnica consiste em formar bolhas com a amostra, através de uma pipeta de Pasteur, durante seis segundos. O número de microbolhas estáveis, definidas como aquelas menores que 15 μm que permanecem após quatro minutos, é contado em um microscópio com uma objetiva de 10x, em um milímetro quadrado^{86, 87}.

Segundo Verder et al³⁶, trabalhos adicionais usaram outros tamanhos de microbolhas como alternativas: Chida et al⁸⁸ usaram diâmetro menor que 10 μm e Fiori et al⁸³ utilizaram menor que 20 μm .

Pattle et al⁸² analisaram amostras de LA quanto ao índice de L/E e TME. Quando avaliaram 268 amostras em relação aos valores do TME e IG, não se encontrou mais de 20 microbolhas/mm² antes de 31 semanas (n=25) e foi raro zero microbolhas/mm² após 37 semanas (1 em 173 pacientes).

Chida e Fujiwara⁸⁸ compararam o TME com outros testes preditores de maturidade fetal, em LA (concentração de lecitina, dosagem de fosfatidilcolina dessaturada, L/E, índice de fosfatidilcolina dessaturada/esfingomielina, concentração de proteína A do surfactante e concentração de proteínas B e C do surfactante). Quarenta gestantes entre 23-35 semanas tiveram LA coletado em até 12 horas antes do parto. O TME foi realizado a fresco e os demais exames feitos após congelamento. Dentre os RNPT destas gestantes, 14 apresentaram SDR (35%). Obtiveram uma sensibilidade de 50% e especificidade de 100% quando o ponto de corte para imaturidade no TME foi zero; para o ponto de corte menor que cinco a sensibilidade foi de 57% e especificidade de 96%.

Chida et al⁵¹ adotaram um ponto de corte predefinido para o TME: menor que 5mbe/mm² em LA e menor que 10mbe/mm² em AG. Foram coletadas 105 amostras de cada (o LA teve sua coleta em até 24 horas antes do nascimento e o AG em até 30 minutos após nascimento). Os recém-nascidos foram enquadrados em três grupos: grupo 1 (com SDR: 35 pacientes), grupo 2 (sem SDR, porém com outras patologias como taquipnéia transitória do recém-nascido, asfixia, broncopneumonia: 23 pacientes) e grupo 3 (sem desconforto respiratório: 47 pacientes). Vinte e

oito dos 35 neonatos com SDR tiveram LA menor que 5 mbe/mm², enquanto nenhum do grupo 2 ou 3 tiveram este valor. Vinte e dois destes 35 recém-nascidos com SDR apresentaram menos que 10 mbe/mm² no AG, enquanto um do grupo 2 e nenhum do grupo 3 tiveram teste positivo. Quando ambas as amostras (de LA e AG) foram levadas em consideração, a sensibilidade do TME em AG aumentou significativamente de 63% para 89%.

Boo et al⁸⁵ realizaram a coleta de aspirado traqueal instilando, por três vezes, 0,5 ml de soro fisiológico (SF) a 0,9% em traquéia do recém-nascido e aspirando em seguida. A quantidade de 0,1 ml do aspirado traqueal foi enviado para cultura, 0,1 ml para TME e o restante encaminhado ao laboratório. A amostra foi acrescida de 0,3 ml de SF a 0,9% e centrifugada a 300 x g durante 10 minutos para remoção de partículas. O sobrenadante foi congelado a -20°C até análise de SP-A. Ao todo foram utilizadas 104 amostras para este trabalho: 43 com SDR (4 bebês com IG igual ou maior a 37 semanas), 15 com Síndrome de Aspiração de Mecônio (todos a termo), 15 com broncopneumonia (BPN) e 31 sem alteração pulmonar (24 tiveram apnéia decorrente de asfixia, 4 com apnéia da prematuridade, 1 com distensão abdominal e 2 com pneumotórax). Quanto aos valores de TME, verificou-se diferença significativa entre o grupo de SDR (mediana de 6 mbe/mm²; variando de 0 a 90 mbe/mm²) em relação aos com BPN (mediana de 96 mbe/mm²; variando de 3 a 707 mbe/mm²) e sem doença pulmonar (mediana de 288 mbe/mm²; variando de 13 a 613 mbe/mm²). O TME igual ou menor a 70 mbe/mm² teve a maior acurácia para o diagnóstico de SDR, com uma

sensibilidade de 97,7% e especificidade 90,3%. A especificidade máxima encontrada foi com TME menor ou igual a 10 mbe/mm² e sensibilidade máxima com TME menor ou igual a 90 mbe/mm².

Teeratakulpisarn et al⁸⁹ citaram um teste usado para determinar a deficiência de surfactante chamado *Shake Test* que freqüentemente tem resultados falso-positivos (de 31% a 75%). O propósito do estudo foi avaliar o TME na predição do desenvolvimento de SDR quando realizado no AG, fazendo comparação com o *Shake Test* na mesma amostra. O AG dos 140 neonatos foi coletado em até uma hora de vida. Dentre os prematuros, 19 tiveram SDR e 28 não apresentaram desconforto respiratório. A comparação dos resultados de *Shake Test* e TME realizados em AG mostraram que o TME teve especificidade superior ($p < 0,0001$). A curva ROC do TME demonstrou uma grande área abaixo da curva, indicando aceitável acurácia diagnóstica. O ponto de corte menor que 20 mbe/mm² teve sensibilidade de 94,7% e especificidade de 95%.

Friedrich et al³⁴ relataram uma baixa sensibilidade do TME em aspirado traqueal (52%) e especificidade de 90% com um ponto de corte de 10 mbe/mm² para predição de SDR. As amostras foram coletadas durante as primeiras quatro semanas de vida do paciente, acrescidas de SF a 0,9% após aspiração, centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e congeladas a -20°C durante 48 horas até serem processadas. Vinte e nove pacientes fizeram parte do grupo controle e tiveram mediana de 307 mbe/mm² (variando de 0 a 1770 mbe/mm²) e 21 pacientes do grupo com SDR apresentaram mediana de 7 mbe/mm² (variando de 0 a 2145 mbe/mm²).

Berggren et al⁹⁰ realizaram TME em 33 AG de pacientes com e sem SDR, correlacionando o resultado do teste com a severidade da doença. Os aspirados foram centrifugados a 3000 x g, em seguida agitados e examinados para microbolhas usando microscópio conectado a um analisador de imagem. As microbolhas foram consideradas aquelas com diâmetro inferior a 20 μm e dependendo da quantidade destas na lâmina, classificadas como tendo boa atividade surfactante se mais de 70% da área estivesse preenchida por microbolhas, intermediária se entre 20% e 70% e baixa quando menos de 20%. Todos os recém-nascidos sem SDR (n=8) tiveram boa atividade, enquanto todos com SDR moderada a severa (n=15) tiveram atividade baixa e no grupo de SDR leve (n=10) 30% com boa atividade, 10% intermediária e 60% baixa. Estes valores tiveram diferença estatisticamente significativa.

Pereira⁹¹ estudou o efeito do congelamento do fluido gástrico para o teste e a concordância inter e intra-observador no TME. Concluiu que os resultados obtidos, tanto pela análise quantitativa quanto pela qualitativa, sugerem que o congelamento das amostras não altera substancialmente as contagens de microbolhas no TME.

Fiori et al⁸⁷ analisaram um conjunto de RNPT (n=110), sendo 40 com menos de 32 semanas de IG e 70 entre 32 e 34 semanas, comparando o TME com o Teste do Clique. Vinte e três pacientes (20,9%) preencheram o diagnóstico para SDR. Quando utilizado um ponto de corte de 10 mbe/mm² ou menos para definir o diagnóstico de SDR, a sensibilidade foi de 73,9% e especificidade de 92%. Se este valor fosse aumentado para até 15 mbe/mm² a sensibilidade aumentaria para 82,6%

enquanto que a especificidade diminuiria para 85,1%. Concluíram também que o TME foi superior ao Teste do Clique e que uso em conjunto não melhorou a capacidade de predição.

Fiori et al⁸⁴ avaliaram a função surfactante usando TME em AG de recém-nascidos a termo (RNT) ou próximos ao termo com diagnóstico clínico de taquipnéia transitória do recém-nascido. Em todos os bebês (30 com desconforto e 32 controles) os AG foram coletados nos primeiros 30 minutos de vida. Observaram que a maioria dos RNT ou próximos ao termo com desconforto respiratório apresentaram uma baixa contagem de microbolhas e que a maioria sem desconforto respiratório teve uma contagem alta. Quando se usou o melhor ponto de corte, que foi de 35 mbe/mm², a sensibilidade foi de 75% e a especificidade de 94%.

Eckert Seitz et al⁶ realizaram o TME em aspirado traqueal de 74 recém-nascidos que necessitaram de VM. Os valores do teste foram significativamente baixos nos grupos de SDR e Síndrome de Aspiração de Mecônio comparado com os outros grupos (com pneumonia, outras doenças cardíacas/pulmonares e sem doenças cardíacas/pulmonares). A curva ROC encontrou 120 mbe/mm² como o ponto de corte com mais alta acurácia para o diagnóstico de SDR (sensibilidade de 96,3% e especificidade de 97,6%).

Fiori et al⁸⁰ incluíram 98 recém-nascidos para análise de AG sendo que 54 receberam surfactante por apresentarem TME inferior a 25 mbe/mm². Dos 44 pacientes em que o TME foi maior que 25 mbe/mm², somente três precisaram de terapia de resgate. Dos outros 54, 23 tinham IG menor que 28 semanas e o restante entre 28 e 31 semanas. O

surfactante foi usado em 82% dos RNPT menores de 28 semanas e em 49 % nos RNPT entre 28 e 31 semanas, evitando-se neste grupo aplicar desnecessariamente surfactante em 51%.

2 JUSTIFICATIVA

A terapia de reposição do surfactante tem sido iniciada logo após o nascimento em crianças com o risco de desenvolvimento da SDR. Entretanto, muitos prematuros com idade gestacional abaixo de 34 semanas não necessitarão tratamento com surfactante. Testes de maturidade pulmonar (Contagem de Corpos Lamelares no líquido amniótico e Teste de Microbolhas Estáveis em aspirado gástrico) têm auxiliado para identificar os pacientes que se beneficiarão da terapêutica antes que os sinais/sintomas apareçam.

