

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PNEUMOLOGIA E CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Título:

**LINHAS-B DETECTADAS POR ULTRASSONOGRAFIA PULMONAR COMO
UM SINAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE INFUSÃO DE ÁCIDO OLEICO EM RATOS.**

Mestranda:

ROSA ELISA BERNARDO SIMBINE

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PNEUMOLOGIA E CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS

Linhas-B detectadas por ultrassonografia pulmonar como um sinal de lesão pulmonar aguda em um modelo experimental de infusão de ácido oleico em ratos.

Mestranda: Rosa Elisa Bernardo Simbine

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Rodrigues Torres

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas,
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
como um requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.*

PORTO ALEGRE

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Simbine, Rosa Elisa Bernardo
Linhas-B detectadas por ultrassonografia pulmonar como um sinal de lesão pulmonar aguda em um modelo experimental de infusão de ácido oleico em ratos. / Rosa Elisa Bernardo Simbine. -- 2020.
110 f.
Orientador: Marco Antonio Rodrigues Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ultrassonografia Pulmonar. 2. Síndrome do Desconforto Respiratório Do Adulto. 3. Histopatologia Pulmonar. 4. Ácido Oleico. 5. Experimentação em Ratos de Laboratórios . I. Torres, Marco Antonio Rodrigues, orient. II. Título.

Sumário

Sumário

Sumário	4
Dedicatória	7
Agradecimentos	9
Resumo	11
Abstract	13
Abreviaturas e símbolos	15
Tabelas	17
Figuras	19
Embasamento Teórico	21
1. Introdução	23
2. Ultrassonografia Pulmonar	25
2.1. Linhas-B/cometas na USP	28
2.2. Linhas-B na ultrassonografia pulmonar: obtenção e leitura.	31
2.3. Linhas-B e edema pulmonar	34
2.4. Síndrome do desconforto respiratório agudo	36
2.5. Indução experimental de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	39
2.6. Segurança da Ultrassonografia Pulmonar	43
3. Alterações morfológicas induzidas pelo ácido oléico	46
4. Treinamento e controle de qualidade para as USP e para os experimentos	54
5. Justificativa	56
6. Objectivos	58
6.1. Geral	58
6.2. Específicos	58
7. Análise Estatística	60
8. Conclusões	62
9. Referências	64
10. ARTIGO	75
10.1. Resumo	75
10.2. Abstract	76
10.3. Introdução	77
10.4. Material e Métodos	78
10.4.1. Animais do projeto experimental	78
10.4.2. Tamanho da amostra	79
10.4.3. Comitê de Ética	79
10.4.4. Preparação dos animais e anestesia	79
10.5. Cirurgia	80
10.6. Fármacos usados para a indução de lesão pulmonar aguda	84
10.7. Ultrassonografia pulmonar	85
10.8. Patologia	89
10.9. Análise estatística	90
10.10. Resultados	91
10.10.1. Efeitos Hemodinâmicos	91

10.10.2. Mortalidade	91
10.10.3. Análise das gasometrias arteriais	92
10.10.4. Achados da Ultrassonografia Pulmonar	92
10.10.5. Avaliação histopatológica	94
10.11. Discussão	96
10.12. Conclusões	102
10.13. Considerações finais	103
10.14. Referências	104

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Ananias Simbine e Maria da Graça, os quais sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e decisões.

Ao meu noivo Wilson de Sousa, por todo apoio e incentivo dado nesta caminhada, e pelo lindo presente que deu-me, a minha futura pequena. Obrigada por me inspirarem todos os dias a ser a minha melhor versão.

Aos meus irmãos, amigos, em particular a Helena e Lídia por estarem sempre do meu lado em todos os momentos.

A todos, meu muito obrigada. Amo vocês!

Agradecimientos

Ao meu orientador, Professor Marco Antonio Rodrigues Torres, pelo apoio em todos os momentos desde o ingresso ao PPG, pela paciência, dedicação, carinho. Palavras são insuficientes para expressar minha admiração e gratidão. Muito obrigada Professor.

Aos Professores Cristiano Feijó Andrade e Rogério Gastal Xavier pelo apoio na elaboração do projeto e no experimento.

Aos Coordenadores do PPG Ciências Pneumológicas durante meu curso Professora Denise Rossato Silva e Prof. Paulo Dalcin da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Aos colegas do grupo do VAP porque sem eles este projeto não teria se realizado, em especial à Natália Morais de Quevedo que participou dos experimentos animais e à Clarissa Carmona de Azevedo Bellagamba pela participação no manuscrito e material iconográfico.

A todos da Unidade de experimentação animal/Centro de pesquisa experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela ajuda, constante apoio e acolhimento, e em especial à Enfermeira Marta Cioatto e às Veterinárias Daniela Camagnol e Tuane Nerissa Alves.

À Profa. Jane Maria Ulbrich pelos preciosos ensinamentos e inestimável competência e presteza na avaliação das amostras histopatológicas pulmonares do presente estudo.

À Bioquímica Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado responsável pela execução de todas as gasometrias arteriais, pela sua competência e acolhimento.

Aos Professores do PPG de Pneumologia e Ciências Pneumológicas da FAMED da UFRGS com quem muito aprendi e de quem sempre levarei uma bela lembrança.

Aos queridos colegas do PPG de Pneumologia e Ciências Pneumológicas da FAMED da UFRGS com quem dividi meus anseios e tanto me desenvolvi com seus exemplos.

Aos eficientes Secretários do PPG de Pneumologia e Ciências Pneumológicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da UFRGS, Marco Aurélio da Silva e Jorgelei Ostroski que muito me ajudaram nas questões do regimento do PPG e foram de convívio estimulante

Resumo

RESUMO

Linhas-B detectadas por ultrassonografia pulmonar como um sinal de lesão pulmonar aguda em um modelo experimental de infusão de ácido oleico em ratos.

Embasamento. Linhas-B detectadas por ultrassom pulmonar (USP) é sinal de síndrome intersticial aguda do edema pulmonar cardiogênico, pneumonia COVID-19 e síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA).

Objetivo. Avaliar a USP, a gasometria arterial e histopatologia pulmonar em um modelo experimental agudo de SDRA em ratos por ácido oleico (AO).

Métodos. USP foi empregado em 57 ratos de laboratório Wistar (398.1 ± 54.7 g, 71 ± 7 dias, machos) sob ventilação contínua igualmente distribuídos em três grupos diferentes: 1- controle, infusão salina (S), 2- AO (33,33%), e 3- AO diluído em albumina bovina (AO-a) (33,33%). Varreduras com USP e transdutor linear de 7,5-MHz em ambos os hemitóraces permitiram a contagem de linhas-B (0= pulmão negro com linhas-A na horizontal a 10= pulmão branco com linhas-B coalescentes) em 2 locais pré-definidos aos 0, 15, 30 e 60' sincronizados com gasometria arterial e análise morfológica abrangedora com hematoxilina-eosina (HE) em todos os ratos no sacrifício e a magnitude da lesão foi estimada.

Resultados. O número de linhas-B aumentou significativamente em AO (8.7 ± 3.2 , 12.5 ± 2.8 , 15.1 ± 3.6) e AO-a (8.6 ± 3.4 , 13.1 ± 4.3 , 14.76 ± 4.2), mas não em S (1.2 ± 1.5 , 1.5 ± 1.5 , 1.8 ± 1.5 , $p < 0.001$) aos 0, 15, 30 e 60 minutos. PO₂ foi constante no grupo S e diminuiu nos grupos AO. Edema alveolar e necrose foram diferentes em AO e AOa x S ($p < 0.05$, Pearson χ^2 teste).

Conclusões. Avaliação da presença e número de linhas-B com USP permite detecção de SDRA por AO em ratos, com avaliação não invasiva precoce e quantitativa de lesão. Comprometimento proeminente com achados histopatológicos semelhantes à SDRA nos grupos AO e AO-a no sacrifício dos ratos foi demonstrada.

Abstract

ABSTRACT

B-Lines with lung ultrasound for detection of pulmonary acute injury in an experimental model of oleic acid infusion in rats.

Background. B-profile detected by lung ultrasound (LUS) is a sign of acute interstitial syndrome found in cardiogenic pulmonary edema, COVID-19 pneumonia and acute respiratory distress syndrome (ARDS).

Aim. To assess LUS and morphological correlates in a rat experimental model of ARDS induced by oleic acid (OA).

Methods. We used LUS in 57 anesthetized Wistar lab rats (398.1 ± 54.7 g, 71 ± 7 days, all males) under continuous ventilation equally distributed in three different groups: 1- control, saline infusion (S), 2- OA (33.33%), and 3- OA diluted in bovine albumin (OA-a) (33.33%). LUS scanning with a 7-MHz linear probe at both sides of thorax allowed counting of B-lines (from 0= black lung with horizontal A-lines to 10 = white lung with coalescing B-lines) in 2 predefined scanning sites at 0, 15, 30 and 60' synchronized with arterial blood gas analysis along with comprehensive morphologic analysis (HE) in all animals at end, and severity of the lesion was estimated to quantify abnormalities in histopathology.

Results. The number of B-lines increased significantly in OA (8.7 ± 3.2 , 12.5 ± 2.8 , 15.1 ± 3.6) and OA-a (8.6 ± 3.4 , 13.1 ± 4.3 , 14.76 ± 4.2), but not in S (1.2 ± 1.5 , 1.5 ± 1.5 , 1.8 ± 1.5 , $p < 0.001$) at 15, 30, and 60 minutes. PO₂ was constant in the S group and decreased in OA groups. Alveolar edema and necrosis were different in OA and OAa x S ($p < 0.05$, Pearson χ^2 test).

Conclusions. LUS assessment of B-lines presence and number allows detection of OA-induced ARDS in rats, providing a non-invasive, precocious and quantitative assessment of acute lung injury. Prominent compromise with findings of histopathology similar to those of ARDS in OA and OA-a groups at sacrifice was demonstrated.

Abreviaturas e símbolos

AO – Ácido oleico
BNP - peptídeo natriurético atrial (em inglês *brain natriuretic peptide*)
CPE – Centro de pesquisa experimental
FAMED – Faculdade de Medicina
FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio
FE – Fração de ejeção
FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA
FR – Frequência Respiratória
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IV – intravenoso
ivpm – incursões ventilatórias por minuto
Kg – quilograma
LPS – Lipopolissacarídeo
mg – miligramas
mL – mililitros
mmHg – milímetros de mercúrio
PAS – Pressão arterial sistólica
PAm – Pressão arterial média
PaCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial
PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaO₂/FiO₂ – Pressão parcial de oxigênio arterial/fração inspirada
RX tórax – Radiografia de tórax
SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
TC – Tomografia computadorizada
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USP – Ultrassonografia pulmonar
VE – Ventrículo esquerdo
VAP – Laboratório das vias aéreas e (circulação) dos pulmões

Tabelas

Tabela I: Idade e peso e sexo para cada grupo.

Tabela II: Procedimentos feitos em relação ao tempo de experimento.

Tabela III: Parâmetros basais e ao final (antes da eutanásia).

Tabela IV: Achados histopatológicos em cada grupo.

Figuras

Figuras 1 e 2: Alterações morfológicas identificadas na análise histopatológica - edema.

Figuras 3 e 4: Alterações morfológicas identificadas na análise histopatológica – congestão.

Figura 5: Alterações morfológicas identificadas na análise histopatológica – focos de hemorragia intra-alveolar.

Figuras 6 e 7: Alterações morfológicas identificadas na análise histopatológica – focos de necrose isquêmica.

Figuras do artigo

Figura 1: Preparo do rato com tricotomia para a cirurgia após sua anestesia.

Figura 2: Preparo do material necessário para a cirurgia.

Figura 3: Intubação da traqueia após dissecação.

Figura 4: Ventilador Harvard para ratos utilizado nos experimentos.

Figura 5: Monitorização contínua da pressão arterial.

Figura 6: Linha do tempo.

Figura 7: Ecocardiógrafo utilizado para obtenção das imagens.

Figura 8: Posicionamento do transdutor no tórax do rato.

Figura 9: Linhas-A (esquerda) pulmão “seco” normal e Linhas-B (direita) pulmão “úmido” congesto.

Figura 10: Na tela do ecocardiógrafo: Linhas-B do pulmão após AO.

Figura 11: No vídeo visualizam-se Linhas-B do pulmão após AO

Figura 12: Blocos de pulmões para fixação e análise.

Figura 13: Soma das Linhas-B em ambos os pulmões em função do tempo nos grupos controle (S), ácido oleico puro e ácido oleico-albumina bovina (Pearson χ^2 teste, (P< 0,001).

Figura 14: Porcentagem de edema alveolar, necrose e congestão severa entre os grupos (teste χ^2 de Pearson, p <0,001).

Figura 15: Achados de microfotografias representativos de alterações histológicas (HE) na lesão pulmonar (T60). Na sequência acima, a partir da foto superior à esquerda no sentido horário: edema e congestão, congestão, edema e hemorragia, necrose, embolia arteriolar e necrose e congestão. Todos estes padrões ocorreram indistintamente em ambos os pulmões.

Embasamento Teórico

1

1 Introdução

Introdução

A ultrassonografia pulmonar (USP) foi proposta em 1997 (1) como ferramenta diagnóstica do edema pulmonar. Através da identificação das Linhas-B estabeleceu-se como um sinal da lesão pulmonar aguda (LPA), a síndrome intersticial aguda presente no edema pulmonar cardiogênico e ausente na doença pulmonar obstrutiva crônica. Ambas apresentam-se com quadros semelhantes de dispneia e o diagnóstico diferencial às vezes é impossível quando apoiado apenas em dados semiológicos e na radiografia do tórax (RX tórax).

Mais de duas décadas depois, a imagem ecográfica das linhas-B é vista nas pneumonias e (inclusive a pneumonia causada pelo COVID-19), estando relatadas na insuficiência cardíaca (IC), na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e na fibrose pulmonar.

Desde os primórdios da ecocardiografia foi salientado que o ar presente nos pulmões interfere na obtenção das imagens. Tal barreira acústica de alta impedância sempre foi considerado o maior obstáculo para obtenção de imagens pulmonares na USP (2).

2

2 Ultrasonografia Pulmonar

■ Ultrassonografia Pulmonar

Até recentemente o pulmão não estava ao alcance dos exames de ultrassom. Constava na 18a. edição do livro-texto *Harrison's Principles of Internal Medicine*:

... because ultrasound energy is rapidly dissipated in air, ultrasound imaging is not useful for evaluation of the pulmonary parenchyma. *Longo D, Fauci AS, Kasper DL, Hauser S, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2011. Part 11, Section 1, Chapter 253 (3)*

Mas não é mais aceito como uma verdade.

Picano em editorial do *European Journal of Heart Failure* em 2012 escreveu (4):

... lung ultrasound can offer surprising clinical dividends in several challenging conditions, from pulmonary oedema to interstitial lung fibrosis, from acute respiratory distress syndrome (ARDS) to pleural effusion and pulmonary embolism. (5)

A publicação de Lichtenstein abriu um espetacular horizonte, permitindo aos cardiologistas obter imagens diretas e de uma maneira semi-quantitativa estimar a magnitude do edema pulmonar (6). Não apenas dos cardiologistas, também aos intensivistas, emergencistas, nefrologistas, reumatologistas, pediatras, especialistas em medicina do esporte (4).

No artigo original, e a seguir em vários outros, este sinal foi confirmado em quadros crônicos e agudos de edema pulmonar (7) e foi descrito como:

... cometas de ultrassom pulmonar consistem em múltiplas caudas de cometas originadas dos septos interlobulares espessados por água e se espalhando a partir da superfície pulmonar (8).

Diversos autores salientaram sucessivamente a aplicabilidade e a exequibilidade preponderante do método da USP, devido ao alto custo-benefício, não ser um exame à base

de radiações ionizantes, facilidade e velocidade de obtenção em qualquer lugar e por qualquer um da equipe assistencial em comparação com o método radiológico, caracterizando-o no seu papel fundamental no diagnóstico do edema pulmonar (6).