Muitos trabalhos na área da obstetrícia têm sido desenvolvidos baseados na Contagem de Corpos Lamelares no líquido amniótico. Porém pouco se conhece sobre esta contagem no aspirado gástrico, fluido facilmente obtido pelo neonatologista, e não se dispõe da comparação desta contagem com o Teste de Microbolhas Estáveis. A determinação de valores desses testes poderá contribuir na escolha de condutas visando a melhora da condição pulmonar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a Contagem de Corpos Lamelares e o Teste de Microbolhas Estáveis no aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros com idade gestacional de até 34 semanas com e sem Síndrome do Desconforto Respiratório.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os valores obtidos na CCL em amostras de aspirado gástrico diluídas com soro fisiológico e DTT (Dithiothreitol), a fresco e congelado;
- Determinar a CCL e TME no aspirado gástrico em cada grupo estudado;
- Comparar a acurácia da CCL e TME entre os grupos de prematuros para predizer SDR;

- Estabelecer o melhor ponto de corte na CCL e no TME, ou valor de referência, para prever necessidade de surfactante;
- Verificar se o uso dos dois testes em conjunto aumenta a acurácia do diagnóstico de SDR.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marcondes E, Vaz F, Ramos J, Okay Y. *Pediatria Básica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
2. Friedrich L, Corso AL, Jones MH. [Pulmonary prognosis in preterm infants]. *J Pediatr (Rio J)*. 2005 Mar;81(1 Suppl):S79-88.
3. Jobe AH, Ikegami M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:825-46.
4. Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000 Jan;82(1):F69-74.
5. Miyoshi MH. [Surfactant replacement therapy]. *J Pediatr (Rio J)*. 2001 Jul;77 Suppl 1:S3-S16.
6. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate*. 2005;87(2):140-4.
7. Hermansen CL, Lorah KN. Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician*. 2007 Oct 1;76(7):987-94.
8. Rodriguez RJ. Management of respiratory distress syndrome: an update. *Respir Care*. 2003 Mar;48(3):279-86; discussion 86-7.
9. Chapman JF, Ashwood ER, Feld R, Wu AH. Evaluation of two-dimensional cytometric lamellar body counts on the ADVIA 120 hematology system for estimation of fetal lung maturation. *Clin Chim Acta*. 2004 Feb;340(1-2):85-92.
10. Haymond S, Luzzi VI, Parvin CA, Gronowski AM. A direct comparison between lamellar body counts and fluorescent polarization methods for predicting respiratory distress syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2006 Dec;126(6):894-9.
11. Rebello CM, Proenca RS, Troster EJ, Jobe AH. [Exogenous surfactant therapy--what is established and what still needs to be determined]. *J Pediatr (Rio J)*. 2002 Nov-Dec;78 Suppl 2:S215-26.

12. Clements JA, Avery ME. Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr;157(4 Pt 2):S59-66.
13. Verder H, Robertson B, Greisen G, Ebbesen F, Albertsen P, Lundstrom K, et al. Surfactant therapy and nasal continuous positive airway pressure for newborns with respiratory distress syndrome. Danish-Swedish Multicenter Study Group. *N Engl J Med*. 1994 Oct 20;331(16):1051-5.
14. Hallman M, Haataja R, Marttila R. Surfactant proteins and genetic predisposition to respiratory distress syndrome. *Semin Perinatol*. 2002 Dec;26(6):450-60.
15. Rozov T. *Doenças Pulmonares em Pediatria. Diagnóstico e tratamento*. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 2004.
16. Grenache DG, Gronowski AM. Fetal lung maturity. *Clin Biochem*. 2006 Jan;39(1):1-10.
17. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Feb;196(2):147 e1-8.
18. Stevens TP, Sinkin RA. Surfactant replacement therapy. *Chest*. 2007 May;131(5):1577-82.
19. Crowley PA. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Jul;173(1):322-35.
20. Asabe K, Oka Y, Kai H, Shirakusa T. Effect of maternal dexamethasone treatment on the type II pneumocytes in hypoplastic lung by oligohydramnios: an ultrastructural study. *Pediatr Surg Int*. 2007 Oct;23(10):967-70.
21. Rushing S, Ment LR. Preterm birth: a cost benefit analysis. *Semin Perinatol*. 2004 Dec;28(6):444-50.
22. Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Didrik Saugstad O, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med*. 2007;35(3):175-86.
23. Bittar R. Distúrbios Respiratórios - Doença das Membranas Hialinas. In: Rugogo L, editor. *Manual de Neonatologia*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
24. CDC. National Prematurity Awareness Month. 2007 [cited 2008 10 mai]; Available from: www.cdc.gov/Features/PrematureBirth

25. Hoyert DL, Kung HC, Smith BL. Deaths: preliminary data for 2003. *Natl Vital Stat Rep.* 2005 Feb 28;53(15):1-48.
26. Beinlich A, Fischass C, Kaufmann M, Schlosser R, Dericks-Tan JS. Lamellar body counts in amniotic fluid for prediction of fetal lung maturity. *Arch Gynecol Obstet.* 1999;262(3-4):173-80.
27. Figueras-Aloy J, Quero J, Carbonell-Estrany X, Ginovart G, Perez-Rodriguez J, Raspall F, et al. Early administration of the second dose of surfactant (beractant) in the treatment of severe hyaline membrane disease. *Acta Paediatr.* 2001 Mar;90(3):296-301.
28. Jonson B. Ventilation patterns, surfactant and lung injury. *Biol Neonate.* 1997;71 Suppl 1:13-7.
29. Bissinger R, Carlson C, Michel Y, Dooley C, Hulseley T, Jenkins D. Secondary surfactant administration in neonates with respiratory decompensation. *J Perinatol.* 2008 Mar;28(3):192-8.
30. Smyth JA, Metcalfe IL, Duffty P, Possmayer F, Bryan MH, Enhorning G. Hyaline membrane disease treated with bovine surfactant. *Pediatrics.* 1983 Jun;71(6):913-7.
31. Gitlin JD, Soll RF, Parad RB, Horbar JD, Feldman HA, Lucey JF, et al. Randomized controlled trial of exogenous surfactant for the treatment of hyaline membrane disease. *Pediatrics.* 1987 Jan;79(1):31-7.
32. Enhorning G, Shennan A, Possmayer F, Dunn M, Chen CP, Milligan J. Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: a randomized clinical trial. *Pediatrics.* 1985 Aug;76(2):145-53.
33. Engle WA. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. *Pediatrics.* 2008 Feb;121(2):419-32.
34. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, Wauer RR. The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate.* 1998;73(1):10-8.
35. Dunn MS, Shennan AT, Zayack D, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis versus treatment. *Pediatrics.* 1991 Mar;87(3):377-86.
36. Verder H, Ebbesen F, Linderholm B, Robertson B, Eschen C, Arroe M, et al. Prediction of respiratory distress syndrome by the microbubble stability test on gastric aspirates in newborns of less than 32 weeks' gestation. *Acta Paediatr.* 2003 Jun;92(6):728-33.

37. Soll R, Morley C. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;2.
38. Egberts J, Brand R, Walti H, Bevilacqua G, Breart G, Gardini F. Mortality, severe respiratory distress syndrome, and chronic lung disease of the newborn are reduced more after prophylactic than after therapeutic administration of the surfactant Curosurf. *Pediatrics*. 1997 Jul;100(1):E4.
39. Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, et al. A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med*. 1991 Mar 28;324(13):865-71.
40. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate*. 2005;87(4):308-16.
41. Greenwald P. Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol* 1947;53:996-1001.
42. Avery M. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517-23.
43. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*. 1980 Jan 12;1(8159):55-9.
44. Goldsmith J, Karotkin E. Assisted ventilation of the neonate. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
45. Lacaze-Masmonteil T. Exogenous surfactant therapy: newer developments. *Semin Neonatol*. 2003 Dec;8(6):433-40.
46. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol*. 1993 Apr;81(4):619-24.
47. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*. 1999 Jun;13(6):1455-76.
48. Avery G, Fletcher MA, MacDonald MG. Neonatologia. Fisiopatologia e tratamento do RN. . 4 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1999.
49. Zimmermann LJ, Janssen DJ, Tibboel D, Hamvas A, Carnielli VP. Surfactant metabolism in the neonate. *Biol Neonate*. 2005;87(4):296-307.
50. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002 Jun;77(3):217-21.

51. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Takahashi H, Sasaki M. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr*. 1993 Feb;152(2):152-6.
52. Haagsman H. Oxidative damage of the pulmonary surfactant system. *Semin Neonatol*. 1998;3:207-17.
53. Hamvas A, Noguee LM, deMello DE, Cole FS. Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency. *Biol Neonate*. 1995;67 Suppl 1:18-31.
54. Noguee LM. Genetic mechanisms of surfactant deficiency. *Biol Neonate*. 2004;85(4):314-8.
55. Hallman M, Merritt TA, Pohjavuori M, Gluck L. Effect of surfactant substitution on lung effluent phospholipids in respiratory distress syndrome: evaluation of surfactant phospholipid turnover, pool size, and the relationship to severity of respiratory failure. *Pediatr Res*. 1986 Dec;20(12):1228-35.
56. Kopelman B, Santos A, Goulart A, Almeida DFBd, Miyoshi M. *Diagnóstico e tratamento em neonatologia*. São Paulo: Atheneu; 2004.
57. Copetti R, Cattarossi L, Macagno F, Violino M, Furlan R. Lung Ultrasound in Respiratory Distress Syndrome: A Useful Tool for Early Diagnosis. *Neonatology*. 2008 Jan 15;94(1):52-9.
58. Mazela J, Merritt TA, Gadzinowski J, Sinha S. Evolution of pulmonary surfactants for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome and paediatric lung diseases. *Acta Paediatr*. 2006 Sep;95(9):1036-48.
59. Colvero A. *Contagem de corpos lamelares no aspirado gástrico de recém-nascidos a termo e pré-termo*. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.
60. Castagnetti C, Mariella J, Serrazanetti GP, Grandis A, Merlo B, Fabbri M, et al. Evaluation of lung maturity by amniotic fluid analysis in equine neonate. *Theriogenology*. 2007 Jun;67(9):1455-62.
61. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem*. 1989 Apr;35(4):612-6.
62. Neerhof MG, Haney EI, Silver RK, Ashwood ER, Lee IS, Piazze JJ. Lamellar body counts compared with traditional phospholipid analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol*. 2001 Feb;97(2):305-9.

63. Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrell EE, Neerhof MG. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet Gynecol.* 1995 Aug;86(2):235-9.
64. Dubin SB. Assessment of fetal lung maturity. Practice parameter. *Am J Clin Pathol.* 1998 Dec;110(6):723-32.
65. DeRoche ME, Ingardia CJ, Guerette PJ, Wu AH, LaSala CA, Mandavilli SR. The use of lamellar body counts to predict fetal lung maturity in pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Oct;187(4):908-12.
66. Ashwood ER. Standards of laboratory practice: evaluation of fetal lung maturity. National Academy of Clinical Biochemistry. *Clin Chem.* 1997 Jan;43(1):211-4.
67. Neerhof MG, Dohnal JC, Ashwood ER, Lee IS, Anceschi MM. Lamellar body counts: a consensus on protocol. *Obstet Gynecol.* 2001 Feb;97(2):318-20.
68. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* 1990 Feb;75(2):289-92.
69. Lafler D, Mendoza A, Cousin L, Poeltler D. Refrigerated and frozen amniotic fluid for fetal lung maturity testing and lamellar body density counts. *Lab Med.* 1996;27:770-4.
70. Bauman NA, Eby C, Porsche-Sorbet R, Gronowski AM. Lamellar body counts (LBC) are affected by specimen storage conditions. *Clin Chem.* 2004;50:A123.
71. Lewis PS, Lauria MR, Dzieczkowski J, Utter GO, Dombrowski MP. Amniotic fluid lamellar body count: cost-effective screening for fetal lung maturity. *Obstet Gynecol.* 1999 Mar;93(3):387-91.
72. Greenspoon JS, Rosen DJ, Roll K, Dubin SB. Evaluation of lamellar body number density as the initial assessment in a fetal lung maturity test cascade. *J Reprod Med.* 1995 Apr;40(4):260-6.
73. Gantar IS, Babnik J. Surfactant Inhibitors in Amniotic Fluid from Gastric Aspirates in Premature Infants with Respiratory Distress Syndrome *Biol Neonate.* 1999;76(suppl 1):43.
74. Ross GE, Bever FN, Uddin Z, Hockman EM, Herman BA. Decreased laboratory testing for lecithin-to-sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol after fetal lung maturity assessment from lamellar body count in amniotic fluid. *J Am Osteopath Assoc.* 2002 Aug;102(8):423-8.

75. Verder H, Staun-Olsen P, Brandt J, Qin G, Ebbesen F, Robertson B. Prediction of respiratory distress syndrome by lamellar body counts on gastric aspirates in newborn less than 32 weeks gestacion. 18th Int Workshop on Surfactant Replacement; 2003; Prague: Biol Neonate; 2003. p. 105-14.
76. Pieruccini A, Fiori H, Luz J, Colvero M, Santos E, Munhoz T. Lamellar body counts in gastric aspirates of term and preterm newborn infants. Pediatric academic societies annual meeting; 2004; San Francisco, USA; 2004.
77. Ghidini A, Poggi SH, Spong CY, Goodwin KM, Vink J, Pezzullo JC. Role of lamellar body count for the prediction of neonatal respiratory distress syndrome in non-diabetic pregnant women. Arch Gynecol Obstet. 2005 Apr;271(4):325-8.
78. Karcher R, Sykes E, Batton D, Uddin Z, Ross G, Hockman E, et al. Gestational age-specific predicted risk of neonatal respiratory distress syndrome using lamellar body count and surfactant-to-albumin ratio in amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol. 2005 Nov;193(5):1680-4.
79. Hunter LA, McKenna DS, Baptista MA. Comparison of lamellar body counts using light microscopy with standard coulter counter techniques to assess fetal lung maturity. Gynecol Obstet Invest. 2006;61(1):29-33.
80. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. J Perinat Med. 2006;34(1):66-70.
81. Kumazawa K, Hiramatsu Y, Masuyama H, Mizutani Y, Nakata T, Kudo T. Prediction markers for respiratory distress syndrome: evaluation of the stable microbubble test, surfactant protein-A and hepatocyte growth factor levels in amniotic fluid. Acta Med Okayama. 2003 Feb;57(1):25-32.
82. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. Br J Obstet Gynaecol. 1979 Aug;86(8):615-22.
83. Fiori HH, Linderholm B, Fiori RM, Robertson B. Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate for prediction of respiratory distress syndrome. Acta Paediatr. 2001 Dec;90(12):1402-4.
84. Fiori HH, Henn R, Baldisserotto M, Bica IG, Fiori RM. Evaluation of surfactant function at birth determined by the stable microbubble test in term and near term infants with respiratory distress. Eur J Pediatr. 2004 Aug;163(8):443-8.
85. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, Lye MS, Zulfiqar MA. Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal

respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health*. 1997 Aug;33(4):329-34.

86. Chida S, Fujiwara T, Takahashi A, Kanehama S, Kaneko J. Precision and reliability of stable microbubble test as a predictor of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr Jpn*. 1991 Feb;33(1):15-9.

87. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM. Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med*. 2003;31(6):509-14.

88. Chida S, Fujiwara T. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *Eur J Pediatr*. 1993 Feb;152(2):148-51.

89. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, Wiangnon S, Kosuwon W. Prediction of idiopathic respiratory distress syndrome by the stable microbubble test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol*. 1998 Jun;25(6):383-9.

90. Berggren P, Linderholm B, Ebbesen F, Verder H, Eschen C, Robertson B. Evaluation of Lung Maturity in Newborn Babies by Microbubble Stability Test. *Biol Neonate*. 1999;76(suppl 1):44.

91. Pereira MAR. Inter e Intravariabilidade e o efeito do congelamento no teste das microbolhas estáveis realizado na secreção gástrica de recém-nascidos. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.

Capítulo II

5 METODOLOGIA

5.1 Apreciação do Projeto de Pesquisa

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança - PUCRS (Apêndice A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob o registro 07/03967 (Apêndice B).

5.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A coleta de aspirado gástrico é um procedimento de rotina na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da PUCRS em todo RNPT, sendo o material desprezado após o Teste de Microbolhas Estáveis. Desta maneira, a não utilização do termo de consentimento livre e esclarecido foi liberada pelo comitê de ética em pesquisa da PUCRS, pois, segundo Clotet (2000)¹, nos casos em que for utilizado material biológico que restou de outros procedimentos, que seria habitualmente descartado mas

que ainda se encontra em condições de ser utilizado para pesquisa, há a possibilidade de ser utilizado sem obtenção de consentimento informado.

Os pesquisadores se comprometeram a manter sob sigilo a identidade dos indivíduos e das informações. Os resultados obtidos durante o estudo não interferiram no tratamento do paciente.

5.3 Delineamento

Estudo de Coorte Prospectivo

5.4 População e Amostra

Pacientes recém-nascidos com idade gestacional (IG) entre 24 até 34 semanas (34 semanas e 6 dias), nascidos de parto normal ou cesariana, no Hospital São Lucas da PUCRS, no período entre outubro de 2007 a junho de 2008.

A IG ao nascimento foi determinada de acordo com a data da última menstruação e confirmada por ultra-som fetal precoce (antes de 20 semanas), caso nenhum desses dados estivesse disponível ou confiável, foi considerado então o exame do RNPT logo após o nascimento com a escala de New Ballard².

Critérios de exclusão: recém-nascidos que apresentassem pneumonia ou cardiopatia congênitas, síndrome de aspiração de

mecônio, pneumotórax, hérnia diafragmática e/ou síndromes genéticas que levem a algum outro tipo de comprometimento respiratório.

Os 34 RNPT com SDR e os 29 RNPT sem SDR foram acompanhados desde o nascimento até a resolução do quadro de disfunção respiratória.

O diagnóstico de SDR foi feito de acordo com critérios clínicos (taquipnéia, retrações costais e esternal, gemência, cianose em ar ambiente, necessidade de uma FiO_2 maior que 0,4) associados a um padrão radiológico compatível (aspecto retículo-granulado difuso e presença de broncogramas aéreos).

5.5 Procedimentos

5.5.1 Cadastro dos pacientes

Em uma ficha individual (Anexo A), desenvolvida para este estudo, foram anotados os seguintes dados dos participantes da amostra:

- Identificação do paciente (nome, gênero, número do prontuário, telefone de contato);
- Dados do nascimento (data e hora, índice de Apgar no 1º e 5º minutos, peso);

- Idade gestacional (baseada em ecografia obstétrica se realizada antes de 20 semanas, DUM ou New Ballard);
- Tipo de parto (normal ou cesariana) e tempo de bolsa rota (em horas);
- História materna (idade, antecedentes obstétricos, corticóide pré-natal e tempo da administração, uso de medicações, doenças prévias);
- Valor do Teste de Microbolhas Estáveis;
- Valor encontrado na Contagem de Corpos Lamelares (amostra a fresco diluída com SF 0,9% e com DTT, amostra congelada diluída com SF 0,9% e com DTT);
- Desenvolvimento ou não de SDR;
- Uso de surfactante e número de doses;
- Uso de CPAP ou ventilação mecânica (e tempo de permanência, se resposta afirmativa para qualquer uma das alternativas).

5.5.2 Coleta do aspirado gástrico

Como rotina do serviço da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da PUCRS, os recém-nascidos são sondados para aspiração do conteúdo gástrico e este aspirado, que seria desprezado após realização do TME, foi utilizado na pesquisa. Coletou-se o material através de sondas

gástricas números 6 ou 8 adaptadas a seringas BD Plastipak^{†††} de 10 ou 20 ml.

Amostras contendo hematócrito maior que 1% ou contendo mecônio foram descartadas para que não interferissem nos resultados.