Ainda há espaço para uma translação deste sinal do laboratório de ecocardiografia para a beira do leito e destes para o laboratório de experimentação animal e vice-versa.

A SDRA pode ser reproduzida experimentalmente em animais de bancada de várias maneiras como é o caso da administração do ácido oleico (AO). Os animais apresentaram insuficiência respiratória com dispnéia/taquipneia, hipoxemia aguda e lesão alveolar secundária à resposta inflamatória pulmonar (9) com seu padrão morfológico de lesão alveolar, congestão microvascular, injúria microvascular, infiltrado de células inflamatórias, edema pulmonar e necrose com uma relação dose-dependente demonstrada em ratos servindo como uma ferramenta importante para se estudar a fisiopatologia da SDRA induzida por AO (10).

O padrão morfológico, e multi-etiológico de agressão da membrana alvéolo-capilar, a permeabilidade aumentada, variável em gravidade, em extensão de comprometimento do parênquima pulmonar, repete-se em todas as etiologias da SDRA e seu edema inflamatório leva *in extremis* ao colapso heterogêneo dos alvéolos e às graves alterações da troca gasosa com desfechos fatais, caso não se ofereçam os adequados meios de suporte ventilatório (11).

2.1

3 Linhas-B/cometas na USP

Linhas-B/cometas na USP

Linhas-B "ou cometas" na ultrassonografia pulmonar: aspecto, significado, ocorrência, comparação com outras imagens.

Do padrão da uma sequência de linhas horizontais chamadas linhas-A (Figura 9 do artigo, esquerda), visto no pulmão normal, passamos para o padrão de linhas-B, e uma apresentação totalmente diferente, assemelhando-se a "cometas", gerados devido à presença de congestão e edema intersticial pulmonar, em que o espessamento dos septos interlobulares com a presença de ambos ar e água cria uma impressão peculiar. As linhas-B (Figura 9 do artigo, direita) são, portanto, um sinal ecográfico à USP de aumento da água extravascular pulmonar (12), de edema intersticial.

As linhas-B são verticais e têm aspecto de um artefato reverberacional na superfície das estruturas pulmonares, originada na mudança volumétrica na relação entre o ar e o fluido presente nos tecidos (13), semelhantes a um laser com origem na linha da pleura e que se mantém até o extremo oposto, da parte mais superior à base da imagem na tela do ecógrafo, sem perder sua luminosidade e acompanhando a movimentação pleuropulmonar (5).

A identificação de água extravascular pulmonar é uma peça chave, pois é fundamental a imaginologia no diagnóstico da congestão pulmonar da IC aguda (14) ou crônica (15), no manejo da IC e para o seu prognóstico (16).

Principalmente nos estágios iniciais a semiologia torácica e cardiovascular, bem como sua monitorização no paciente com congestão pulmonar por IC, são enorme desafio devido à sua falta de acurácia (15).

O RX tórax foi o primeiro método de imagem sendo tradicionalmente usado para avaliar o edema pulmonar, mas sabe-se que possui limitações e quando foi comparado à USP (17) — não somente quanto à identificação de edema pulmonar, mas também no diagnóstico de condensações pneumônicas — revelou-se menos adequado (18). Inclusive quando a USP foi comparada à tomografia computadorizada (TC) pulmonar ela se evidenciou muito útil (19).

A USP foi superior devido à comprovada relação linear entre o número de linhas-B e a quantidade de edema (20) e também por causa da sua praticidade e ampla disponibilidade.

À importância crescente da USP soma-se a possibilidade de elevação da pressão capilar pulmonar na ausência de achados diagnósticos no RX de tórax (14), (21), (7), (22).

Como o padrão ouro para avaliar-se a congestão é a medição direta da pressão do átrio esquerdo e a pressão capilar pulmonar por cateterismo cardíaco (CAT) direito, e o CAT é um exame invasivo, este método é mais limitado para isto (23), destacando a importância adicional do estudo de métodos confiáveis que contribuam na avaliação do edema pulmonar.

Já há recomendações referentes ao uso da USP na avaliação do edema pulmonar da IC. Em 2010, a *European Society of Cardiology (ESC)* considerou-a como “*método com potencial de utilidade para avaliar a congestão pulmonar*” (14) e em 2015 recomendou como um dos exames para avaliar congestão pulmonar em pacientes com IC aguda (24) tendo na última diretriz da ESC uma recomendação de grau II e nível de evidência "a" (25).

A presença de edema pulmonar está também frequentemente presente em muitas condições clínicas da SDRA, como na sepse do adulto (26), do recém nascido (27), trauma pulmonar por impacto direto ou indireto (28), pneumonias em geral (29), e inclusive as do COVID-19 (30), doença renal crônica em regime dialítico por hemodiálise (31) ou não (32), e o elo comum que une todas estas condições, o denominador clínico, sendo sempre a SDRA, e daí a USP ter se firmado como importante exame de imagem pulmonar (33) nesta síndrome.

2.2

4 Linhas-B: obtenção e leitura

Linhas-B na ultrassonografia pulmonar: obtenção e leitura.

A obtenção das imagens da USP pode ser feita com qualquer aparelho de ecografia, ou de ecocardiografia, não é sequer necessário o modo Doppler a cores ou espectral que não são usados para obtenção das imagens pulmonares. Usam-se os mesmos transdutores setoriais usados na ecocardiografia, transdutores convexos muito utilizados nas imagens abdominais e também nas obstétricas em todos os trimestres da gestação e os transdutores lineares muito utilizados nas imagens vasculares periféricas, com todas as frequências em mHz existentes, sendo que quanto maior a frequência melhor a visualização das estruturas mais próximas do mesmo e maior a resolução. Atualmente os transdutores podem também ser focados ou não e os aparelhos podem dispor de harmônicas (segunda harmônica) o que não influi na qualidade das linhas-B. Logo, todos estes transdutores e aparelhos com diferenciações diferentes permitem-nos obter imagens de USP de boa qualidade e também reproduzíveis.

Quanto à obtenção das imagens é desnecessário ser especialista. Bastam 2 horas de treinamento (34) à habilitação das linhas-B, o que pode ser feito por qualquer profissional da equipe assistencial (35), (36), (37), com aparelhos menores do que um *tablet* (38).

Em busca de alternativas promissoras a USP tem se destacado como um exame complementar para avaliação da congestão pulmonar em inúmeros cenários à beira do leito e nos ambulatórios, nas internações eletivas e nas unidades de Emergência e de Terapia Intensiva (UTI), e nas de Recuperação pós-operatória. Também tem sido utilizada no contexto de experimentação com animais de laboratório (39), embora em um grau menor do que na área clínica, no caminho inverso em que a comprovação da valia de muitos métodos geralmente começa nas bancadas para a seguir migrarem para uso à beira do leito (40).

O treinamento para a leitura das imagens este é comprovadamente de pequeno grau de dificuldade e em pouco tempo um profissional pode qualificar-se e ser um bom leitor de linhas-A e linhas-B para o diagnóstico de congestão pulmonar (41), e inclusive além destas imagens (42,43). Estudos têm sido publicados salientando-se que os controles de qualidade baseados na internet proveram harmonização dos critérios de leitura das linhas-B (34).

Em estudo conduzido em grupos de médicos residentes de várias especialidades que executam rotineiramente exames de USP a conformidade das suas leituras para o diagnóstico da presença ou ausência das linhas-B foi adequada, mas revelou-se necessário um treinamento e controle de qualidade adicional para leitura dos números intermediários das

linhas-B. Isto destaca que sua limitação não está na execução mas na capacitação continuada das habilidades dos operadores, necessárias para nivelamento dos seus laudos (44).

Este problema pode ser, todavia, controlado com a popularização adicional do *instituto* de um segundo leitor, com o advento do amplo uso de *softwares* gratuitos de comunicação pelos *smartphones* (45).

2.3

5 Linhas-B e edema pulmonar

Linhas-B e edema pulmonar

No caso do edema pulmonar da IC de qualquer etiologia, médicos construíram critérios diagnósticos reunindo sinais e sintomas clínicos. Surgiram, critérios de Framingham (46), Boston (47) (este agregou achados do RX de tórax), e de Minnesota (48) (que agregou adicionalmente o achado da fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE) para avaliar-se o poder desta em diferenciar usando-se a mortalidade ajustada para o sexo e a idade na predição mortalidade em 2 anos).

A limitação de todos estes critérios se considerados isoladamente foi estudada em relação ao de Framingham. A crítica é quanto à sua baixa eficácia com sua pequena especificidade, sensível para diagnóstico de IC (97%) e só moderadamente específico (79%) (49).

Um complicador adicional é o diagnóstico de condições clínicas específicas de congestão pulmonar como a IC com fração de ejeção preservada, que mereceu uma publicação recente da *European Society of Cardiology* (50) em que a dificuldade diagnóstica exige a realização adicional de outros exames, como a dosagem do peptídeo natriurético atrial (BNP) e do seu pró-peptídeo (pró-BNP) e de ecocardiografia de exercício e no extremo há a necessidade de confirmação por cateterismo cardíaco direito com aferição das pressões pulmonares.

A quantidade de água no espaço extravascular pulmonar (AEEVP) (4) é proporcional ao número de linhas-B presentes na USP. O padrão normal de ausência de sinal de eco (pulmão preto, pequena quantidade de AEEVP), pode dar lugar ao padrão preto e branco (edema intersticial subpleural com múltiplas linhas-B), até um padrão completamente branco do pulmão (edema alveolar pulmonar), linhas-B coalescentes, o número variando com a posição do indivíduo e com a região pulmonar analisada, havendo comprovação morfológica (39).

O número de linhas-B na varredura do tórax anterolateral é geralmente somado para gerar uma pontuação de $\leq 1-5$ até ≥ 30 , assim criando uma pontuação semiquantitativa. Mais do que 2 por cada espaço intercostal ou até 5 numa varredura adequada no tórax anterolateral pode ser um achado normal, mais frequente nas áreas látero-basais. O número e a extensão espacial delas no tórax anterolateral permite uma estimativa semiquantitativa da AEEVP (de ausente, ≤ 5 , para edema pulmonar grave, ≥ 30 linhas-B) (51).

2.4

**6 Síndrome do Desconforto
Respiratório Agudo**

Síndrome do desconforto respiratório agudo

A SDRA foi descrita por Ashbaugh e outros em 1967, há 53 anos, e estes autores de diferentes especialidades médicas nos Estados Unidos (Ohio, Colorado e Michigan) descreveram um quadro clínico grave em 12 adultos com dispneia, hipoxemia refratária opacificações difusas no RX de tórax após infecção ou trauma (52). Ashbaugh (Ohio) e Petty (Colorado) já haviam salientado esta doença 1 ano antes em pacientes com embolia pulmonar gordurosa e tinham proposto o uso de corticosteroides com finalidade terapêutica (53).

É plausível imaginar-se e é quase certo afirmar-se que a SDRA ocorria anteriormente, muito antes das primeiras UTIs, mas foi em 1967 que se estabeleceram os tempos modernos para a SDRA, com as UTI, se estabelecendo antes — no *Kommunehospitalet*, Copenhague, em dezembro de 1953 (54) —, como o local para tratar estes pacientes (55).

O achado histopatológico de proeminentes membranas hialinas cobrindo os espaços alveolares de 6 de 7 pacientes que vieram a falecer, era um achado que se acreditava antes serem específicos desta síndrome em bebês e no passado assim se denominava esta síndrome descrita em prematuros, síndrome da membrana hialina. Por este motivo quando descrita a SDRA a letra "A" deste acrônimo significava "adulto" sendo mais tarde substituído o significado por "agudo". Em 2000 outros autores publicaram no *New England Journal of Medicine* sobre este tema (56), e em 2017 novamente o mesmo *Journal* atualizou-o salientando dois substanciais progressos: os manejos clínico e do risco de SDRA, ambos fundamentais na redução da incidência e da mortalidade, Contudo, mesmo recentemente, há 3 anos atrás, autores salientaram que esta síndrome permanece como uma condição relativamente comum e letal ou incapacitante, pois os acometidos de SDRA grave sobrevivem com um risco aumentado de declínio cognitivo, depressão, desordem de stress pós-traumático e fraqueza músculo-esquelética persistente (33).

A SDRA foi bem definida clinicamente apenas 25 anos atrás, em 1992, em uma conferência de consenso Americana-Européia que estabeleceu critérios diagnósticos específicos para a SDRA (57) e estes critérios foram revisados e incluiu-se a necessidade de um achado de hipoxemia severa com uma descrição de uma razão $PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg, retirando-se da recomendação prévia a utilização da medição da pressão da artéria e encunhada do capilar pulmonar com cateter flutuante de Swan-Ganz do prévio consenso modificando, então, sua

descrição inicial para tornar mais fácil seu uso nos países com recursos limitados, o que veio a ser o chamado "Critérios de Berlin" da SDRA (58).

Até recentemente a avaliação objetiva das causas da SDRA eram inespecíficas impondo dificuldades de rastreamento, principalmente porque só se baseiam nos dados semiológicos de história e exame físico, da gasometria arterial seriada e dos achados no RX de tórax e estes parâmetros só permitem tardiamente a confirmação da injúria pulmonar.

2.5

**7 Indução Experimental da
SDRA**

Indução experimental de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A SDRA pode ser desencadeada com vários protocolos experimentais e em vários modelos animais e entre eles destacam-se 4: ácido oleico (AO) IV, lavagem pulmonar com solução salina a 0,9% (soro fisiológico) (59), administração intraperitoneal de paraquat (60) e isquemia seguida de reperfusão da artéria pulmonar (61).

Jefferson e Necheles foram os primeiros a publicar que quando AO puro foi injetado no sistema venoso central (SVC) em cães respirando espontaneamente, eles frequentemente morriam, desenvolvendo edema agudo pulmonar com secreção aerada rósea e frequentemente falência hemodinâmica com morte dentro de 1 hora (62).

A injúria induzida por AO é um modelo experimental bem estabelecido de lesão pulmonar aguda em porcos (63) e também em ratos, onde é considerada capaz de reproduzir a fase exsudativa da SDRA (64). A administração de AO já foi feita em várias quantidades, e em várias diluições, tendo sido injetadas IV em experimentos com inúmeros modelos de animais de diferentes portes e com diferentes protocolos, o que torna difícil se pesquisar mais sobre esta síndrome (57), (65), (66), (67), (68,69), (70), (71), (72), (73), (74), (75).

Há diferentes publicações de utilização de AO puro ou combinado em vários protocolos experimentais em roedores: AO puro (as doses variaram muito em diversos estudos e em diversas linhagens), AO com albumina bovina (74) — AO aproximadamente 99% puro e albumina sérica bovina foi usado por Dickey em 1981, quando sugeriu nesta mais antiga publicação que seu modelo se acompanha de uma menor mortalidade —, e AO com etanol (76). AO puro IV e em uma única dose induziu graves alterações compatíveis com SDRA e espécimes de pulmão foram analisados em diversos momentos após a injeção em um estudo sistemático da lesão aguda e das lesões crônicas resultantes (77).

Um outro protocolo de administração do AO diluído em Tris (Hidroximetil Aminometano) que também foi proposto em literatura previamente, e não foi muito testado, pois o trabalho mais importante em que este modelo foi utilizado empregou várias infusões de AO e no nosso caso pretendemos testar um modelo de administração IV única. (78)

Considera-se que há diferentes publicações de utilização de AO puro ou combinado em outros protocolos e em outros experimentos (75,79–81) porém nunca foi publicado um estudo com o objetivo de se comparar a injúria pulmonar à luz das Linhas-B e a sua correlação histopatológica entre os diferentes protocolos de administração.