5.5.3 Processamento das amostras

A amostra coletada na sala de parto foi submetida ao TME logo após o nascimento do RNPT, num período não superior a 30 minutos, na UTI neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS, conforme a metodologia descrita por Pattle et al³, com pequenas modificações descritas pelo nosso serviço em trabalho anterior⁴. Uma quantidade mínima de 40 µl foi aspirada e expelida rapidamente, cerca de 20 vezes (duração aproximada de 6 segundos) sobre uma câmara de contagem (Neubauer Improved Bright-Line^{§§§}), por meio de uma pipeta de Pasteur^{****}, adaptada a uma pêra de borracha de 2 ml. A câmara era rapidamente invertida, formando uma gota e, após 4 minutos, o número de microbolhas foi contado em um microscópio de luz, utilizando uma objetiva de 10x. Foram contadas somente as microbolhas com diâmetro menor que 15 µm em um 1 mm².

A CCL era realizada a fresco logo após o TME se o pesquisador estivesse presente ou então a amostra permanecia congelada a -20°C por até 72 horas até o processamento, no Laboratório de Hematologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Neste teste a quantidade necessária de

^{†††} BD-Brasil, São Paulo, Brasil.

^{§§§} Loptik Labor, Alemanha.

^{****} Brand GmbH & Co., Wertheim, Alemanha.

aspirado gástrico é de 50 µl a 100 µl. Determinado volume de amostra era colocado em um tubo de ensaio contendo soro fisiológico 0,9% e outro com solução diluída de Dithiothreitol^{††††} (DTT) (1 ml de DTT + 9 ml de água destilada), mantendo sempre a proporção de 1:6 com relação ao diluente. Após diluição, o conteúdo passava pelo agitador de tubos Vortex Ap 56^{‡‡‡‡}, por 10 segundos e finalmente, o material de cada tubo era aspirado pelo contador automático de células Sysmex® x1800i^{§§§§}. O valor obtido como plaqueta considerou-se como o número de corpos lamelares. O conteúdo remanescente da amostra foi congelado a -20°C, por 72 horas, quando então todo processo de CCL foi repetido. O descongelamento ocorreu em temperatura ambiente, até degelo visual.

Todos os valores obtidos foram anotados numa planilha de dados (Anexos B e C).

5.5.3.1 Contador automático de células (Sysmex XT-1800i)

O princípio usado pelo equipamento XT-1800i (figura 1) para contagem de plaquetas é o da resistência elétrica ou impedância + foco hidrodinâmico. O canal deste aparelho analisa hemácias e plaquetas e mede 75 micrômetros. As células sanguíneas são diluídas por um reagente condutor de eletricidade. Como existe uma grande diferença na condutividade elétrica ou resistência entre as células e o reagente

^{††††} Invitrogen, Califórnia, EUA.

^{‡‡‡‡} Phoenix, Araraquara, Brasil.

^{§§§§} Sysmex Corporation, Japão.

diluído, as células podem ser analisadas tanto em quantidade como em tamanho, detectando e medindo esta diferença em resistência.



Figura 1: Aparelho contador hematológico de células Sysmex XT1800i

Depois, essa amostra diluída atravessa uma câmara cônica e passa pelo centro da abertura. Esse princípio é conhecido como foco hidrodinâmico que funciona como fluxo laminar para assegurar que as células atravessem a abertura uma de cada vez. O foco hidrodinâmico elimina erros na contagem de hemácias e plaquetas, tais como coincidência, re-circulação de células e distorção de células associadas com os métodos tradicionais de análise.

Quando uma célula sanguínea passa através da abertura, aumenta a resistência elétrica entre os eletrodos, causando uma alteração de voltagem entre os eletrodos proporcionais à alteração da resistência e ao volume celular que passa através da abertura gerando um pulso celular. Os resultados do tamanho dos pulsos são observados na forma de uma curva de distribuição do tamanho de partículas, que reflete o tamanho das células sanguíneas.

Para determinar quais pulsos representam hemácias e quais representam plaquetas, são utilizados discriminadores flutuantes (variáveis). Os histogramas de hemácias e plaquetas respeitam os seguintes intervalos: hemácias entre 25-250 fL e plaquetas entre 2-30 fL.

5.5.4 Análise dos dados

Para a descrição das variáveis quantitativas e qualitativas obtiveram-se estatísticas descritivas, como a média, desvio padrão, mediana, o mínimo e o máximo.

Para se verificar se existiam diferenças entre os grupos com e sem SDR, utilizou-se o teste t para variáveis quantitativas e o teste da mediana para variáveis qualitativas.

Para verificar se existiam diferenças nas contagens de corpos lamelares, foi procedida a análise de variância (ANOVA) considerando-se um modelo linear misto, com três fatores de classificação (estado, solvente e SDR) e um fator de restrição (sujeitos). Os efeitos de estado (a fresco e congelado), solvente (soro fisiológico e DTT) e SDR (com e sem) foram considerados fixos e os efeitos de sujeito (recém-nascidos) aleatórios.

Para a predição de SDR utilizou-se o modelo de regressão logística com a CCL e o TME como variáveis preditoras. Para verificar a acurácia dos modelos ajustados, estimaram-se, por ponto e intervalo, as áreas sob

a curva ROC. Com base nestas curvas definiu-se o melhor ponto de corte para cada teste.

No caso de associação de testes em série as características de qualidade do teste em conjunto em termos de sensibilidade (s) e especificidade (e) foram obtidas pela fórmula: $s_s = s_{CCL} \times s_{TME}$; $e_s = e_{CCL} + e_{TME} - e_{CCL} \times e_{TME}$.

Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clotet J, Goldim J, Francisconi C. Consentimento informado e sua prática na assistência e pesquisa no Brasil. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2000.
2. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991 Sep;119(3):417-23.
3. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol*. 1979 Aug;86(8):615-22.
4. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate*. 2005;87(2):140-4.

Capítulo III

ARTIGO ORIGINAL**Testes rápidos de maturidade pulmonar no aspirado
gástrico de recém-nascidos prematuros para o diagnóstico
de síndrome do desconforto respiratório****Inah Westphal Batista da Silva Daniel¹⁷****Humberto Holmer Fiori¹⁸****Terezinha Paz Munhoz¹⁹****Ana Cláudia Garcia Vieira²⁰****Renato Machado Fiori²¹**

¹⁷ Mestranda, Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

¹⁸ Professor Adjunto, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

¹⁹ Chefe do Laboratório de Hematologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

²⁰ Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

²¹ Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

RESUMO

Introdução: a terapia de reposição do surfactante tem sido iniciada logo após o nascimento de neonatos com o risco de desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR). Entretanto, muitos prematuros, mesmo os muito imaturos, não necessitarão tratamento com surfactante. Testes rápidos de maturidade pulmonar como a contagem de corpos lamelares (CCL) e teste de microbolhas estáveis (TME) podem auxiliar na detecção de pacientes que se beneficiarão da terapêutica profilática ou muito precoce.

Objetivo: avaliar a acurácia da CCL e do TME, no aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros, para prever a SDR.

Métodos: foram incluídos neste estudo 63 pacientes (34 com SDR e 29 sem SDR), com idade gestacional entre 24 e 34 semanas, nascidos no Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brasil, no período entre outubro de 2007 e junho de 2008. A dificuldade técnica na CCL devido à consistência do aspirado gástrico foi superada pela diluição com dithiothreitol.

Resultados: utilizando-se um ponto de corte de 42.000 corpos lamelares/ μ l para predição do diagnóstico de SDR a CCL mostrou uma sensibilidade de 92% (IC95% 73-100%) e uma especificidade de 86% (IC95%: 77-95%). Para o TME, com um ponto de corte de 14 microbolhas/ mm^2 , obteve-se uma sensibilidade de 94% (IC95%: 77-100%) e uma especificidade de 86% (IC95%: 77-95%). Associando-se os dois testes em série, a sensibilidade e a especificidade foram de 86% e 98%, respectivamente.

Conclusão: a CCL e o TME no aspirado gástrico são testes rápidos e fáceis de serem realizados que poderiam ser usados como preditores de SDR, permitindo a administração profilática seletiva ou auxiliando na decisão de um tratamento muito precoce com surfactante.

Descritores: Microbolhas, Síndrome do desconforto respiratório, Surfactante pulmonar, Recém-Nascido Prematuro.

ABSTRACT

Background: surfactant replacement therapy has been administered after birth to infants who are at high risk for Respiratory Distress Syndrome (RDS). However, several preterm infants, even the most immature, will not need administration of surfactant. Lung maturity tests such as lamellar body counts (LBC) and stable microbubble test (SMT) may help to identify infants that would benefit of surfactant prophylaxis or very early therapy.

Objective: the aim of this research was to evaluate the accuracy of LBC and SMT, performed on gastric aspirates from preterm babies to predict RDS.

Methods: a total of 63 patients were included (34 with RDS and 29 without RDS), with gestational age between 24-34 weeks, born at the Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brazil, from October 2007 through June 2008.

Results: when a cutoff value of 42.000 lamellar body/ μl was used to predict RDS, the LBC showed a sensibility of 92% (95%CI: 73-100%) and a specificity of 86% (95%CI: 77-95%). For the SMT with a cutoff value of 14 microbubble/ mm^2 , the sensibility was 94% (95%CI: 77-100%) and the specificity 86% (95%CI: 77-95%). Using both tests in series the sensibility and specificity changed to 86% and 98%, respectively.

Conclusion: the LBC and SMT in gastric aspirates are fast and easy tests to perform and could be used as predictors of RDS, allowing selective prophylaxis administration or helping in the decision to give very early surfactant therapy.

Key Words: Microbubble, Respiratory distress syndrome, Pulmonary surfactant, Preterm newborn.

INTRODUÇÃO

A Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) é o distúrbio respiratório mais comum em recém-nascidos prematuros¹⁻³. É resultante primariamente da deficiência quantitativa ou qualitativa de surfactante, cuja síntese e liberação estão relacionadas com a maturidade pulmonar que é vital para o estabelecimento da função respiratória ao nascimento^{4,5}. O tratamento consiste em suporte ventilatório, oxigenioterapia, medidas de suporte e reposição de surfactante^{6,7}.

O tratamento profilático com surfactante (em até 30 minutos após o nascimento, antes do surgimento dos sintomas) em recém-nascidos muito imaturos oferece a vantagem de rapidamente estabilizar o *pool* de surfactante e melhorar a mecânica pulmonar, minimizando as possíveis lesões decorrentes do colapso e re-expansão pulmonares e diminuindo a necessidade de concentrações mais elevadas de oxigênio nas primeiras horas de vida⁶. Entretanto, tratar profilaticamente todos os recém-nascidos pré-termo abaixo de uma determinada idade gestacional implica que muitos recém-nascidos com pulmões maduros sejam entubados e recebam uma droga de alto custo não necessária^{8,9}.

O tratamento de resgate evita o excesso de terapia, sendo tratados assim somente aqueles recém-nascidos pré-termo com SDR estabelecida⁸. A desvantagem dessa modalidade é que até a definição de SDR e administração de surfactante poderá ocorrer agravamento da lesão pulmonar. Foi mostrado em modelos animais deficientes de surfactante

que curtos períodos de ventilação mecânica são capazes de produzir lesão pulmonar aguda e diminuir a resposta à terapia com surfactante¹⁰⁻¹³.

Estudos clínicos têm mostrado que o tratamento profilático com surfactante ao nascimento é superior ao tratamento de resgate¹⁴⁻¹⁸. Soll e Morley realizaram uma recente metanálise e concluíram que a administração profilática de surfactante em prematuros menores que 30-32 semanas, comparada com a administração na modalidade de resgate, é associada a uma incidência diminuída de pneumotórax, enfisema intersticial e morte¹⁴. Esses autores concluem também que não está claro o exato critério para julgar quem deverá receber surfactante profilático.

O uso de alguns testes rápidos no líquido amniótico¹⁵⁻¹⁸, no aspirado traqueal^{1, 4, 19, 20} e no aspirado gástrico^{9, 21-23} tem sido sugerido para estimar a maturidade pulmonar de recém-nascidos prematuros e para auxiliar na decisão de administração de surfactante profilático ou muito precoce.

Um dos testes para avaliar a maturidade pulmonar é a contagem de corpos lamelares (CCL). Foi descrita em 1989 por Dubin, no líquido amniótico, utilizando um contador de células²⁴. A similaridade do tamanho do corpo lamelar (1,7 a 7,3 fl) com o tamanho da plaqueta (5 a 7 fl) permite o uso do contador de células hematológicas automatizado para quantificar o número de corpos lamelares. Esse teste é hoje amplamente utilizado em obstetrícia para avaliação da maturidade fetal. Mais recentemente tem-se tentado avaliar a CCL no aspirado gástrico de recém-nascidos^{25, 26}. Com os movimentos respiratórios fetais, corpos lamelares presentes nas vias respiratórias são expelidos para o líquido

amniótico e deglutidos pelo feto, fazendo com que o conteúdo gástrico desses recém-nascidos contenha também corpos lamelares que podem ser contados, permitindo assim estimar a quantidade de surfactante pulmonar produzida^{22, 27}.

Outro teste simples e rápido para avaliação da maturidade pulmonar é o Teste de Microbolhas Estáveis (TME) desenvolvido por Pattle et al em 1979²⁸. Secreções que contêm surfactante são capazes de formar microbolhas estáveis (mbe). O teste é realizado em poucos minutos à beira do leito podendo ser feito em amostras de fluido amniótico, traqueal ou gástrico^{1, 23, 29-32}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a CCL e o TME no aspirado gástrico de recém-nascidos com e sem SDR a fim de detectar se esses testes, isolados ou em série, têm suficiente acurácia para prever a síndrome.

PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo prospectivo foi conduzido na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, de outubro de 2007 a junho de 2008 e teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade.

Pacientes nascidos entre 24-34 semanas de gestação foram incluídos. A idade gestacional ao nascimento foi determinada de acordo com a data da última menstruação e confirmada por ultra-som fetal

precoce (antes de 20 semanas) ou pela aplicação da escala de New Ballard³³. Recém-nascidos que apresentassem pneumonia ou cardiopatia congênita, líquido amniótico meconial, pneumotórax, hérnia diafragmática e/ou síndromes genéticas que levassem a algum comprometimento respiratório foram excluídos. O diagnóstico de SDR foi feito de acordo com critérios clínicos (taquipnéia, retrações costais e esternal, gemência, cianose em ar ambiente, necessidade de uma FiO_2 maior que 0,4) associados a um padrão radiológico compatível (aspecto retículo-granulado difuso e presença de broncogramas aéreos).

A aspiração gástrica, realizada na sala de parto nesses pacientes, era feita com uma sonda de aspiração gástrica curta número 6 ou 8 adaptada a uma seringa de 10 ou 20 ml.

O TME foi feito imediatamente após a coleta, dentro dos primeiros 30 minutos de vida, na UTI neonatal, conforme a metodologia descrita por Pattle et al²⁸ com pequenas modificações descritas pelo nosso serviço em estudo anterior¹.

A CCL foi realizada a fresco logo após o TME e repetida com a amostra congelada a $-20^{\circ}C$ por até 72 horas.

Se o pesquisador não estivesse presente para a CCL a fresco, o teste era somente realizado com amostra congelada. A quantidade de aspirado gástrico utilizada para cada teste era de 50 a 100 μl . A amostra era colocada em um tubo de ensaio contendo soro fisiológico 0,9% e em um outro com solução diluída de Dithiothreitol[®] (Laboratórios Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) - 1 ml de Dithiothreitol[®] (DTT) + 9 ml de água destilada - mantendo sempre a proporção de 1:6 com relação aos

diluentes. A amostra diluída passava pelo agitador de tubos Vortex Ap 56 (Phoenix, Araraquara, Brasil), por 10 segundos e finalmente, o material era aspirado pelo contador automático de células Sysmex XT-1800i, (Sysmex Corporation, Japão). O DTT utilizado foi adquirido no comércio pelos próprios pesquisadores. O número de plaquetas contadas era considerada como o número de corpos lamelares. No aparelho Sysmex as dimensões aceitáveis para plaquetas variam de 2 a 30 fl. O remanescente da amostra não diluída foi congelado a -20°C , por até 72 horas, quando então todo processo de CCL foi repetido. O descongelamento ocorreu em temperatura ambiente, até degelo visual.

Para a descrição das variáveis quantitativas e qualitativas obtiveram-se estatísticas descritivas, como a média, desvio padrão, mediana, o mínimo e o máximo.

Para se verificar se existiam diferenças entre os grupos com e sem SDR, utilizou-se o teste t para variáveis quantitativas e o teste da mediana para variáveis qualitativas.

Para verificar se existiam diferenças nas contagens de corpos lamelares, foi procedida a análise de variância (ANOVA) considerando-se um modelo linear misto, com três fatores de classificação (estado, solvente e SDR) e um fator de restrição (sujeitos). Os efeitos de estado (a fresco e congelado), solvente (soro fisiológico e DTT) e SDR (com e sem) foram considerados fixos e os efeitos de sujeito (recém-nascidos) aleatórios.

Para a predição de SDR utilizou-se o modelo de regressão logística com a CCL e o TME como variáveis preditoras. Para verificar a

acurácia dos modelos ajustados, estimaram-se, por ponto e intervalo, as áreas sob a curva ROC. Com base nestas curvas definiu-se o melhor ponto de corte para cada teste.

No caso de associação de testes em série as características de qualidade do teste em conjunto em termos de sensibilidade (s) e especificidade (e) foram obtidas pela fórmula: $s_s = s_{CCL} \times s_{TME}$; $e_s = e_{CCL} + e_{TME} - e_{CCL} \times e_{TME}$.

Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram coletados aspirados gástricos de 63 pacientes, sendo que 34 tiveram diagnóstico de SDR (17 do sexo masculino) e 29 sem SDR (13 do sexo masculino). As características relevantes ao nascimento estão mostradas na tabela 1. A CCL e o TME foram significativamente menores no grupo com SDR (tabela 2).

Tabela 1: Características dos pacientes ao nascimento

		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i>
Peso (gramas)	Com SDR	1.167	436	1.128	490	2.290	<0,001
	Sem SDR	1.790	458	1.870	780	2.860	
Idade gestacional (semanas)	Com SDR	30	3	30	24	34	<0,001
	Sem SDR	32	2	33	25	34	
Apgar 1 minuto	Com SDR	-	-	7	2	9	0,102
	Sem SDR	-	-	8	0	9	
Apgar 5 minutos	Com SDR	-	-	8	6	9	0,171
	Sem SDR	-	-	9	3	10	

SDR = Síndrome do Desconforto Respiratório
DP = desvio padrão.

Tabela 2: Contagem de corpos lamelares (CCL) e teste de microbolhas estáveis (TME) em aspirados gástricos de pacientes com e sem a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR)

	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	p
CCL-SF-Fresco							
Com SDR	6	22.167	16.216	17.500	7.000	42.000	<0,001
Sem SDR	4	107.500	78.437	101.500	21.000	206.000	
CCL-DTT-Fresco							
Com SDR	12	26.833	17.103	28.000	7.000	56.000	<0,001
Sem SDR	10	103.000	61.389	87.500	14.000	204.000	
CCL-SF-Congelado							
Com SDR	21	20.000	16.459	14.000	0	70.000	<0,001
Sem SDR	11	150.455	153.032	77.000	21.000	455.000	
CCL-DTT-Congelado							
Com SDR	34	26.147	16.102	21.000	0	70.000	<0,001
Sem SDR	29	164.172	145.449	98.000	14.000	490.000	
TME							
Com SDR	34	7	5	7	0	21	<0,001
Sem SDR	29	94	83	50	4	280	

n= número de pacientes

DP= desvio padrão

SF= diluído em Soro Fisiológico 0,9%

DTT= diluído em Dithiothreitol

Para os quatro grupos de combinações de estado (a fresco e congelado) e de diluente (soro fisiológico e DTT), as diferenças das médias da CCL entre os grupos com SDR e sem SDR foram significativas ($p < 0,001$) como se pode observar no gráfico de médias (figura 1). No grupo com SDR, as médias da CCL nas quatro combinações foram muito similares. No grupo sem SDR verificou-se uma diferença significativa apenas no subgrupo congelado diluído em DTT (média significativamente maior) em relação aos outros subgrupos.