Em 1977, ou seja, 10 anos após a descrição original da SDRA, Derks fez o estudo mais detalhado dos achados histopatológicos do modelo de AO em animais sacrificados 6-12 horas após a injeção no sistema venoso central (SVC) com demonstração de edema alveolar, hemorragia pulmonar, congestão e necrose do septo alveolar, pois a deposição de fibrina na superfície alveolar implica a ocorrência de coagulação extravascular (71).

Aproximadamente uma década depois observou-se nas necropsias de animais em momentos diferentes após infusão de AO que a ação direta e indireta imediata e precoce é uma lesão inflamatória no parênquima pulmonar semelhante à da provocada por sepse (82).

Esta consideração tem, ou, historicamente teve, importância no contexto de que se o AO "... é um modelo válido de SDRA, de que as consequências da lesão dependem da fisiopatologia e patobiologia da lesão pulmonar aguda ou são função da causa subjacente, já que a SDRA estando frequentemente associada à sepse poderia levantar uma forte suspeição de que os eventos inflamatórios únicos postos em movimento pelo processo séptico influenciam o desenvolvimento e a resolução da injúria pulmonar aguda" (83).

À histopatologia, à análise gasométrica arterial e pela análise da propriedade da complacência estática respiratória utilizando-se modelos porcinos provou-se que o comprometimento pulmonar tem características reproduzíveis, ocorre muito precocemente (39), (40) com necrose das células endoteliais seguida de necrose das células epiteliais alveolares com ambos os tipos de células destacando-se das suas membranas basais, congestão capilar grave e edema intersticial/intraalveolar também estando presentes pelas alterações da permeabilidade capilar devidas à injúria do endotélio, tendo distribuição não homogênea da deposição de líquido, primariamente em zonas periféricas e dependentes dos pulmões em estudo de cortes finos TC do tórax em modelo canino (84).

A mortalidade dos animais em diversos experimentos varia muito, podendo ser muito alta (40), o que importa sensivelmente, pois, como foi salientado, enquanto que determinado modelo pode prover benefícios significativos, nenhum é desprovido de pontos fracos,

tornando obrigatório se a escolha é por um experimento em animal de grande porte ela deve ser cuidadosamente considerada com base no foco do estudo (85).

Existe razoável base teórica da aplicabilidade do AO no estudo das lesões pulmonares porém não existe um protocolo definido bem como há escassos relatos e modelos em diferentes espécies e, também, não parece que será consensual a escolha pelos melhores protocolos, relatando os efeitos adversos e a mortalidade, o que vai depender de cada questão de pesquisa (39), (85), (10), (86).

2.6

8 Segurança da USP

Segurança da Ultrassonografia Pulmonar

Diagnosticar precocemente edema pulmonar por intermédio da identificação das linhas-B é muito importante e a USP é segura no cenário médico e nos experimentos em bancada, pois a energia magnética das ondas ultrassônicas com os equipamentos comercialmente disponíveis, e as durações (de segundos) necessários, são muito curtas, o que garante a integridade do tecido que está sendo ‘ecoado’.

Este efeito de energia magnética das ondas ultrassônicas é determinante e provavelmente não completamente compreendido e está ligado a índices mecânicos e ao tempo que o tecido é ecoado, mas como o ângulo de insonação não exerce nenhuma modificação na imagem da ecografia pulmonar, pois não se aplica neste contexto a necessidade de se avaliar fluxo, sendo feita apenas a avaliação do parênquima, este viés não é experimentalmente um aspecto insuperável, ou comprometedor, com um desenho experimental apropriado.

Pela natureza deste exame, e de fatores como experiência dos examinadores, mantido o mesmo *setting* do aparelho, tal como a frequência das ondas ultrassônicas, índices mecânicos, o ciclo de operação do equipamento, a duração da varredura por setor para a varredura, não haverá dificuldades em se proceder à análise com leitura do número total das linhas-B pulmonares.

Miller et al publicou (87) quanto à atuação do ultrassom em tecidos mais “sensíveis” e em exames mais longos, mas, no caso da ecografia pulmonar, este problema não ocorre.

Miller et al descreveram que alterações ao exame “... com ecografia pulmonar não foram evidenciadas durante a maior parte das varreduras com 10 segundos, embora sim com colorações específicas à histopatologia, indicando que até poderia ocorrer hemorragia sem evidência de lesão à imagem da USP ...”.

Estes mesmos autores salientam que a USP comparativamente à tomografia computadorizada (TC) do pulmão em ratos poderia revelar menos ocorrência de aumento do edema.

O desenho deste estudo compara diferentes grupos com um grupo controle (em que nenhum agente lesivo e provocante de SDRA é infundido), e a comparação em poucos momentos específicos do desenho de experimentação assegura que tais achados preocupantes podem

ser prevenidos e o viés pode ser evitado e contornado, já que dentro de cada grupo de ratos o animal servirá, adicionalmente, do seu próprio controle. (87)

Isto é consistente mesmo para os delicados tecidos que contenham ar como os pulmões (58).

O principal fator determinante é o tempo por setor do pulmão, mais do que a duração do exame, e as características do *preset* utilizado. Com a pesquisa com foco nas linhas-B a USP dura apenas 5 segundos por setor com 1-setor do pulmão por exame no rato (78).

3

9 Alterações morfológicas e AO

Alterações morfológicas induzidas pelo ácido oléico

Os achados morfológicos foram descritos e a análise das microscopias ópticas pulmonares dos ratos injetados com AO (T60 minutos) revelaram edema, congestão, hemorragias e necrose. (HE, X125), (Ver figuras 1 a 7).

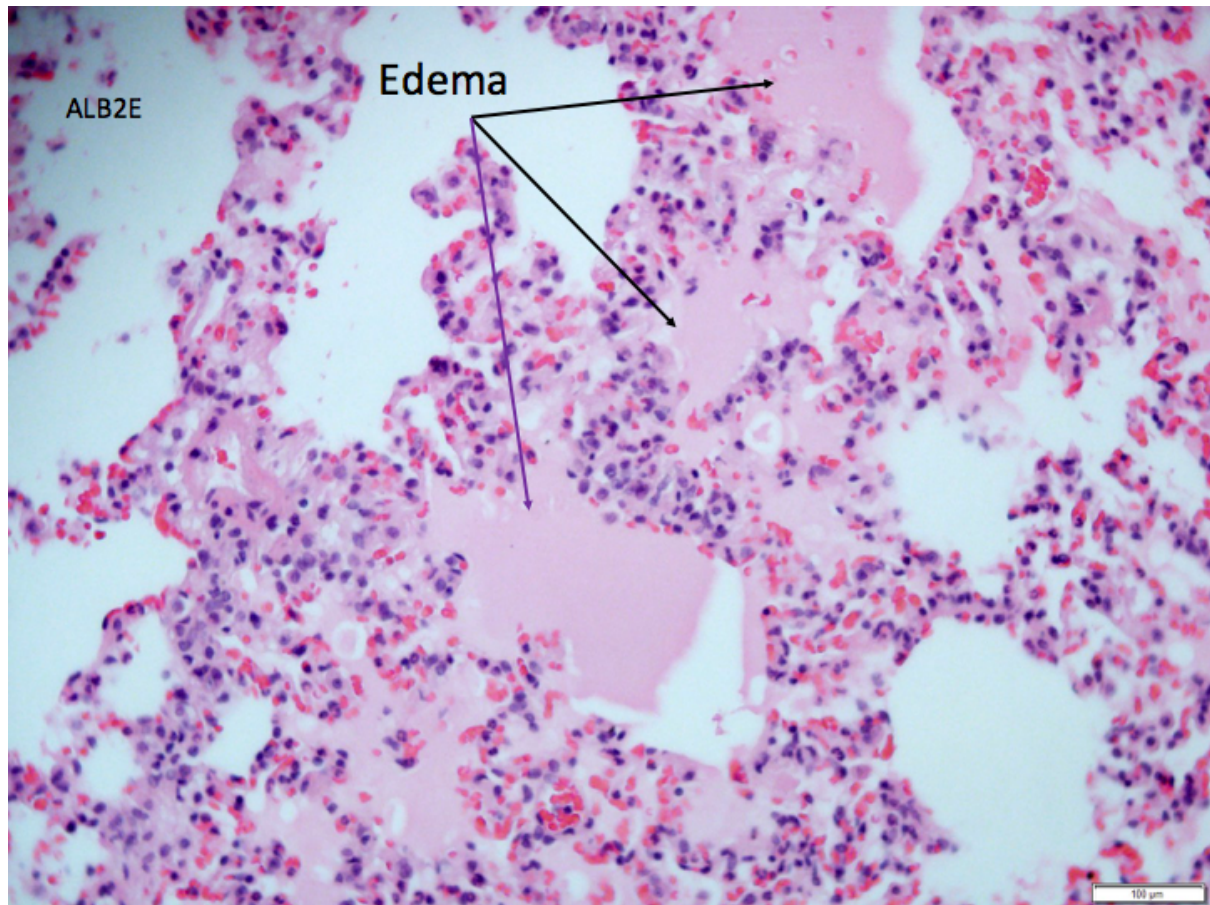


Figura1: Alterações morfológicas – edema.

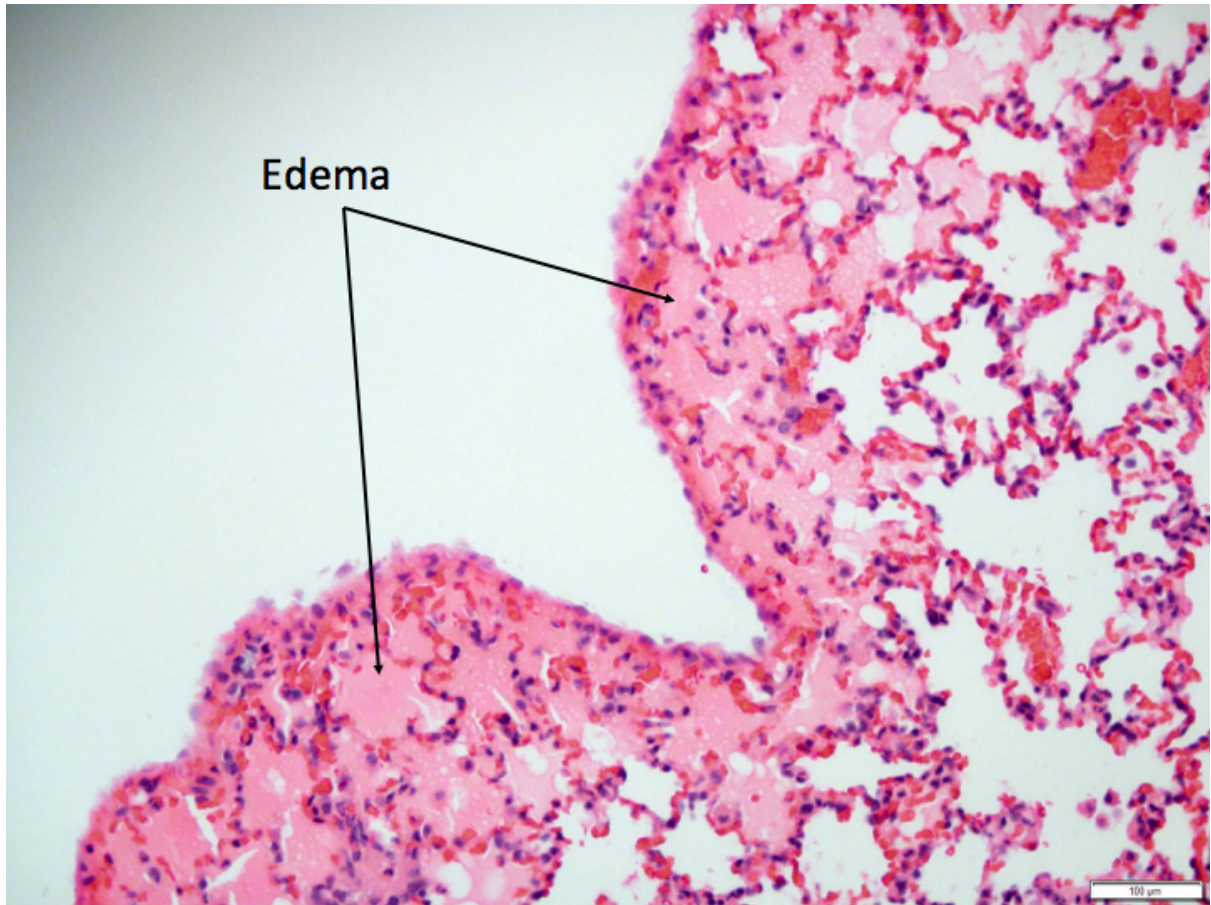


Figura 2: Alterações morfológicas – edema.

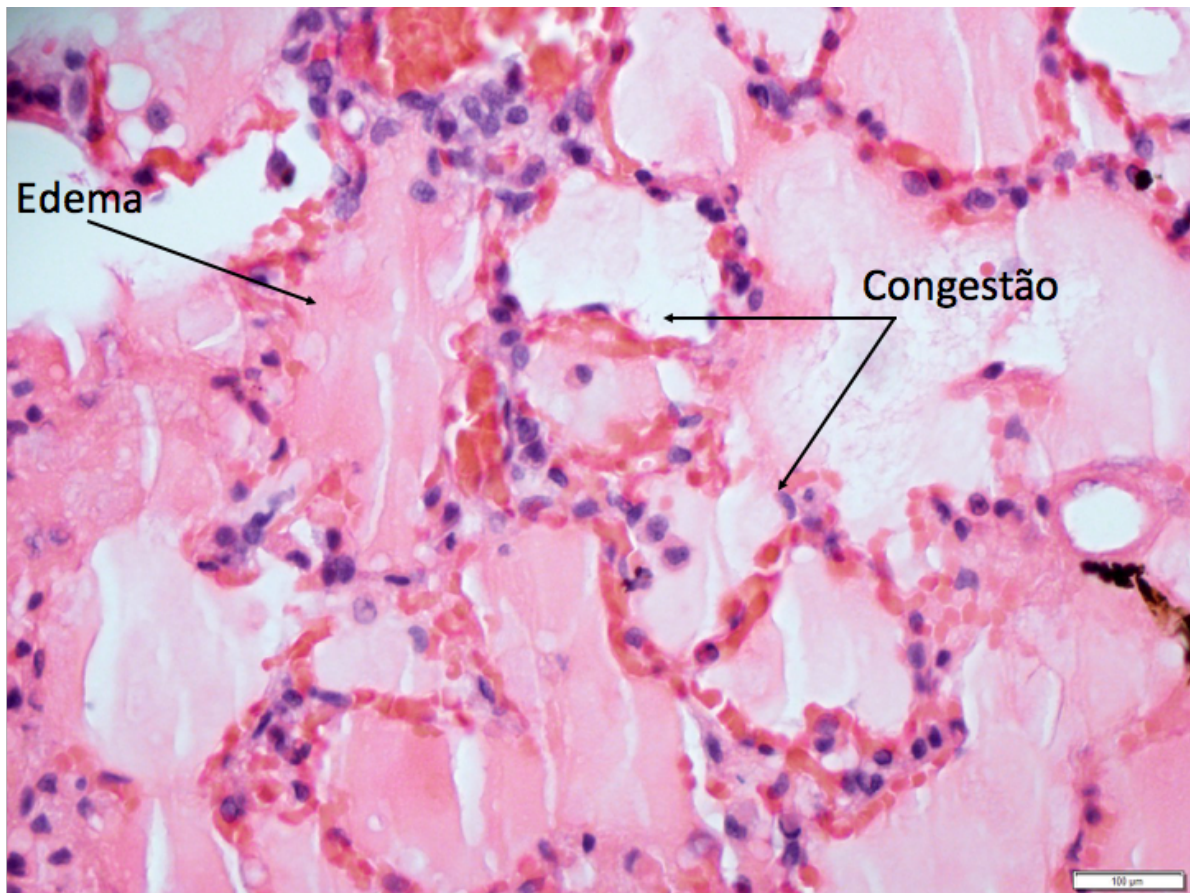


Figura 3: Alterações morfológicas – congestão.