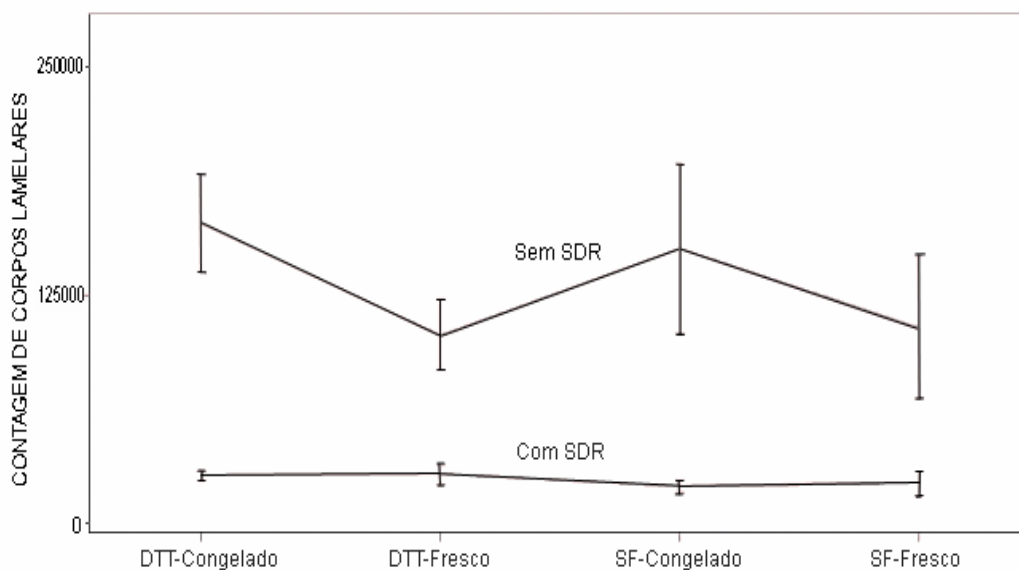


Figura 1: Contagem de corpos lamelares em aspirado gástrico de pacientes com e sem Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR), diluído em solução de Dithiothreitol (DTT) e Soro Fisiológico (SF). Os dados são apresentados como média e erro padrão.

Na figura 2 é mostrada a curva ROC para a contagem de corpos lamelares. Como pode ser observado há uma grande área sob a curva, indicando uma boa acurácia diagnóstica (0,92 – IC95%: 0,85 – 0,99). Utilizando-se um ponto de corte de 42.000 corpos lamelares/ μ l obteve-se sensibilidade de 92% (IC95%: 73-100%) e especificidade de 86% (IC95%: 77-95%).

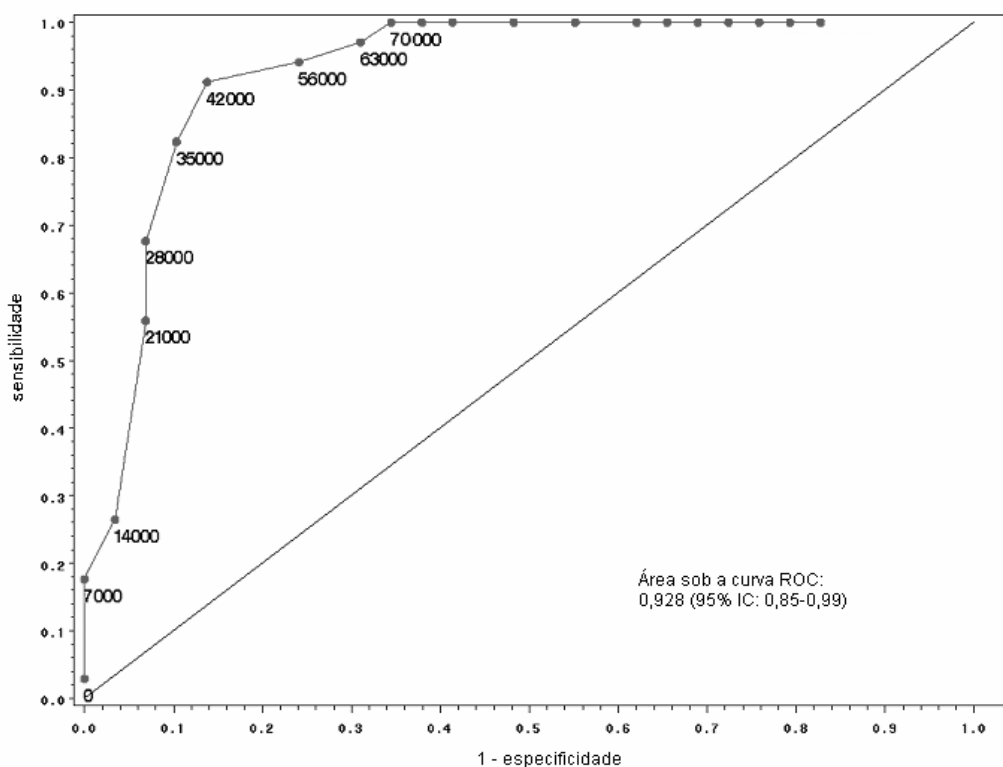


Figura 2: Curva ROC da Contagem de Corpos Lamelares para diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR), considerando diferentes pontos de corte.

Em relação à curva ROC para o TME (figura 3), observou-se também uma grande área sob a curva – 0,89 (IC95%: 0,81 – 0,96) – assim como a CCL, o que sugere também uma boa acurácia diagnóstica. Nesse teste, foi encontrada uma sensibilidade de 94% (IC95% IC: 77-100%) e uma especificidade de 86% (IC95%: 76-95%) com ponto de corte de 14 mbe/mm². Com pontos de corte de 15 e 18 mbe/mm², a sensibilidade do TME foi de 97% e 98%, enquanto que a especificidade foi de 83% e 78% respectivamente.

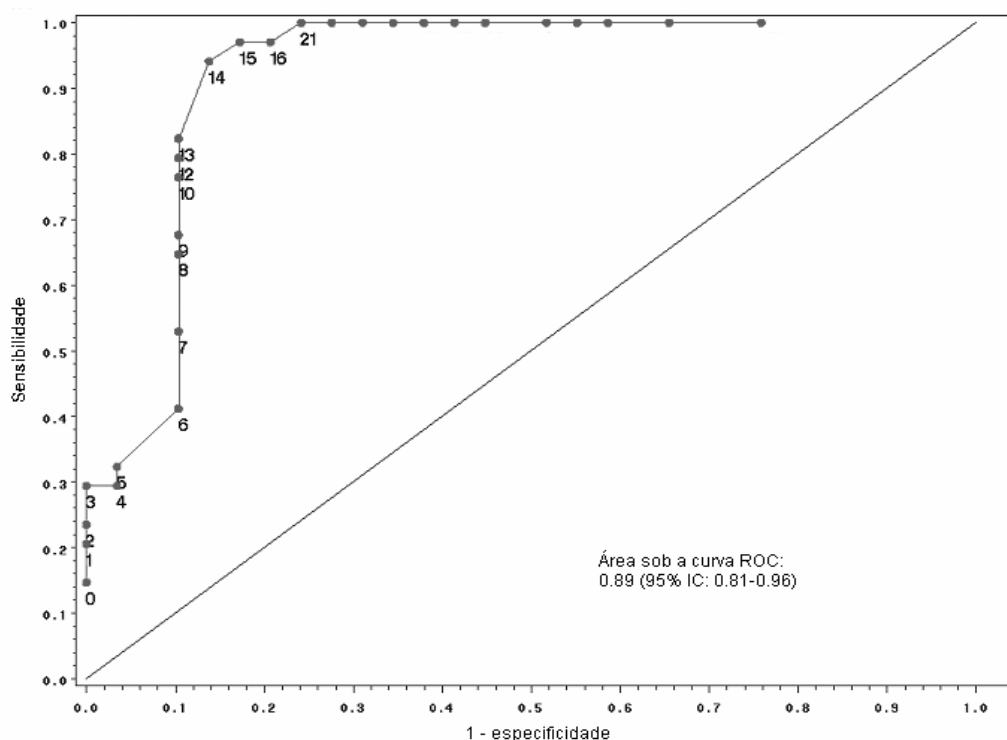


Figura 3: Curva ROC dos testes das microbolhas estáveis (TME) para diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) considerando diferentes pontos de corte.

Na associação dos testes em série, considerando os pontos de corte de 42.000 corpos lamelares/ μl e 14 mbe/ mm^2 , foi observada uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 98%.

DISCUSSÃO

A contagem de corpos lamelares no líquido amniótico, descrita por Dubin para avaliação de maturidade pulmonar fetal, é um teste rápido, de baixo custo e possível de ser realizado com pequeno volume de amostra²⁴. Sua utilidade para determinar a maturidade pulmonar tem sido descrita em vários estudos realizados com líquido amniótico^{18, 25, 34-41}.

O teste de microbolhas estáveis ganhou interesse renovado na era da terapia surfactante e tem-se mostrado como um teste acurado para determinar maturidade pulmonar^{4, 31}.

Tem-se estudado esses testes como preditores de maturidade pulmonar em nosso serviço desde o ano 2000. Entretanto, na CCL tivemos dificuldades técnicas em processar a maioria das amostras O aspirado gástrico é um líquido espesso e não homogêneo, o que torna inviável o processamento através do aparelho contador de células sem centrifugação. Substâncias fluidificantes foram tentadas a fim de diminuir a consistência da amostra, porém alteravam significativamente a contagem. As pesquisas com CCL no aspirado gástrico só puderam ser retomadas mais recentemente após a utilização do DTT, que se mostrou bastante eficaz em fluidificar as amostras sem alterar a CCL. Este diluente já foi mencionado em outras pesquisas, porém sem este mesmo objetivo⁴²⁻⁴⁴. Enquanto isto, os estudos com TME prosseguiram em nossa instituição sem obstáculos, tanto no aspirado gástrico como no traqueal^{1, 9, 23, 29, 31, 45}

Como era de se esperar, o grupo com SDR teve menores médias de peso de nascimento e de idade gestacional, ambas estatisticamente significativas, enquanto que os escores de Apgar com um e cinco minutos não foram diferentes (tabela1).

Como mostrado no gráfico de médias na figura 1, no grupo com SDR as amostras processadas a fresco e congeladas, bem como as diluídas com SF e DTT, foram muito semelhantes, sugerindo que a utilização do DTT e o congelamento por até 72 horas a -20°C não

alteraram a CCL. No grupo sem SDR a única diferença ocorreu entre as amostras congeladas e com DTT em relação às demais. Isso se deve, provavelmente, a grande variabilidade na CCL que ocorre em pulmões maduros, que tem uma contagem muito elevada. Essa variabilidade numa faixa de contagem alta não parece interferir significativamente no uso clínico do teste, uma vez que as diferenças entre contagens de recém-nascidos com pulmões maduros e imaturos é muito grande.

Os subgrupos não tiveram número semelhante de pacientes (tabela 2) devido à impossibilidade de se fazer a CCL nas amostras diluídas com soro fisiológico, que eram frequentemente mais espessas e com grumos e por isto não puderam ser passadas pelo contador de células. Além disso, houve dificuldades em se processar todas as amostras a fresco pela ausência de um dos pesquisadores em alguns partos.

No presente estudo, a CCL mostrou boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de SDR (ambas acima de 85%), sendo o melhor ponto de corte de 42.000 corpos lamelares/ μ l. Com o ponto de corte de 50.000 corpos lamelares/ μ l houve um discreto aumento da sensibilidade para 93%, porém uma redução da especificidade para 81%. Esse ponto de corte na CCL de 42.000 corpos lamelares/ μ l no aspirado gástrico de recém-nascidos se assemelha aos pontos de corte recomendados para determinação da maturidade pulmonar fetal em líquido amniótico^{27, 35, 46}, porém foi muito mais alto que o encontrado em outro estudo⁴⁷. Nesse último, os autores fizeram a CCL em aspirados gástricos que passaram pelo processo de centrifugação. A centrifugação

é uma etapa questionada em diversos trabalhos por poder reduzir a CCL. Dubin²⁴ relatou que a centrifugação durante cinco minutos de amostras de LA a 500 x g poderia diminuir a CCL em 10% a 40%. Roiz-Hernández et al⁴⁸, citando a mesma velocidade e tempo de centrifugação, relatam que até 1/3 dos corpos lamelares podem ser perdidos na sedimentação. Nós testamos a centrifugação em algumas amostras de aspirado gástrico, encontrando também diminuição da CCL em até 50%.

Devido ao uso do diluente DTT conseguiu-se fazer todas as CCL sem centrifugação. Com a diluição em soro fisiológico a 0,9% as amostras mais densas e com grumos não puderam ser analisadas. O DTT, com a finalidade de realizar este teste, é de muito baixo custo, pois centenas de amostras podem ser processadas com um frasco do produto.

O TME no aspirado gástrico apresentou um valor notavelmente mais baixo no grupo com SDR (tabela 2) e se mostrou também acurado para predizer SDR, confirmando resultados anteriores^{9, 23, 29}. O melhor ponto de corte nesse estudo foi de 14mbe/mm².

As vantagens do TME no aspirado gástrico são a facilidade na coleta do aspirado, necessidade de pequeno volume de amostra e não necessidade de diluição ou centrifugação. É um teste simples que pode ser realizado em cinco minutos a beira do leito a um custo muito baixo. A vantagem da CCL em relação ao TME é a de que a contagem é realizada por um equipamento disponível em laboratório hospitalar e que, portanto, não depende da observação visual de um operador.

A associação dos dois testes em série representa um acréscimo significativo na especificidade em relação à realização de cada teste isoladamente.

A CCL e o TME no aspirado gástrico de recém-nascidos são testes equiparáveis para o diagnóstico de imaturidade pulmonar. A escolha entre um e outro teste dependerá da experiência da equipe da unidade com cada um deles. A acurácia, a praticidade e o baixo custo desses testes indicam claramente que podem ter um papel auxiliando o neonatologista na decisão de administrar surfactante profilático de forma seletiva, e não indiscriminada, a recém-nascidos muito imaturos, como também na administração muito precoce a recém-nascidos não tão imaturos, com suspeita de SDR, que iniciam com sintomas após o nascimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM. Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate*. 2005;87(2):140-4.
2. Hermansen CL, Lorah KN. Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician*. 2007 Oct 1;76(7):987-94.
3. Copetti R, Cattarossi L, Macagno F, Violino M, Furlan R. Lung Ultrasound in Respiratory Distress Syndrome: A Useful Tool for Early Diagnosis. *Neonatology*. 2008 Jan 15;94(1):52-9.
4. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, Lye MS, Zulfiqar MA. Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health*. 1997 Aug;33(4):329-34.
5. Clements JA, Avery ME. Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr;157(4 Pt 2):S59-66.

6. Figueras-Aloy J, Quero J, Carbonell-Estrany X, Ginovart G, Perez-Rodriguez J, Raspall F, et al. Early administration of the second dose of surfactant (beractant) in the treatment of severe hyaline membrane disease. *Acta Paediatr.* 2001 Mar;90(3):296-301.
7. Halliday HL. History of surfactant from 1980. *Biol Neonate.* 2005;87(4):317-22.
8. Stevens TP, Sinkin RA. Surfactant replacement therapy. *Chest.* 2007 May;131(5):1577-82.
9. Fiori HH, Linderholm B, Fiori RM, Robertson B. Computerized image analysis of bubbles in gastric aspirate for prediction of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr.* 2001 Dec;90(12):1402-4.
10. Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, John J, Robertson B, Werner O, et al. Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatr Res.* 1997 Sep;42(3):348-55.
11. Ikegami M, Wada K, Emerson GA, Rebello CM, Hernandez RE, Jobe AH. Effects of ventilation style on surfactant metabolism and treatment response in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Feb;157(2):638-44.
12. Jobe AH, Ikegami M. Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev.* 1998 Nov;53(1):81-94.
13. Nilsson R, Grossmann G, Robertson B. Bronchiolar epithelial lesions induced in the premature rabbit neonate by short periods of artificial ventilation. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1980 Nov;88(6):359-67.
14. Soll R, Morley C. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;2.
15. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med.* 1972 May 18;286(20):1077-81.
16. Parkinson CE, Harvey D, Talbert D. Surface properties of amniotic fluid bubbles. *Biol Neonate.* 1974;25(5-6):289-99.
17. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* 1990 Feb;75(2):289-92.
18. Neerhof MG, Haney EI, Silver RK, Ashwood ER, Lee IS, Piazze JJ. Lamellar body counts compared with traditional phospholipid analysis as

an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol.* 2001 Feb;97(2):305-9.

19. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, Wauer RR. The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate.* 1998;73(1):10-8.

20. Colvero A. Contagem de corpos lamelares no aspirado gástrico de recém-nascidos a termo e pré-termo. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.

21. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, Wiangnon S, Kosuwon W. Prediction of idiopathic respiratory distress syndrome by the stable microbubble test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol.* 1998 Jun;25(6):383-9.

22. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Takahashi H, Sasaki M. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr.* 1993 Feb;152(2):152-6.

23. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM. Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at < or =31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *J Perinat Med.* 2006;34(1):66-70.

24. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem.* 1989 Apr;35(4):612-6.

25. Verder H, Staun-Olsen P, Brandt J, Qin G, Ebbesen F, Robertson B. Prediction of respiratory distress syndrome by lamellar body counts on gastric aspirates in newborn less than 32 weeks gestacion. 18th Int Workshop on Surfactant Replacement; 2003; Prague: *Biol Neonate*; 2003. p. 105-14.

26. Pieruccini A, Fiori H, Luz J, Colvero M, Santos E, Munhoz T. Lamellar body counts in gastric aspirates of term and preterm newborn infants. *Pediatric academic societies annual meeting*; 2004; San Francisco, USA; 2004.

27. Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol.* 1993 Apr;81(4):619-24.

28. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol.* 1979 Aug;86(8):615-22.

29. Fiori HH, Varela I, Justo AL, Fiori RM. Stable microbubble test and click test to predict respiratory distress syndrome in preterm infants not requiring ventilation at birth. *J Perinat Med.* 2003;31(6):509-14.
30. Kumazawa K, Hiramatsu Y, Masuyama H, Mizutani Y, Nakata T, Kudo T. Prediction markers for respiratory distress syndrome: evaluation of the stable microbubble test, surfactant protein-A and hepatocyte growth factor levels in amniotic fluid. *Acta Med Okayama.* 2003 Feb;57(1):25-32.
31. Fiori HH, Henn R, Baldisserotto M, Bica IG, Fiori RM. Evaluation of surfactant function at birth determined by the stable microbubble test in term and near term infants with respiratory distress. *Eur J Pediatr.* 2004 Aug;163(8):443-8.
32. Chida S, Fujiwara T. Stable microbubble test for predicting the risk of respiratory distress syndrome: I. Comparisons with other predictors of fetal lung maturity in amniotic fluid. *Eur J Pediatr.* 1993 Feb;152(2):148-51.
33. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991 Sep;119(3):417-23.
34. Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrell EE, Neerhof MG. Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet Gynecol.* 1995 Aug;86(2):235-9.
35. Greenspoon JS, Rosen DJ, Roll K, Dubin SB. Evaluation of lamellar body number density as the initial assessment in a fetal lung maturity test cascade. *J Reprod Med.* 1995 Apr;40(4):260-6.
36. Lewis PS, Lauria MR, Dzieczkowski J, Utter GO, Dombrowski MP. Amniotic fluid lamellar body count: cost-effective screening for fetal lung maturity. *Obstet Gynecol.* 1999 Mar;93(3):387-91.
37. Beinlich A, Fischass C, Kaufmann M, Schlosser R, Dericks-Tan JS. Lamellar body counts in amniotic fluid for prediction of fetal lung maturity. *Arch Gynecol Obstet.* 1999;262(3-4):173-80.
38. Ross GE, Bever FN, Uddin Z, Hockman EM, Herman BA. Decreased laboratory testing for lecithin-to-sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol after fetal lung maturity assessment from lamellar body count in amniotic fluid. *J Am Osteopath Assoc.* 2002 Aug;102(8):423-8.
39. Chapman JF, Ashwood ER, Feld R, Wu AH. Evaluation of two-dimensional cytometric lamellar body counts on the ADVIA 120 hematology system for estimation of fetal lung maturation. *Clin Chim Acta.* 2004 Feb;340(1-2):85-92.