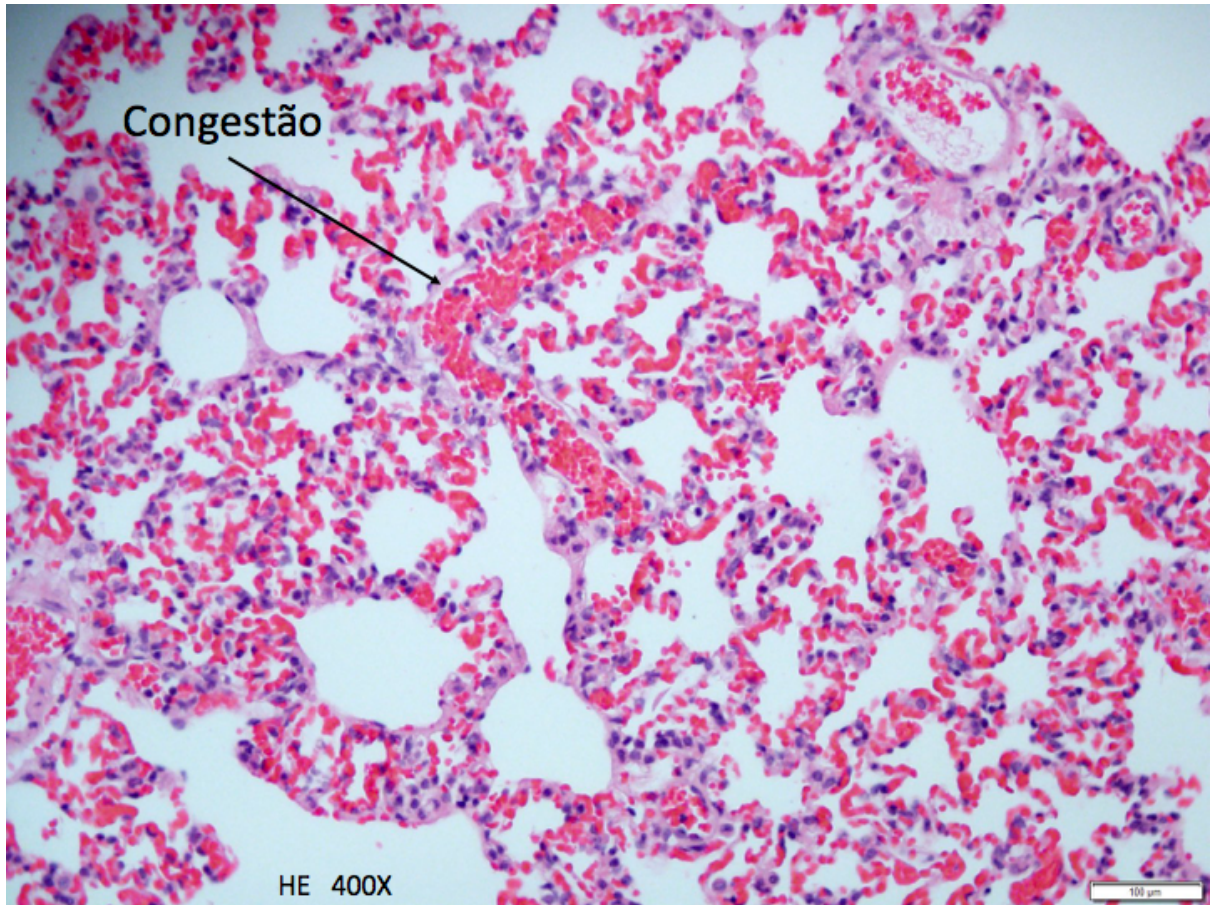


Figura 4: Alterações morfológicas – congestão.

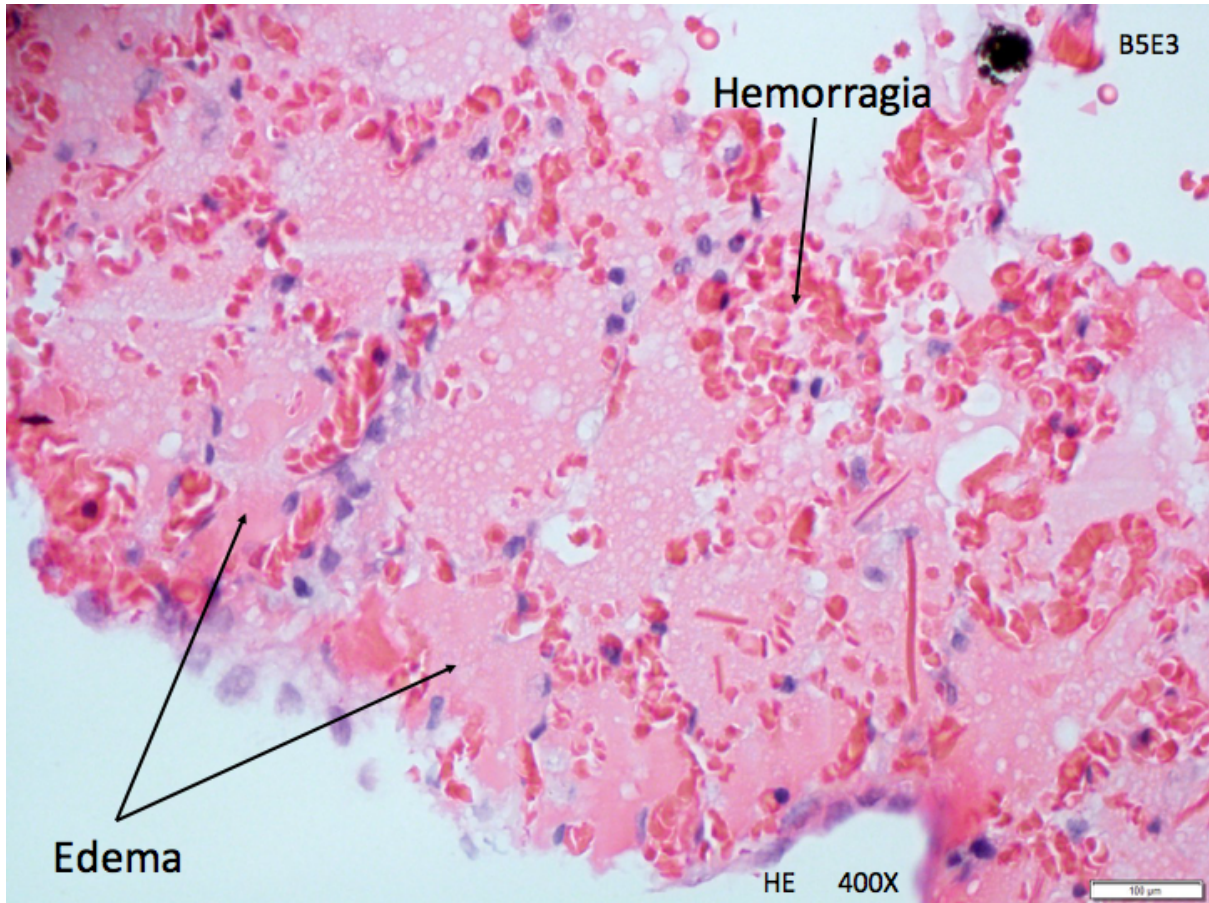


Figura 5: Alterações morfológicas - focos de hemorragia intra-alveolar.

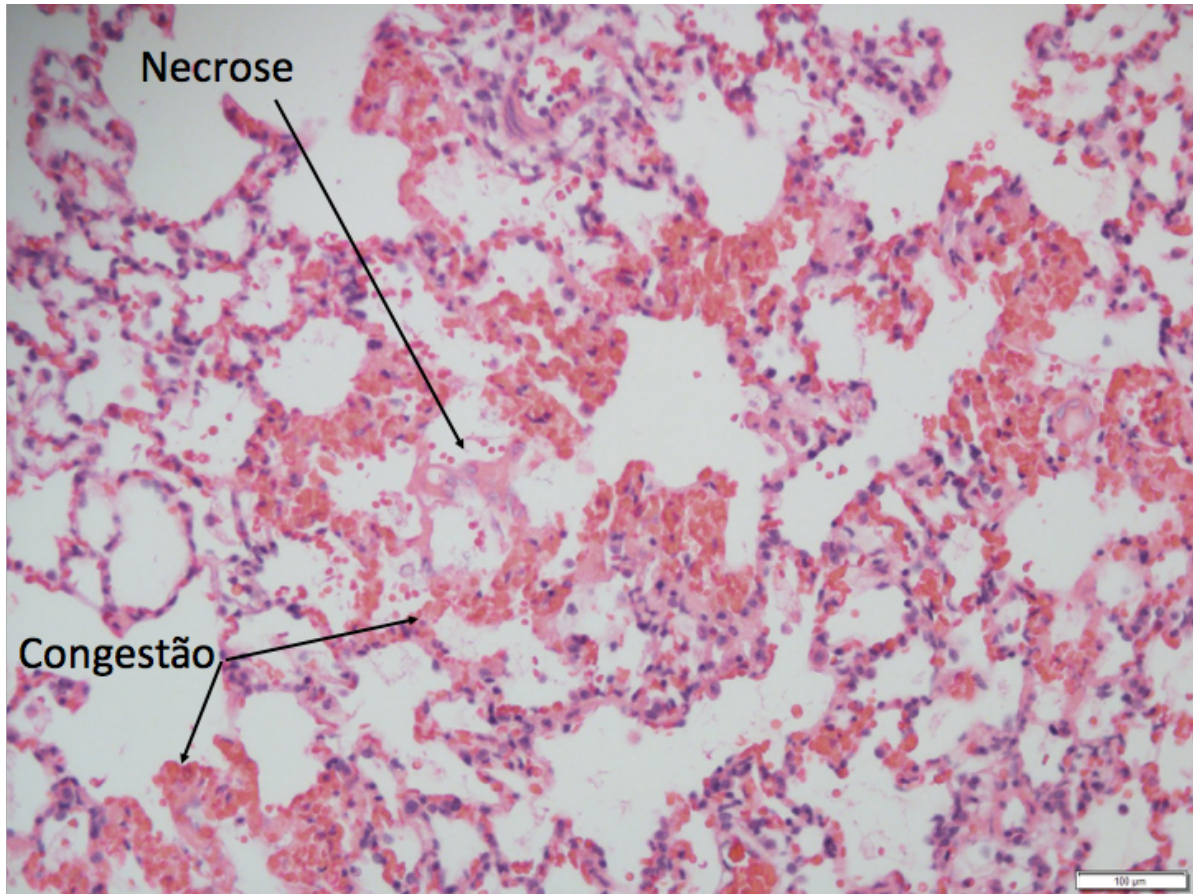


Figura 6: Alterações morfológicas - focos de necrose isquêmica.

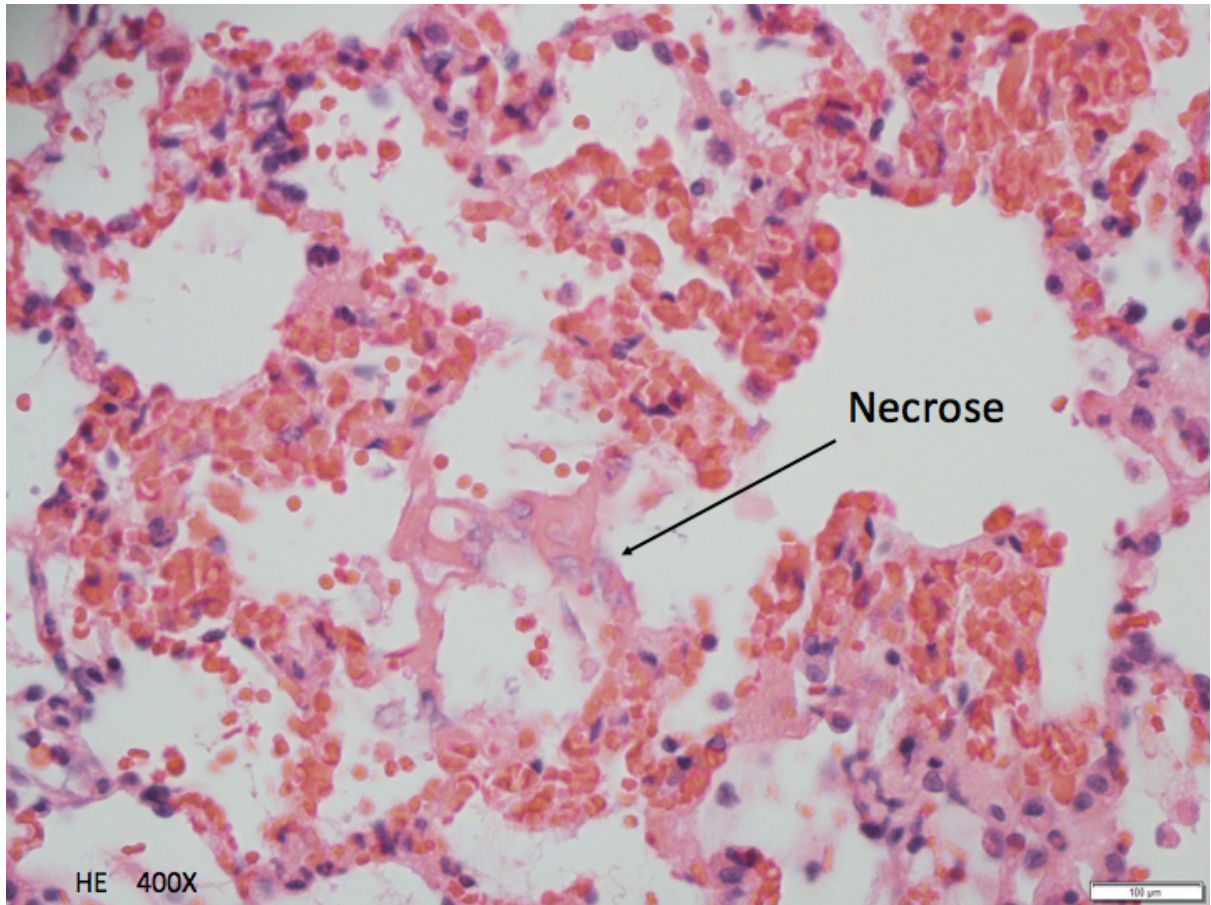


Figura 7: Alterações morfológicas – focos de necrose isquêmica.

4

**10 Treinamento/controlo de
qualidade**

Treinamento e controle de qualidade para as USP e para os experimentos

A capacitação e o controle de qualidade para iniciantes em métodos ecográficos do pulmão são importantes.

O treinamento para a leitura das imagens é comprovadamente de pequeno grau de dificuldade e em pouco tempo qualquer profissional da saúde pode qualificar-se e ser um bom leitor de linhas-A e linhas-B para o diagnóstico de congestão pulmonar (41), e inclusive além de imagens de linhas-B (42,43), (88).

Desde que estruturado, o tempo de treinamento de 2 horas mostrou-se suficiente para prover proficiência para a quantificação de linhas-B da USP.

Estudos têm sido publicados salientando-se que os controles de qualidade baseados na internet proveram harmonização dos critérios de leitura das linhas-B (34).

Em estudo conduzido em grupos de médicos residentes de várias especialidades que executam rotineiramente exames de USP a conformidade das suas leituras para o diagnóstico da presença ou ausência das linhas-B foi adequada, mas revelou-se necessário um treinamento e controle de qualidade adicional para leitura dos números intermediários das linhas-B. Isto destaca que sua limitação não está na execução mas na capacitação continuada das habilidades dos operadores, necessárias para nivelamento dos seus laudos (44).

Este problema pode ser, todavia, controlado com a popularização adicional do *instituto* de um segundo leitor, com o advento do amplo uso de *softwares* gratuitos de comunicação pelos "*smartphones*" (45).

5

11 Justificativa

Justificativa

O presente projeto visou estudar a ultrassonografia pulmonar para diagnóstico de edema pulmonar da lesão pulmonar aguda com protocolos de fase aguda de administração do AO para avaliação de síndrome de desconforto respiratório agudo em ratos, bem como avaliar por gasometria arterial seriada a troca gasosa e caracterizar os seus achados histopatológicos no sacrifício.

Ecografia pulmonar em modelos de ratos com desencadeamento de síndrome de desconforto respiratório agudo com AO é original e pode ser uma opção para o diagnóstico precoce do intenso edema por aumento da permeabilidade da estrutura alvéolo-capilar devido à resposta inflamatória que precede a lesão alveolar e que representa a fase exsudativa precoce (83).

6

12 Objetivos

Objectivos

Geral

Descrever o modelo de lesão pulmonar em ratos à ultrassonografia pulmonar com identificação das linhas-B após administração de AO com proposição de diagnosticar-se precocemente o edema da lesão pulmonar aguda por comprometimento do espaço alvéolo-capilar que precede o colapso e a necrose alveolar.

Específicos

- Comparar os achados da ultrassonografia nos protocolos agudos já usados de administração de AO em ratos.
- Avaliar as alterações histopatológicas pulmonares após a administração do AO.
- Mensurar as alterações de troca gasosa provocadas com administração de AO nas gasometrias arteriais seriadas após administração de AO.

7

13 Análise estatística

Análise Estatística

Todos os dados de interesse do projeto serão coletados, registrados em planilha EXCEL e apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis e a análise estatística será feita com o programa SPSS versão-18. Os testes escolhidos para cada análise variarão na dependência da distribuição normal ou não normal e serão utilizados teste t de Student ou, no caso de uma distribuição não normal, um teste Kruskal Wallis seguido pelo teste post hoc com ajuste de Bonferroni. O nível de significância que será aceito será fixado em 5%. Todos os dados serão analisados de forma cegada.

8

14 Conclusões

Conclusões

A revisão da literatura revelou que a identificação das linhas-B pela ultrassonografia pulmonar pode ser adequada para a avaliação das lesões pulmonares agudas em um modelo experimental de infusão de ácido oleico em ratos.

Os vários protocolos de infusão de ácido oleico em animais de laboratório experimental devem ser testados, pois existe uma diversidade de opções e há poucos estudos sobre o tema.

O uso de equipamentos comercialmente disponíveis de ecocardiografia e ultrassonografia e de transdutores disponíveis devem ser testados em animais de pequeno porte e, se aprovados quanto ao seu uso, a adoção de exames pode ser estendida a outros estudos e aplicada em experimentos semelhantes com animais de pequeno porte, pois existe uma translação da bancada dos modelos animais para a área clínica.

9

15 Referências

Referências

1. Lichtenstein D, Mézière G, Biderman P, Gepner A, Barré O. The Comet-tail Artifact [Internet]. Vol. 156, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1997. p. 1640–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.156.5.96-07096>
2. Armstrong WF, Ryan T. Feigenbaum's Echocardiography. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 816 p.
3. Masters BR. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition, two volumes and DVD. Eds: Dan L. Longo, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson and Joseph Loscalzo, ISBN-13: 9780071748896 McGraw Hill [Internet]. Vol. 250, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 2012. p. 1407–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-012-1940-9>
4. Picano E, Gargani L. Ultrasound lung comets: the shape of lung water. Eur J Heart Fail. 2012 Nov;14(11):1194–6.
5. Volpicelli G, Elbarbary M, Blaivas M, Lichtenstein DA, Mathis G, Kirkpatrick AW, et al. International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultrasound. Intensive Care Med. 2012 Apr;38(4):577–91.
6. Picano E, Frassi F, Agricola E, Gligorova S, Gargani L, Mottola G. Ultrasound lung comets: a clinically useful sign of extravascular lung water. J Am Soc Echocardiogr. 2006 Mar;19(3):356–63.
7. Ricci F, Aquilani R, Radico F, Bianco F, Dipace GG, Minihero E, et al. Role and importance of ultrasound lung comets in acute cardiac care. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2015 Apr;4(2):103–12.
8. Jambrik Z, Monti S, Coppola V, Agricola E, Mottola G, Miniati M, et al. Usefulness of ultrasound lung comets as a nonradiologic sign of extravascular lung water. Am J Cardiol. 2004 May 15;93(10):1265–70.
9. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation. Mediators Inflamm. 2015 Nov 12;2015:260465.

10. Akella A, Sharma P, Pandey R, Deshpande SB. Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian J Exp Biol*. 2014 Jul;52(7):712–9.
11. Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri VM, Quintel M, et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1775–86.
12. Picano E, Pellikka PA. Ultrasound of extravascular lung water: a new standard for pulmonary congestion. *Eur Heart J*. 2016 Jul 14;37(27):2097–104.
13. Soldati G, Copetti R, Sher S. Sonographic interstitial syndrome: the sound of lung water. *J Ultrasound Med*. 2009 Feb;28(2):163–74.
14. Gheorghiade M, Follath F, Ponikowski P, Barsuk JH, Blair JEA, Cleland JG, et al. Assessing and grading congestion in acute heart failure: a scientific statement from the acute heart failure committee of the heart failure association of the European Society of Cardiology and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine. *Eur J Heart Fail*. 2010 May;12(5):423–33.
15. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2012 Aug;14(8):803–69.
16. Platz E, Merz AA, Jhund PS, Vazir A, Campbell R, McMurray JJ. Dynamic changes and prognostic value of pulmonary congestion by lung ultrasound in acute and chronic heart failure: a systematic review. *Eur J Heart Fail*. 2017 Sep;19(9):1154–63.
17. Maw AM, Hassanin A, Ho PM, McInnes MDF, Moss A, Juarez-Colunga E, et al. Diagnostic Accuracy of Point-of-Care Lung Ultrasonography and Chest Radiography in Adults With Symptoms Suggestive of Acute Decompensated Heart Failure: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2019 Mar 1;2(3):e190703.
18. Amatya Y, Rupp J, Russell FM, Saunders J, Bales B, House DR. Diagnostic use of lung ultrasound compared to chest radiograph for suspected pneumonia in a resource-limited

- setting. *Int J Emerg Med.* 2018 Mar 12;11(1):8.
19. Nazerian P, Volpicelli G, Vanni S, Gigli C, Betti L, Bartolucci M, et al. Accuracy of lung ultrasound for the diagnosis of consolidations when compared to chest computed tomography. *Am J Emerg Med.* 2015 May;33(5):620–5.
 20. Picano E, Scali MC, Ciampi Q, Lichtenstein D. Lung Ultrasound for the Cardiologist. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2018 Nov;11(11):1692–705.
 21. Lichtenstein D, Mezière G. A lung ultrasound sign allowing bedside distinction between pulmonary edema and COPD: the comet-tail artifact. *Intensive Care Med.* 1998 Dec;24(12):1331–4.
 22. Frassi F, Gargani L, Gligorova S, Ciampi Q, Mottola G, Picano E. Clinical and echocardiographic determinants of ultrasound lung comets. *Eur J Echocardiogr.* 2007 Dec;8(6):474–9.
 23. Stevenson LW. Are hemodynamic goals viable in tailoring heart failure therapy? Hemodynamic goals are relevant. *Circulation.* 2006 Feb 21;113(7):1020–7; discussion 1033.
 24. Lancellotti P, Price S, Edvardsen T, Cosyns B, Neskovic AN, Dulgheru R, et al. The use of echocardiography in acute cardiovascular care: recommendations of the European Association of Cardiovascular Imaging and the Acute Cardiovascular Care Association. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015 Feb;16(2):119–46.
 25. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Oct 15;62(16):e147–239.
 26. 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine : Brussels, Belgium. 15-18 March 2016. *Crit Care.* 2016 Apr 20;20(Suppl 2):94.
 27. Pisani L, Riviello ED, Schultz MJ. Lung ultrasound and neonatal ARDS: is Montreux closer to Berlin than to Kigali? *The Lancet Respiratory Medicine.* 2017 Nov;5(11):e31.
 28. Salama KM, Elshaboury IM, Huissen WM, Eldomiaty HA, Elghoboshy KI. Role of

- bedside sonography in the assessment of patients with chest trauma in the emergency department of Suez Canal University Hospital. *Int Surg J.* 2017 Jan 25;4(2):465.
29. Latour-Perez J, Llamas-Álvarez A-M, Tenza-Lozano EM. Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia. *Eur J Emerg Med.* 2019 Apr;26(2):147.
 30. Lepri G, Orlandi M, Lazzeri C, Bruni C, Hughes M, Bonizzoli M, et al. The emerging role of lung ultrasound in COVID-19 pneumonia. *Eur J Rheumatol Inflamm* [Internet]. 2020 May 7; Available from: <http://dx.doi.org/10.5152/eurjrheum.2020.2063>
 31. Pardała A, Lupa M, Chudek J, Kolonko A. Lung Ultrasound B-lines Occurrence in Relation to Left Ventricular Function and Hydration Status in Hemodialysis Patients. *Medicina* [Internet]. 2019 Feb 12;55(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina55020045>
 32. Beaubien-Souligny W, Bouchard J, Denault A. Point-of-care ultrasound in end-stage kidney disease: beyond lung ultrasound. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018 Nov;27(6):487–96.
 33. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):562–72.
 34. Scali MC, Ciampi Q, Picano E, Bossone E, Ferrara F, Citro R, et al. Quality control of B-lines analysis in stress Echo 2020. *Cardiovasc Ultrasound.* 2018 Sep 25;16(1):20.
 35. Vignon P, Dugard A, Abraham J, Belcour D, Gondran G, Pepino F, et al. Focused training for goal-oriented hand-held echocardiography performed by noncardiologist residents in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2007 Oct;33(10):1795–9.
 36. Mumoli N, Vitale J, Giorgi-Pierfranceschi M, Cresci A, Cei M, Basile V, et al. Accuracy of Nurse-Performed Lung Ultrasound in Patients With Acute Dyspnea: A Prospective Observational Study. *Medicine* . 2016 Mar;95(9):e2925.
 37. Swamy V, Brainin P, Biering-Sørensen T, Platz E. Ability of non-physicians to perform and interpret lung ultrasound: A systematic review. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2019 Aug;18(6):474–83.
 38. Bedetti G, Gargani L, Corbisiero A, Frassi F, Poggianti E, Mottola G. Evaluation of

- ultrasound lung comets by hand-held echocardiography. *Cardiovasc Ultrasound*. 2006 Aug 31;4:34.
39. Gargani L, Lionetti V, Di Cristofano C, Bevilacqua G, Recchia FA, Picano E. Early detection of acute lung injury uncoupled to hypoxemia in pigs using ultrasound lung comets. *Crit Care Med*. 2007 Dec;35(12):2769–74.
 40. Borges AM, Ferrari RS, Thomaz LDGR, Ulbrich JM, Félix EA, Silvello D, et al. Challenges and perspectives in porcine model of acute lung injury using oleic acid. *Pulm Pharmacol Ther*. 2019 Dec;59:101837.
 41. Gargani L. Lung ultrasound: a new tool for the cardiologist. *Cardiovasc Ultrasound*. 2011 Feb 27;9:6.
 42. Haji DL, Royse A, Royse CF. Review article: Clinical impact of non-cardiologist-performed transthoracic echocardiography in emergency medicine, intensive care medicine and anaesthesia [Internet]. Vol. 25, *Emergency Medicine Australasia*. 2013. p. 4–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1742-6723.12033>
 43. Lim JS, Lee S, Do HH, Oh KH. Can Limited Education of Lung Ultrasound Be Conducted to Medical Students Properly? A Pilot Study. *Biomed Res Int*. 2017 Mar 28;2017:8147075.
 44. Torres MAR, Texeira TF, Bellagamba CCA, Iplinski B, Scali MC, Carpeggiani C, et al. P4724 Lung ultrasound B-Lines readings by medical residents: the need of training and quality control. *Eur Heart J* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2020 Jul 3];39(suppl_1). Available from: https://academic.oup.com/eurheartj/article-pdf/39/suppl_1/ehy563.P4724/25574633/ehy563.p4724.pdf
 45. Scali MC, de Azevedo Bellagamba CC, Ciampi Q, Simova I, de Castro E Silva Pretto JL, Djordjevic-Dikic A, et al. Stress echocardiography with smartphone: real-time remote reading for regional wall motion. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2017 Nov;33(11):1731–6.
 46. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1971 Dec 23;285(26):1441–6.

47. Marantz PR, Tobin JN, Wassertheil-Smoller S, Steingart RM, Wexler JP, Budner N, et al. The relationship between left ventricular systolic function and congestive heart failure diagnosed by clinical criteria. *Circulation*. 1988 Mar;77(3):607–12.
48. Kim J, Jacobs DR Jr, Luepker RV, Shahar E, Margolis KL, Becker MP. Prognostic value of a novel classification scheme for heart failure: the Minnesota Heart Failure Criteria. *Am J Epidemiol*. 2006 Jul 15;164(2):184–93.
49. Table 2: Diagnostic accuracy of lung ultrasonography and chest radiography in detection of community acquired pneumonia (95% confidence interval) [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1374/table-2>
50. Pieske B, Tschöpe C, de Boer RA, Fraser AG, Anker SD, Donal E, et al. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2019 Oct 21;40(40):3297–317.
51. Platz E, Jhund PS, Girerd N, Pivetta E, McMurray JJV, Peacock WF, et al. Expert consensus document: Reporting checklist for quantification of pulmonary congestion by lung ultrasound in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2019 Jul;21(7):844–51.
52. Ashbaugh D, Boyd Bigelow D, Petty T, Levine B. ACUTE RESPIRATORY DISTRESS IN ADULTS. *Lancet*. 1967 Aug;290(7511):319–23.
53. Ashbaugh DG, Petty TL. The use of corticosteroids in the treatment of respiratory failure associated with massive fat embolism. *Surg Gynecol Obstet*. 1966 Sep;123(3):493–500.
54. Berthelsen PG, Cronqvist M. The first intensive care unit in the world: Copenhagen 1953. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003 Nov;47(10):1190–5.
55. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Oct;33(4):319–27.
56. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1334–49.

57. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [Internet]. Vol. 149, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994. p. 818–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>
58. Website [Internet]. [cited 2020 Jul 8]. Available from: ernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [Internet]. Vol. 149, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994. p. 818–24. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>
59. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Mar 14;5(1):18.
60. Zhang Y, Cao J, Chen Y, Chen P, Peng H, Cai S, et al. Intraperitoneal injection of cigarette smoke extract induced emphysema, and injury of cardiac and skeletal muscles in BALB/C mice [Internet]. Vol. 39, *Experimental Lung Research*. 2013. p. 18–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/01902148.2012.745910>
61. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*. 2007 Feb;113(1):1–12.
62. Jefferson NC, Necheles H. Oleic acid toxicity and fat embolism. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1948 Jun;68(2):248–50.
63. Website [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: <http://hdl.handle.net/10183/188949>
64. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, de Moraes IMM, Oliveira FM de J, Younes-Ibrahim M, et al. Oleic acid induces lung injury in mice through activation of the ERK pathway. *Mediators Inflamm*. 2012 Nov 13;2012:956509.
65. Cahill JM, Daly BF, Byrne JJ. Ventilatory and circulatory response to oleic acid embolus. *J Trauma*. 1974 Jan;14(1):73–6.

66. Halasz NA, Marasco JP. An experimental study of fat embolism. *Surgery*. 1957 Jun;41(6):921–9.
67. Bradley BE Jr, Vracko R, Sullivan KN, Fry LH, Akeson WH. Corticosteroids as treatment for chemical pneumonitis induced by intravenous oleic acid. *Clin Orthop Relat Res*. 1972 Jul;86:230–6.
68. Hamilton RW Jr, Hustead RF, Peltier LF. FAT EMBOLISM: THE EFFECT OF PARTICULATE EMBOLISM ON LUNG SURFACTANT. *Surgery*. 1964 Jul;56:53–6.
69. Baker PL, Kuenzig MC, Peltier LF. Experimental fat embolism in dogs. *J Trauma*. 1969 Jul;9(7):577–86.
70. Gemer M, Dunegan LJ, Lehr JL, Bruner JD, Stetz CW, Don HF, et al. Pulmonary insufficiency induced by oleic acid in the sheep: a model for investigation of extracorporeal oxygenation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975 May;69(5):793–9.
71. Derks CM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol*. 1977 Apr;87(1):143–58.
72. Smith G, Winter PM, Wheelis RF. Increased normobaric oxygen tolerance of rabbits following oleic acid-induced lung damage. *J Appl Physiol*. 1973 Sep;35(3):395–400.
73. Peltier LF. Fat embolism. III. The toxic properties of neutral fat and free fatty acids. *Surgery*. 1956 Oct;40(4):665–70.
74. Website [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: Dickey BF, Thrall RS, McCormick JR, Ward PA. Oleic-acid-induced lung injury in the rat. Failure of indomethacin treatment or complement depletion to ablate lung injury. *Am J Pathol*. 1981;103(3):376–383.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7234970>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1903842>
75. Erdem A, Gedikli E, Yersal N, Karaismailoglu S, Muftuoglu S, Fadillioglu E, et al. Protective role of erdosteine pretreatment on oleic acid-induced acute lung injury. *J Surg Res*. 2017 Jun 1;213:234–42.

76. Ma H, Huang D, Zhang M, Huang X, Ma S, Mao S, et al. Lung ultrasound is a reliable method for evaluating extravascular lung water volume in rodents. *BMC Anesthesiol.* 2015 Nov 12;15:162.
77. Website [Internet]. [cited 2020 Jul 8]. Available from: Derks CM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol.* 1977;87(1):143–158. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=851163
78. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Medeiros-de-Moraes IM, de Jesus Oliveira FM, Burth P, Bozza PT, Faria MVC, et al. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis [Internet]. Vol. 11, *PLOS ONE.* 2016. p. e0153607. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153607>
79. Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, Curtin WA, Laffey JG. Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury. *BMC Pulm Med.* 2008 Jul 8;8:9.
80. Gaio E, Melo e Silva CA de, Brito F, Firmino MAP, Storck R, Freitas E. Stability of the animal model of oleic acid-induced acute lung injury. *J Bras Pneumol.* 2009 Aug;35(8):759–66.
81. Hagawane TN, Gaikwad RV, Kshirsagar NA. Dual hit lipopolysaccharide & oleic acid combination induced rat model of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Indian J Med Res.* 2016 May;143(5):624–32.
82. 38th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine [Internet]. Vol. 22, *Critical Care.* 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-018-1973-5>
83. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury [Internet]. Vol. 149, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 1994. p. 245–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.149.1.8111590>
84. Scillia P, Kafi SA, Mélot C, Keyzer C, Naeije R, Gevenois PA. Oleic acid-induced lung

- injury: thin-section CT evaluation in dogs. *Radiology*. 2001 Jun;219(3):724–31.
85. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB. Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Ann Thorac Surg*. 2012 Apr;93(4):1331–9.
 86. Hartmann EK, Bentley A, Duenges B, Klein KU, Boehme S, Markstaller K, et al. TIP peptide inhalation in oleic acid-induced experimental lung injury: a post-hoc comparison. *BMC Res Notes*. 2013 Sep 27;6:385.
 87. Miller DL, Abo A, Abramowicz JS, Bigelow TA, Dalecki D, Dickman E, et al. Diagnostic Ultrasound Safety Review for Point-of-Care Ultrasound Practitioners. *J Ultrasound Med*. 2020 Jun;39(6):1069–84.
 88. Russell FM, Ferre R, Ehrman RR, Noble V, Gargani L, Collins SP, et al. What are the minimum requirements to establish proficiency in lung ultrasound training for quantifying B-lines? *ESC Heart Fail* [Internet]. 2020 Jul 22; Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ehf2.12907>

10

16 Artigo

ARTIGO

Resumo

Lesão pulmonar do ácido oleico: diagnóstico precoce pelas linhas-B da ultrassonografia e relação com alteração funcional: um estudo imagem x histopatologia em modelo experimental de ratos.

Embasamento. Linhas-B detectadas por ultrassom pulmonar (USP) é sinal de síndrome intersticial aguda do edema pulmonar cardiogênico, pneumonia COVID-19 e síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA).

Objetivo. Avaliar a USP, a gasometria arterial e histopatologia pulmonar em um modelo experimental agudo de SDRA em ratos por ácido oleico (AO).

Métodos. USP foi empregado em 57 ratos de laboratório Wistar (398.1 ± 54.7 g, 71 ± 7 dias, machos) sob ventilação contínua igualmente distribuídos em três grupos diferentes: 1- controle, infusão salina (S), 2- AO (33,33%), e 3- AO diluído em albumina bovina (AO-a) (33,33%). Varreduras com USP e transdutor linear de 7,5-MHz em ambos os hemitóraces em locais pré-definidos aos 0, 15, 30 e 60 minutos permitiram a contagem de linhas-B e diferenças entre basal e cada ponto experimental foram testados com teste de Kruskal Wallis seguida por teste post hoc com ajuste de Bonferroni. Imagens foram sincronizadas com gasometria arterial aos 0, 15 e 60 minutos e análise morfológica abrangente com hematoxilina-eosina (HE) em todos os ratos no sacrifício e a magnitude da lesão foi estimada. O nível de significância que foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

Resultados. O número de linhas-B aumentou significativamente em AO (8.7 ± 3.2 , 12.5 ± 2.8 , 15.1 ± 3.6) e AO-a (8.6 ± 3.4 , 13.1 ± 4.3 , 14.76 ± 4.2), mas não em S (1.2 ± 1.5 , 1.5 ± 1.5 , 1.8 ± 1.5 , $p < 0.001$) aos 0, 15, 30 e 60 minutos. PO₂ foi constante no grupo S e diminuiu nos grupos AO. Edema alveolar e necrose não foram diferentes em AO e AOa x S.

Conclusões. Avaliação da presença e número de linhas-B com USP permite detecção de SDRA por AO em ratos, com avaliação não invasiva precoce e quantitativa de lesão. Comprometimento proeminente com achados histopatológicos semelhantes à SDRA nos grupos AO e AO-a no sacrifício dos ratos foi demonstrada.

Abstract

B-Lines with lung ultrasound for detection of pulmonary acute injury in an experimental model of oleic acid infusion in rats.

Background. B-profile detected by lung ultrasound (LUS) is a sign of acute interstitial syndrome found in cardiogenic pulmonary edema, COVID-19 pneumonia and acute respiratory distress syndrome (ARDS).

Aim. To assess LUS and morphological correlates in a rat experimental model of ARDS induced by oleic acid (OA).

Methods. We used LUS in 57 anesthetized Wistar lab rats (398.1 ± 54.7 g, 71 ± 7 days, all males) under continuous ventilation equally distributed in three different groups: 1- control, saline infusion (S), 2- OA (33.33%), and 3- OA diluted in bovine albumin (OA-a) (33.33%). LUS scanning with a 7-MHz linear probe at both sides of thorax allowed counting of B-lines (from 0= black lung with horizontal A-lines to 10 = white lung with coalescing B-lines) in 2 predefined scanning sites at 0, 15, 30 and 60' synchronized with arterial blood gas analysis along with comprehensive morphologic analysis (HE) in all animals at end, and severity of the lesion was estimated to quantify abnormalities in histopathology.

Results. The number of B-lines increased significantly in OA (8.7 ± 3.2 , 12.5 ± 2.8 , 15.1 ± 3.6) and OA-a (8.6 ± 3.4 , 13.1 ± 4.3 , 14.76 ± 4.2), but not in S (1.2 ± 1.5 , 1.5 ± 1.5 , 1.8 ± 1.5 , $p < 0.001$) at 15, 30, and 60 minutes. PO₂ did not showed difference among groups. Alveolar edema and necrosis were different in OA and OAa x S ($p < 0.05$).

Conclusions. LUS assessment of B-lines presence and number allows detection of OA-induced ARDS in rats, providing a non-invasive, precocious and quantitative assessment of acute lung injury. Prominent compromise with histopathologic findings similar to those of ARDS in OA and OA-a groups at sacrifice was demonstrated.

Introdução

As linhas-B detectadas por ultrassonografia são o sinal do edema pulmonar, presente em várias doenças, como a insuficiência cardíaca com descompensação aguda e crônica, síndrome do desconforto respiratório agudo e pneumonias, inclusive as do COVID-19.

A importância da mensuração da água extravascular pulmonar foi demonstrada há muitos anos, mas, pelo caráter invasivo do método referencial, não é aplicável ao cotidiano (1). As linhas-B foram validadas contra esta última (2) e a USP despontou na prática clínica como um método simples, reprodutível, e com alto custo-benefício, para avaliação semiquantitativa do edema e da congestão pulmonar (3), (4), (5), (6), (7).

Embora a experiência inicial seja encorajante sob condições estabelecidas (8) o papel potencial da USP na SDRA ainda está sendo validado (9).

A SDRA é uma síndrome clínica com alta incidência, entre 15.000 a 20.000 por ano nos Estados Unidos, e uma mortalidade elevada, de 35% a 40% (10). Seu diagnóstico tem base nos critérios do consenso de Berlim e inclui o achado de hipoxemia refratária grave com $PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg, dispneia e alterações radiológicas pulmonares.

O pilar diagnóstico da SDRA esteve limitado ao achado de infiltrados bilaterais ao RX de tórax, pressão capilar pulmonar até 18 mmHg, gasometria arterial alterada e dispneia (8) e não foi atualizado. Além da hipoxemia grave ocorre, do ponto de vista funcional, um aumento da rigidez pulmonar (11).

Histopatologicamente a SDRA caracteriza-se por lesão alveolar secundária ao edema com excesso de proteínas, precocemente extravasadas dos capilares ao interstício e que se segue de uma resposta inflamatória intensa causada por agentes lesivos no próprio local ou de origem sistêmica. Ao agredirem as estruturas alvéolo-capilares causam aumento da permeabilidade capilar associada à injúria endotelial e epitelial difusas (12). O modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) em ratos é aquele induzido por ácido oleico (AO) e representa a fase exsudativa e é a forma pré-clínica da SDRA (13), porém não há uma uniformidade do melhor protocolo experimental de LPA/SDRA, e poucos estudos apontaram a mortalidade dos animais de pesquisa.

Nosso objetivo foi avaliar a cronometragem e a relação entre o número de linhas-B, a mortalidade com os protocolos descritos para infundir AO, o comportamento dos gases segundo a razão PaO₂/FiO₂, bem como estudar as alterações histológicas no sacrifício aos 60 minutos do experimento em ratos.

Material e Métodos

10.4.1. Animais do projeto experimental

Para este estudo foram usados como animais de experimentação ratos da linhagem Wistar (Rattus Norvegicus Albinus) provenientes de um fornecedor credenciado junto ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram reservados 4 lotes, cada lote com 19 ratos, machos com peso de 300-400 g e com 70-90 dias de vida. (Tabela I).

Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação animal do hospital (UEA - HCPA) para aclimação (14 dias antes do procedimento) e sob os cuidados da equipe e da Veterinária durante todo o período de permanência no biotério, com umidade relativa do ar a 40-60% e temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e recebendo água e ração ad libitum.

Tabela I: Idade e peso por grupos.

	S	AO	AO-a
Idade (dias)	70.06±7.70	68.0±4.29	74.89±6.15
Peso (g)	394.56±35.58	379.39±68.37	420.13±48.63

10.4.2. Tamanho da amostra

O cálculo amostral foi baseado no artigo de Ma H et al de 2015 em que o fármaco indutor de SDRA foi o AO em diluição com etanol. Foi feito com o software G* POWER 3.1.9.2 com tamanho de efeito de 0,2 Alfa (nível de significância de 5%) e poder de 80%. Foram inicialmente programados 4 grupos de ratos e 4 medições (aos 0, 15, 30 e 60 minutos) ou um número total de 76 ratos correspondendo a 19 ratos por grupo, com um grupo controle com infusão de solução salina/soro fisiológico a 0,9% (S), um com AO puro, um com AO diluído com albumina bovina (AO-a) e um com AO e etanol. Um estudo piloto foi feito e devido à alta mortalidade no grupo AO com etanol este foi desconsiderado e o projeto teve andamento baseado nos três grupos acima apontados.

10.4.3. Comitê de Ética

O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa da unidade (CEUA) com nº 0191-2017.

10.4.4. Preparação dos animais e anestesia

Após pesagem e registro do peso e idade dos animais em tabelas apropriadas destinadas à coleta de dados, calcularam-se as concentrações dos fármacos a serem administrados na anestesia, sempre com seu início por via intraperitoneal, com a associação de Cetamina na dose de 80 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg, e de Tramadol 20 mg/kg e Acepromazina 2 mg/kg. Com a administração dos anestésicos, e o seu efeito comprovado pela ausência de reflexos no pinçamento digital, e em caso de persistência dos reflexos a anestesia era aprofundada com Isoflurano por via inalatória, procedia-se a tricotomia na região anterior do tórax até a linha axilar média lateralmente e terço superior do abdômen inferiormente, como mostra a figura 1.

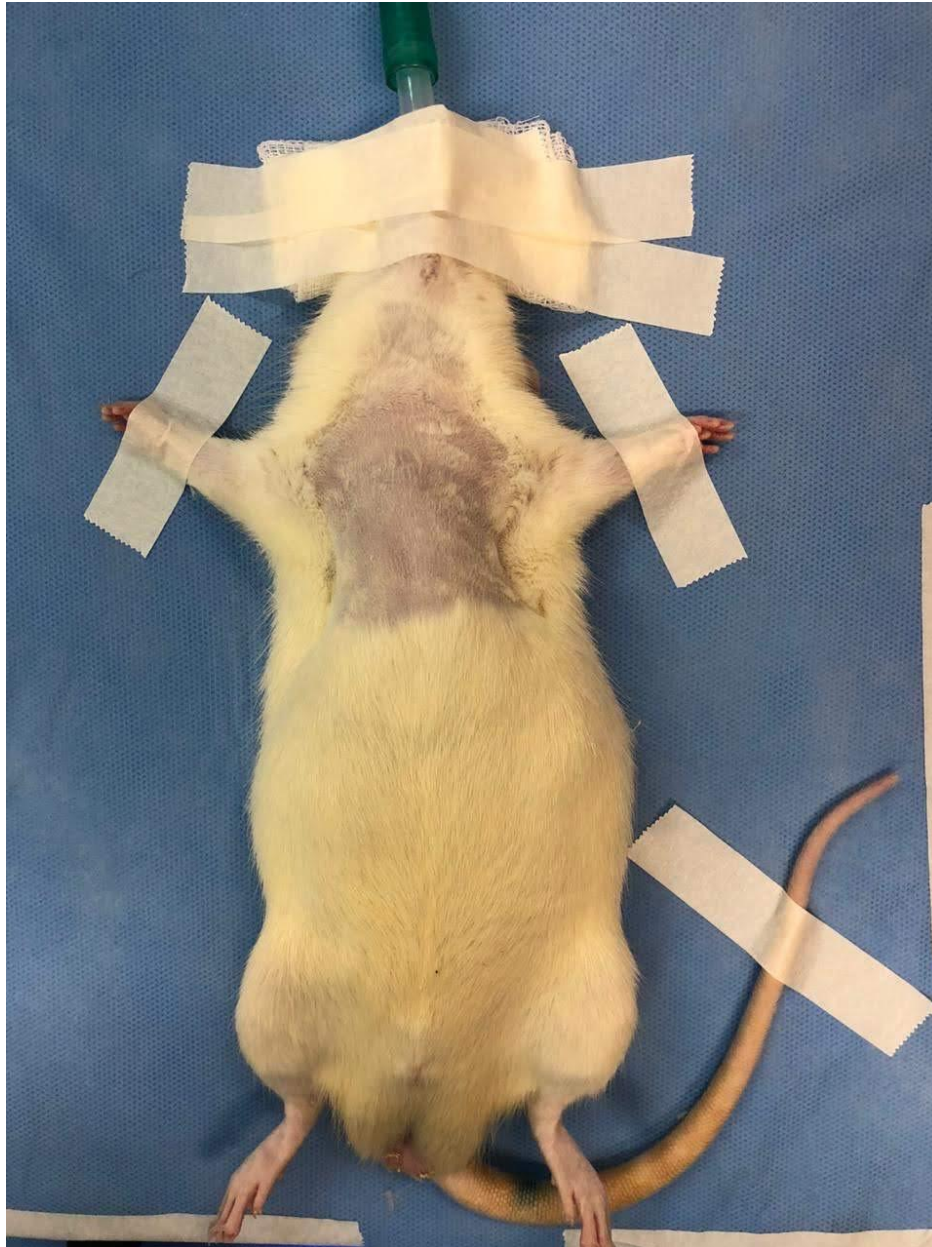


Figura 1. Preparo do rato com tricotomia para a cirurgia após sua anestesia.

Após a anestesia e tricotomia, o animal era posicionado no campo cirúrgico aquecido e se iniciava o procedimento.

■ Cirurgia

Com o animal posicionado e o campo cirúrgico estéril cuidado, e o preparo do instrumental cirúrgico necessário na mesa cirúrgica era feito (figura 2).



Figura 2. Preparo do material necessário para a cirurgia.

A cirurgia tinha como objetivo ter acesso às estruturas: traqueia para intubação e ventilação mecânica, cateterização da carótida para mensuração da pressão arterial e coleta de amostra para gasometria arterial e a cateterização da veia jugular para administração dos fármacos. Posicionando-se o animal com o campo cirúrgico estéril cuidado era feita a limpeza e desinfecção da região da tricotomia seguida de incisão vertical de cerca de 2 cm, partindo do terço inferior da região cervical até o terço superior do tórax, afastamento da musculatura cervical para acesso e isolamento da traqueia e intubação com cânula de polietileno.

A seguir era feita uma incisão num dos arcos proximais para introdução de cânula 14G/16G, dependendo do tamanho do animal (Figura 3).

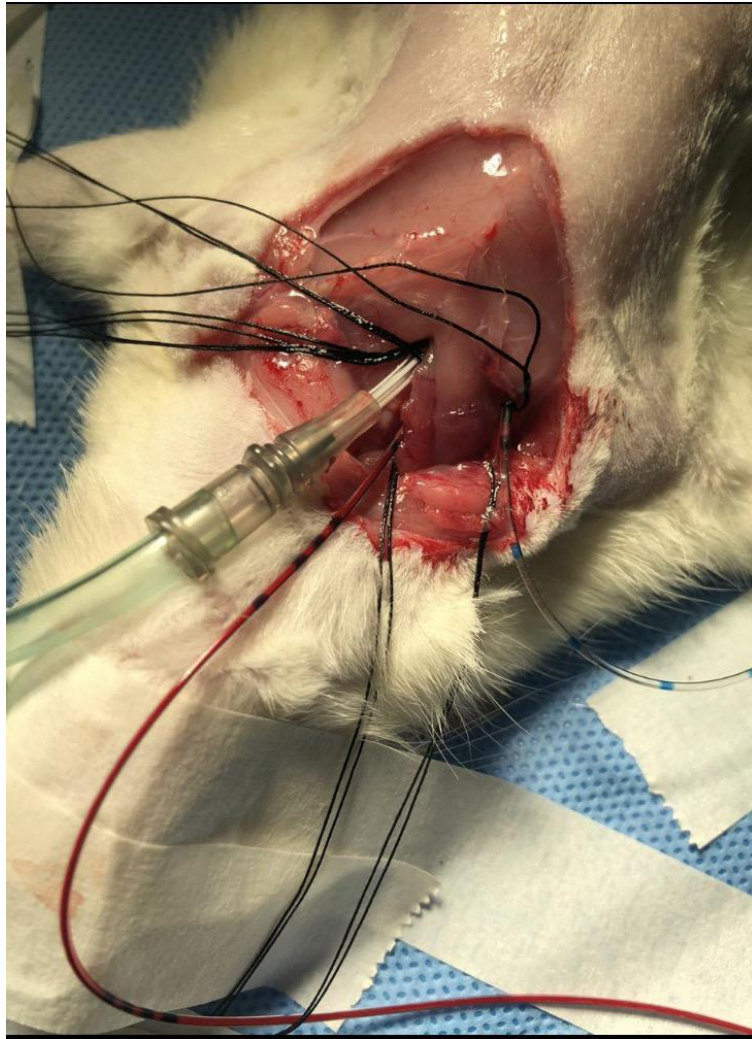


Figura 3. Intubação da traqueia após dissecação.

A seguir, e de imediato, o rato era colocado em um aparelho para ventilação e, com um ventilador Harvard, (Figura 4), com FiO_2 de 80%, era dado início à ventilação.



Figura 4. Ventilador Harvard para ratos utilizado nos experimentos.

Após garantir a ventilação adequada para o animal, era feito o acesso e isolamento da artéria carótida para monitorização contínua da pressão arterial. O cateter da carótida era conectado ao aparelho para mensuração da pressão arterial (PA) com visualização da curva de pressão no monitor (Figura 5).

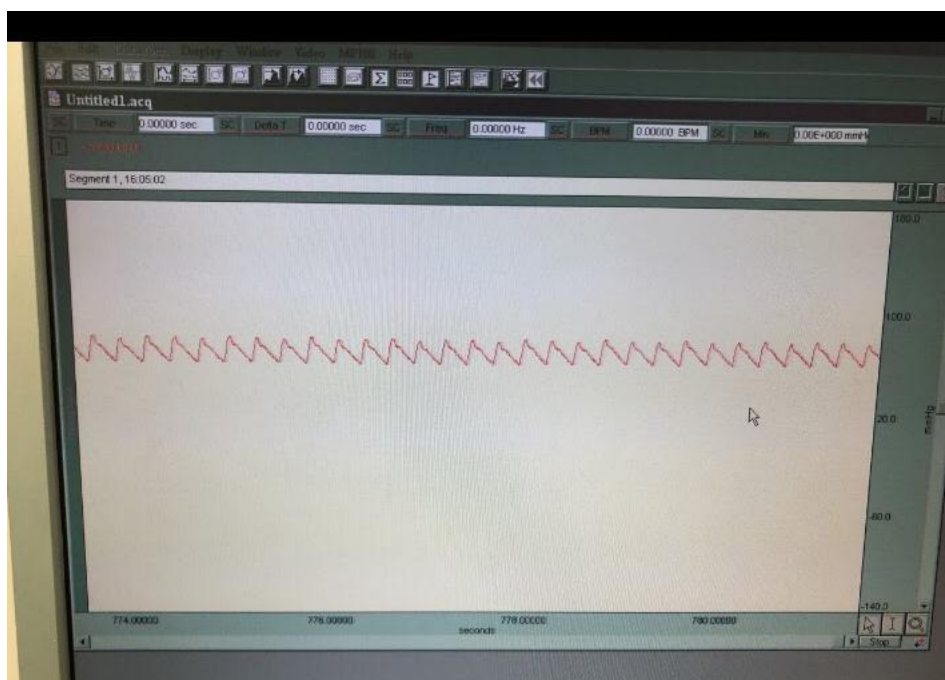


Figura 5. Monitorização contínua da pressão arterial.

Com as vias de acesso da artéria carótida e da veia jugular, respectivamente, cateterizados os vasos e fixados com fio seda 3.0, o cateter da veia jugular era fechado e usado apenas para administração dos fármacos, fluídos e anestésicos, quando necessário.

Uma vez garantida a ventilação e estabilidade do animal, era feita a coleta de amostra da gasometria arterial (0,5 ml), seguida de mensuração da PA média e a ultrassonografia pulmonar (USP) com posicionamento do transdutor em cada hemitórax do rato.

A coleta dos parâmetros da gasometria arterial e das imagens era feita e segue (ver tabela II), que mostra quais dados foram coletados para todos os grupos de ratos em cada um dos 4 momentos. As amostras arteriais não foram coletadas aos 30 minutos em nenhum rato para evitar hipotensão arterial e instabilidade hemodinâmica.

Tabela II: Procedimentos feitos em relação ao tempo de experimento.

	T 0	T 15	T 30	T 60
Linhas-B	+	+	+	+
Pressão arterial	+	+	+	+
FiO2	80%	80%	80%	80%
Gasometria arterial	+	+	-	+

Fármacos usados para a indução de lesão pulmonar aguda

Uma vez feita a coleta das amostras e medidas basais era administrada a substância proposta de acordo com um dos três grupos experimentais ao acaso, escolhidos segundo o programa *randomized allocation software*. A seguir, determinado a qual grupo o animal pertencia, vinha a sequência do protocolo, podendo ser 250 ul de solução salina (S = grupo controle), 10ul/kg de ácido oleico puro (grupo AO) ou 250 ul de uma solução (grupo AO-a).

As drogas usadas foram a solução salina a 0,9% (S) estéril comercialmente disponível, ácido oleico (AO) puro (Laboratório Sigma-Aldrich Inc, representado por ServyLab) e AO diluído em albumina bovina (Ao-a), administradas por infusão semi-lenta na veia jugular dissecada.

A solução salina e o AO puro não necessitam de preparação prévia. S foi administrada por meio de uma seringa de 1 ml, tendo sido atentado apenas para aspirar um volume constante para todos os animais, independentemente do peso, igual a 250 ul.

O AO puro, devido à sua reação com a borracha do êmbolo da seringa plástica, este causou resistência durante a infusão, com conseqüente quebra da mesma, e foi substituída por uma de vidro previamente preenchida por uma pipeta conectada ao respectivo dispositivo para aspiração do volume necessário para cada animal (10ul/kg).

AO-a foi uma preparação testada muitas vezes até chegar-se à conclusão que se é diluída com antecedência perde a estabilidade e mostrou-se inadequada, sendo preparada no momento da sua utilização.

A albumina bovina em pó foi pesada na quantidade de 0,1 mg sendo diluída em 100 ml de água destilada. Em seguida foi preparada uma solução com proporção de 1:5 de AO e albumina bovina, homogeneizada e administrada num volume constante de 250ul para todos os ratos, independentemente do peso, com seringa plástica de 1 ml. Esta não mostrou resistência, devido à diluição do AO em solução de albumina com água destilada.

Neste momento era registrado o horário de administração e iniciava-se a contagem em 0, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, conforme a linha do tempo (ver figura 6).

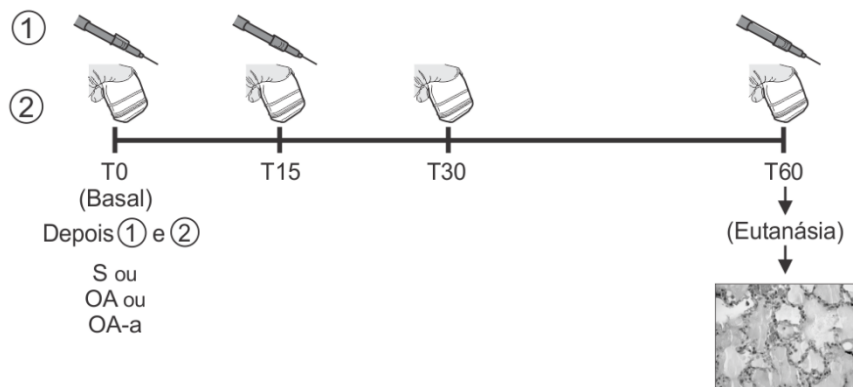


Figura 6: Linha-do-tempo

■ Ultrassonografia pulmonar

As Linhas-B da USP foram obtidas com um aparelho de ultrassom comum, com transdutores lineares de alta frequência (7,5 MHz), para facilitar sua leitura e contagem entre as bandas sem eco refletido, correspondente às costelas dos animais (naturalmente preenchidas de ar)

para otimizar a resolução temporal das imagens do pulmão, necessária por se tratarem de animais de pequeno porte. No experimento foi usado o aparelho exibido abaixo (Philips) (Figura 7).



Figura 7. Ecocardiógrafo utilizado para obtenção das imagens.

As imagens foram obtidas com duração máxima de poucos segundos em cada cada hemitórax e repetidas com uniformidade.

O transdutor (ver figura 8) foi posicionado em todos os animais no hemitórax direito, seguido do outro hemitórax, num ângulo que variou de 80-90 graus em relação à parede torácica do animal. Era dada uma atenção muito especial quanto ao posicionamento do transdutor para garantir a reprodutibilidade, sempre se posicionando cerca de 1 cm da linha mediana e do início da linha pleural no tórax superior até o diafragma, incluindo na tela todo o pulmão correspondente. Em cada hemitórax era feita a varredura inicial e fixadas duas imagens estáticas e em alguns registros de vídeos foram captados.

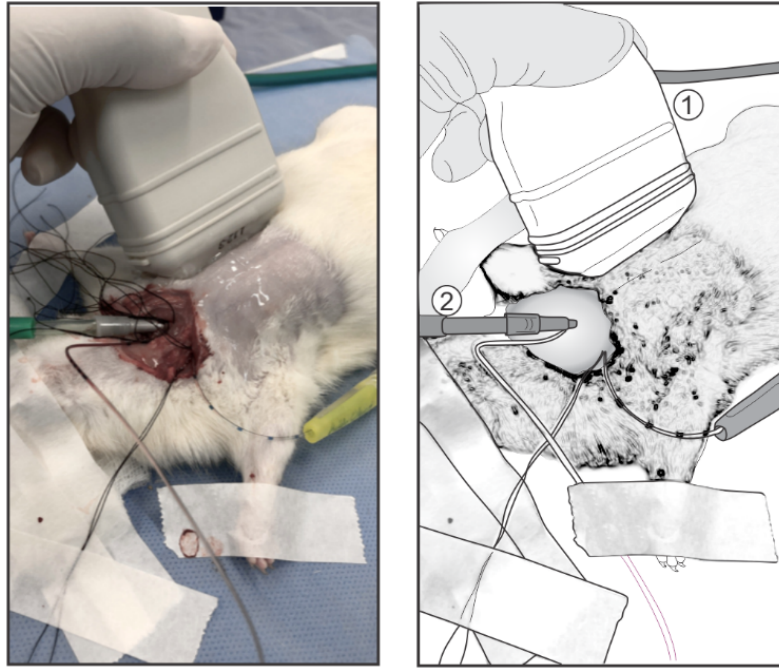


Figura 8: Posicionamento do transdutor no tórax do rato.

Nossa sistemática de obtenção das imagens da USP diferiu do que foi feito no artigo de Ma H et als. (14) para redução do tempo de exposição ao ultrassom e simplificação. As linhas-A normais são observadas na imagem (Figura 9) da USP pulmonar à direita conforme abaixo. As linhas-A normais estavam presentes no T0 em todos os animais.

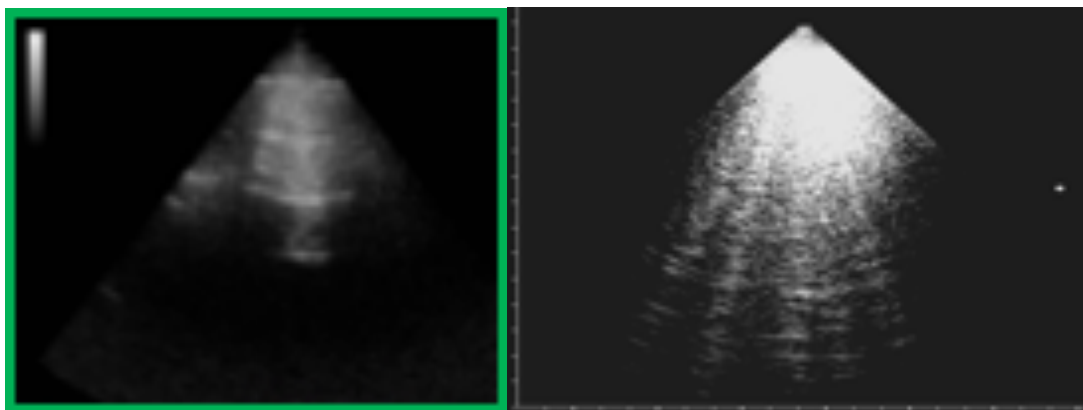


Figura 9: Linhas-A (esquerda), pulmão “seco” normal e Linhas-B (direita), pulmão “úmido” congesto.

Todos os animais tinham o registro basal feito antes da randomização para um dos 3 grupos.

A obtenção e leitura das imagens da USP foi sempre repetida aos 0, 15, 30 e 60 minutos e o padrão das linhas-B é visto nas figuras 10 e 11.



Figura 10: Na tela do ecocardiógrafo: Linhas-B do pulmão após AO.

A procura das Linhas-B e a gravação das imagens era feita imediatamente e a soma do número de linhas de ambos os hemitórax feita para cada momento.



Figura 11: No vídeo visualizam-se Linhas-B do pulmão após AO.

As imagens foram gravadas no *hard-disk* do aparelho e ao final eram exportadas e registradas em um pendrive em formato DICOM para posterior leitura por um outro pesquisador cegado em relação aos grupos experimentais e à linha do tempo.

A obtenção das imagens ocorreu sempre e rapidamente, já estando evidentes as linhas-B após 15 minutos da injeção de AO puro ou associado à albumina, e não no grupo controle.

Patologia

Cada experimento foi projetado para ser agudo com duração de 60 desde o momento da administração do fármaco de cada um dos 3 grupos para a coleta de dados. Ao final de 60, após a última coleta, a anestesia era aprofundada, com volume fixo de cetamina e xilazina de 250ul para cada animal, numa seringa de 1ml e pela veia jugular, para a eutanásia.

Após a eutanásia o animal era levado para a necropsia, para remoção do bloco cardiopulmonar (figura 12), e este por sua vez fixado em formol a 10%, num recipiente de 30ml e conservado para posterior corte e fixação com hematoxilina eosina (HE) em lâminas para microscopia pulmonar.

Os pulmões de cada lado foram segmentados em lobos, e colocados em potes de vidros, numerados com códigos e enviados à Patologia para preparação e leitura das lâminas.

Os segmentos foram fixados em lâminas com a coloração mencionada acima e conservados em blocos de parafina, totalizando cerca de 38 lâminas para cada grupo experimental.

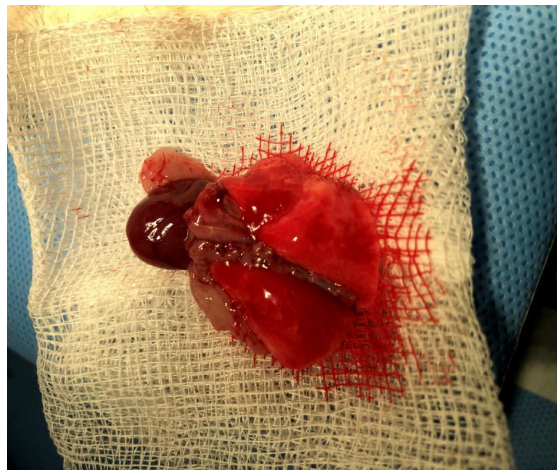


Figura 12: Blocos de pulmões para fixação e análise.

Análise estatística

Todos os dados de interesse do projeto foram coletados, registrados em planilha EXCEL e apresentados como média \pm desvio padrão e mediana e intervalos interquartis. Os cálculos estatísticos foram feitos com o programa SPSS for Windows, release 18.0 (Chicago, Illinois). Os testes escolhidos variaram na dependência da distribuição normal ou não sendo utilizados teste t de Student para as distribuições normais e Kruskal Wallis seguido pelo teste post hoc com ajuste de Bonferroni. O nível de significância aceito foi 5% ($p < 0,05$).

Resultados

10.9.1. Efeitos Hemodinâmicos

O painel da pressão arterial (PA) sistólica nos animais do experimento é mostrado na Tabela 1. A PA não se modificou significativamente em relação aos valores basais na maioria dos ratos, a não ser naqueles que morreram antes do fim dos experimentos. Nestes a hipotensão precedeu o óbito. Nenhum rato do grupo S apresentou modificação da PA.

10.9.2. Mortalidade

Dos 66 ratos estudados um total de 9 ratos constituiu um piloto e baseamos a nossa análise nos 57 restantes distribuídos em três grupos. Dos protocolos publicados em experimentos de fase aguda de administração de AO em ratos (puro na dose assinalada, diluído com albumina bovina e diluído com etanol), o com etanol foi descartado pela morte precoce de todos os ratos no estudo piloto, do qual reportamos: conduzidos com AO puro foram 3 ratos sem óbitos; AO-a foram 3 ratos sem óbitos e AO-etanol com óbitos imediatos. A causa da morte precoce destes ratos foi instabilidade hemodinâmica e das trocas gasosas. Nenhum rato recebeu nenhuma droga vasoativa ou qualquer outra droga além das propostas. Nenhum rato teve repetição da infusão de AO ao longo do experimento.

Dentre os 3 grupos do experimento (S, AO e AO-a), apenas 9 animais morreram antes dos 60 min (T60) e a mortalidade distribuiu-se assim:

No grupo controle

Apenas um animal morreu antes dos 60 min (aos 45 min) e este teve como fator contribuinte a perda maciça de volume durante a cirurgia.

No grupo AO

Três animais morreram antes dos 60 min (T60), aos 16, 31 e 35 min respectivamente. Nestes, não foi detectada nenhuma alteração pré monitoria durante o experimento.

No grupo AO-a

Neste grupo 5 animais morreram precocemente (22, 25, 31, 32, 45 min, respectivamente).

O rato cujo óbito foi aos 45 min, pertencia ao experimento piloto e os outros 4 ao experimento principal. Em nenhum deles houve qualquer alteração pré monitoria.

10.9.3. Análise das gasometrias arteriais

Na condição basal com os animais anestesiados e ventilados, prévia à infusão, todos os ratos tinham uma gasometria arterial normal. Após a injeção, alguns ratos do grupo AO e AO-a desenvolveram gradualmente uma queda da razão PO_2/FiO_2 embora não estatisticamente significativa.

10.9.4. Achados da Ultrassonografia Pulmonar

Cada USP foi realizada em menos de um minuto, com uma exequibilidade de 100%. No Basal, leituras de linhas-B nas 3 preparações (19 ratos/grupo) foram classificadas para linhas-B como um achado dentro do normal (escuro, 0-4), moderado (preto e branco, 4-10), e coalescente (pulmão branco, > 10). No basal a número de linhas-B nos 2 sítios torácicos foi normal para todos aos 0 minutos: S = 0.6 ± 1.1 , AO = 0.7 ± 1.5 , AO-a = 0.9 ± 1.4 e o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças ($p=NS$). O número de linhas-B aumentou significativamente em ambos os hemitóraces ao longo do tempo no grupo AO = (8.7 ± 3.2 , 12.5 ± 2.8 , 15.1 ± 3.6) e AO-a = (8.6 ± 3.4 , 13.1 ± 4.3 , 14.76 ± 4.2), mas não em S = (1.2 ± 1.5 , 1.5 ± 1.5 , 1.8 ± 1.5 , $p < 0.001$) aos 15, 30 and 60 minutos. À análise de comparações repetidas, uma diferença significativa foi encontrada no número de linhas-B em todos os pontos em relação ao basal e em relação a S, mas não entre os grupos AO e AO-a ($p < 0,05$) (Figura 13).

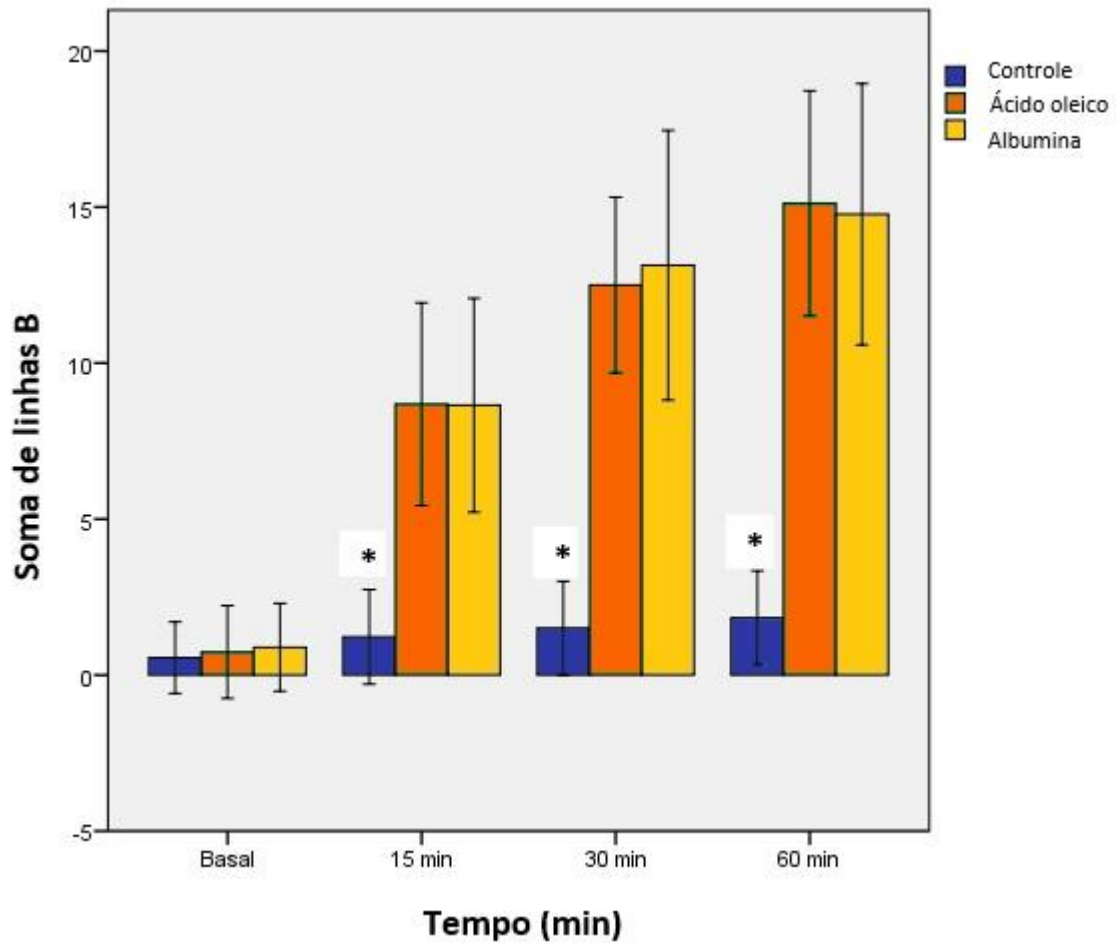


Figura 13: Soma das Linhas-B em ambos os pulmões em função do tempo em controle (S), ácido oleico puro e ácido oleico-albumina bovina ($P < 0,001$).

A Tabela III apresenta os parâmetros basais e no T60 (ao final, antes da eutanásia).

Tabela III: Parâmetros basais e ao final (antes da eutanásia).

	T0			T60		
	S	AO	AO-a	S	AO	AO-a
Pressão arterial	100.3±16.8	94.95±14.75	95.0±22.0	60.81±14.78	48.88±22.90	57.94±19.84
pH	7.54±0.05	7.56±0.06	7.50±0.13	7.59±0.04	7.55±0.05	7.51±0.17
PaCO2	23.48±3.67	22.89±4.88	29.53±16.50	17.42±1.86	20.26±5.0	30.85±25.10
PaO2/FiO2	226.29±82.76	241.16±77.38	246.25±96.84	273.86±114.26	215.14±79.75	244.24±92.33
Linhas-B	0.56±1.15	0.74±1.48*	0.89±1.41*	1.83±1.50*	15.12±3.60**	14.77±4.19**

*diferença entre grupos (p<0.05)

**diferença entre basal e final (p<0.05)

10.9.5. Avaliação histopatológica

Edema intersticial e alveolar foi encontrado em todos os ratos, variando de leve a moderado (Tabela IV). Os achados ao final da análise em todos os ratos indicaram lesão alveolar difusa e lesão do tipo encontrado na fase exsudativa. Edema alveolar e congestão severa foram diferentes se comparados os grupos S e AO-a e AO (p<0,05) e necrose quando comparados os grupos S com os grupos AO e AO-a (p<0.001). Figura 14.

Tabela IV: Achados histopatológicos em cada grupo.

	S	AO	AO-a
Edema intersticial	97.2%	100%	94.7%
Edema alveolar	30.6%	78.9%*	34.2%
Infiltrado pulmonar	5.56%	0%	0%
Hemorragia	25.0%	50.0%	31.6%
Necrose	0%*	57.9%*	21.1%*
Pneumonia	0%	0%	0%
Colapso pulmonar	44.4%	21.1%	26.3%
Congestão leve	88.9%	23.7%*	86.8%
Congestão severa	2.8%	76.3%*	7.9%

*diferença entre grupos ($p < 0.05$)

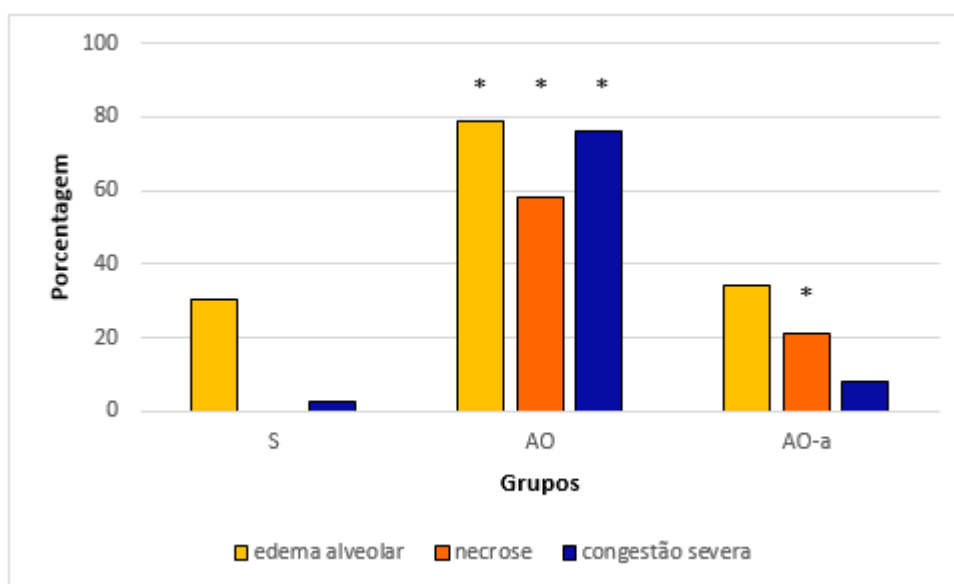


Figura 14: Porcentagem de edema alveolar, necrose e congestão severa entre os grupos ($p < 0,001$).