40. Ghidini A, Poggi SH, Spong CY, Goodwin KM, Vink J, Pezzullo JC. Role of lamellar body count for the prediction of neonatal respiratory distress syndrome in non-diabetic pregnant women. *Arch Gynecol Obstet*. 2005 Apr;271(4):325-8.
41. Karcher R, Sykes E, Batton D, Uddin Z, Ross G, Hockman E, et al. Gestational age-specific predicted risk of neonatal respiratory distress syndrome using lamellar body count and surfactant-to-albumin ratio in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Nov;193(5):1680-4.
42. Drews AC. Características citológicas do escarro induzido em crianças com sibilância atópica e não-atópica no Sul do Brasil. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2007.
43. Nakata M, Anno K, Sugino N, Matsumori LT, Nakamura Y, Kato H. Effect of intrauterine ischemia-hypoxia on endothelial nitric oxide synthase in fetal brain in rats. *Biol Neonate*. 2002 Aug;82(2):117-21.
44. Saksela M, Lapatto R, Raivio KO. Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate*. 1998 Oct;74(4):274-80.
45. Pereira MAR. Inter e Intravariabilidade e o efeito do congelamento no teste das microbolhas estáveis realizado na secreção gástrica de recém-nascidos. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.
46. Haymond S, Luzzi VI, Parvin CA, Gronowski AM. A direct comparison between lamellar body counts and fluorescent polarization methods for predicting respiratory distress syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2006 Dec;126(6):894-9.
47. Verder H, Ebbesen F, Linderholm B, Robertson B, Eschen C, Arroe M, et al. Prediction of respiratory distress syndrome by the microbubble stability test on gastric aspirates in newborns of less than 32 weeks' gestation. *Acta Paediatr*. 2003 Jun;92(6):728-33.
48. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002 Jun;77(3):217-21.

Capítulo IV

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que:

- 1) Embora tenha se detectado influência do estado congelado e diluição com DTT no grupo sem SDR, todos os demais subgrupos não tiveram diferença estatisticamente significativa na CCL.
- 2) A CCL e o TME foram significativamente menores no grupo com SDR.
- 3) Baseado nas áreas sob as curvas ROC da CCL e TME, houve aceitável acurácia diagnóstica para ambos os testes na predição da SDR.
- 4) Os melhores pontos de corte para maturidade pulmonar na CCL e no TME foram, respectivamente, 42.000 corpos lamelares/ μl e 14 microbolhas/ mm^2 .
- 5) A associação dos testes em série aumentou a especificidade da CCL e TME para 98%.

Anexos

Anexo A – Ficha de cadastro do paciente**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO**

Nome: RN de _____
 Procedência: _____ Fone: _____
 Sexo: () M () F N°. Prontuário HSL/PUCRS: _____

DADOS DE NASCIMENTO

Data de nascimento: __/__/____ - Hora: __:____
 Idade Gestacional: ____ semanas Apgar 1 ____ / 5 ____
 Peso de nascimento: _____ gramas () PIG () AIG () GIG
 Tipo de parto: () Normal () Cesariana
 Líquido amniótico: () Claro () Meconial

DADOS MATERNOS

Idade: ____ anos Gesta: ____ Para: ____ Aborto: ____
 Pré-natal: () Sim () Não
 Corticóide ante-natal: () Não () Sim; Quantas doses? ____ tempo antes ____
 Problemas de saúde prévios:
 () Hipertensão () Cardiopatia () Diabete () HIV
 () Doença auto-imune () Infecção () Outros; Qual: _____
 Medicamentos atualmente em uso: _____

TME

Valor : _____

CCL

A fresco:
 SF 0,9%: _____ DTT: _____
 Congelado:
 SF 0,9%: _____ DTT: _____

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

SDR: () Não () Sim Detalhe: _____
SURFACTANTE: () Não () Sim; Quantas doses: _____
VENTILAÇÃO MECÂNICA: () Não () Sim; Tempo: _____
CPAP: () Não () Sim; Tempo: _____

Anexo B – Planilha de coleta de dados (pacientes sem SDR)

Nome (RN de)	Peso(g)	IG (sem)	Sexo	CCL_SF	CCL_DTT	CCL_SF_C	CCL_DTT_C	TME	Apgar 1'	Apgar 5'
E.B.	2860	33+6	M	126.000	112.000	105.000	147.000	21	7	9
R.P.	1580	30+3	M	206.000	204.000	206.000	204.000	220	8	9
P.F.M.	1775	34	M	77.000	63.000	77.000	98.000	30	9	9
M.V.F.R. GI	1580	30	F	21.000	14.000	21.000	21.000	4	8	9
M.O.S	1240	31+5	M		161.000		322.000	49	8	9
M.V.F.R. GII	1310	30	F		56.000		56.000	14	7	8
E.C.B.A.	2050	33+3	M		182.000		231.000	150	9	10
M.M.S.	1920	33+3	F		77.000		77.000	35	7	8
M.R.	1870	33+2	F		63.000		63.000	200	8	9
S.D.S.	2350	33+4	F		98.000		98.000	100	2	6
E.P. GI	780	25	F			455.000	483.000	45	3	8
M.J.L.S. GI	1950	34	F			77.000	70.000	72	8	9
M.J.L.S. GII	1495	34	F			434.000	490.000	200	9	10
M.T.C.B. GI	2390	33	M			70.000	63.000	100	8	8
M.T.C.B. GII	1915	33	M			105.000	140.000	160	9	9
P.R.S.	1630	30+6	M			35.000	35.000	250	7	8
L.S.S.	1580	34	M			70.000	56.000	50	8	9
D.L.C.	1190	29+4	F				294.000	200	8	9
D.O.S. GI	1970	34+2	F				413.000	6	5	7
D.O.S. GII	2130	34+2	F				315.000	25	0	3
J.M.M.B.	1300	30+4	F				42.000	50	7	7
V.M.C.	2155	33+4	M				14.000	6	8	9
R.K.K.	1830	32+2	F				91.000	16	8	8
D.C.D.M.	1935	32	F				441.000	280	8	9
I.S.N.	2085	34+3	M				91.000	150	9	9
R.M.S.	1070	27	M				56.000	15	8	9
L.F.S.	2050	34	M				133.000	80	8	9
K.P.A.	2450	34	F				84.000	150	8	8
A.C. GI	1450	32+3	F				133.000	42	7	8

Anexo C - Planilha de coleta de dados (pacientes com SDR)

Nome (RN de)	Peso(g)	IG (sem±d)	Sexo	CCL_SF	CCL_DTT	CCL_SF_C	CCL_DTT_C	TME	Apgar 1´	Apgar 5´
A.C.F.D. GI	1680	34	M	42.000	56.000	42.000	63.000	9	9	9
R.B.A.Z.	1880	31+4	M	14.000	14.000	14.000	14.000	6	8	8
M.T.G.S.	520	24+5	M	7.000	7.000	7.000	35.000	0	7	7
J.S.G	880	27+2	F	7.000	7.000	7.000	7.000	8	8	9
A.C.F.D. GII	1910	34	F		14.000	7.000	21.000	10	9	9
L.H.S.	2290	33+5	M	42.000	35.000	35.000	35.000	12	9	9
D.C.I.	805	28	M	21.000	28.000		35.000	6	3	8
D.C.M	975	29	F		42000		42.000	0	7	9
S.C.	845	28	F		49.000		35.000	13	6	8
J.A.S. GII	1490	30	F		7.000		7.000	5	3	8
J.A.O.	1230	28	M		35.000		35.000	14	7	8
M.L.C.	490	24+6	F		28.000		28.000	3	8	9
A.C. GII	1505	32	F			14.000	21.000	0	5	8
C.S.S.S.	1435	30	M			7.000	7.000	3	4	8
C.V.M.	1235	31+4	F			21.000	28.000	6	6	6
C.F.G.	1315	29	M			0	7.000	1	8	9
K.R.M. GI	1155	28	M			7.000	14.000	7	9	9
K.R.M. GII	955	28	F			14.000	14.000	7	9	9
E.P. GII	735	25	F			70.000	70.000	15	7	8
K.A.R. GII	1135	30+6	F			14.000	21.000	14	8	8
L.G.C.G.	1650	30	F			0	0	7	8	9
M.T.R.	1505	31+5	M			28.000	28.000	14	7	9
P.C.S.	700	28	M			28.000	28.000	8	6	7
T.V.F.	735	28	F			35.000	42.000	21	2	7
C.S.R. GI	675	26	F			28.000	21.000	7	6	8
C.L.B.S.	1840	33	F			21.000	21.000	8	8	9
S.M.M. GI	1035	27	M			21.000	21.000	1	6	8
S.M.M. GII	880	27	M				7.000	8	6	7
C.G.S.	1075	31	M				21.000	10	8	9
K.S.S.	1120	30	F				21.000	0	6	8
S.R.S.S.	1210	30	M				42.000	10	8	9
V.C.A.	1140	30+3	M				21.000	2	6	7
F.V.S.	600	24	M				21.000	0	2	6
K.A.R. GI	1035	30+6	F				56.000	14	8	8

Apêndices

Apêndice A – Carta de aprovação pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança – PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

Porto Alegre, 09 de outubro de 2007

Á
Pós-Graduanda
Inah Westphal Batista da Silva Daniel
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda

Comunicamos que a proposta de dissertação intitulada "**AVALIAÇÃO DOS TESTES DE MATURIDADE PULMONAR NO ASPIRADO GÁSTRICO DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS COM SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO**" foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança.

Informamos que a mesma deve ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do CIDAPE, 2º andar do HSL.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Renato Machado Fiori
Coord. PPG em Medicina/Pediatria e
Saúde da Criança – PUCRS

C/c Prof. Humberto Fiori - orientador



Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 5º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone/Fax: (51) 33396474
E-mail: pediatria-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

Apêndice B – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 023/08-CEP

Porto Alegre, 03 de janeiro de 2008.

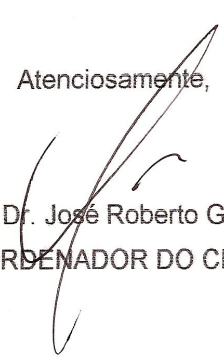
Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo registro CEP 07/03967, intitulado: **“Avaliação dos testes de maturidade pulmonar no aspirado gástrico de recém-nascidos prematuros com síndrome do desconforto respiratório”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Humberto Holmer Fiori
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep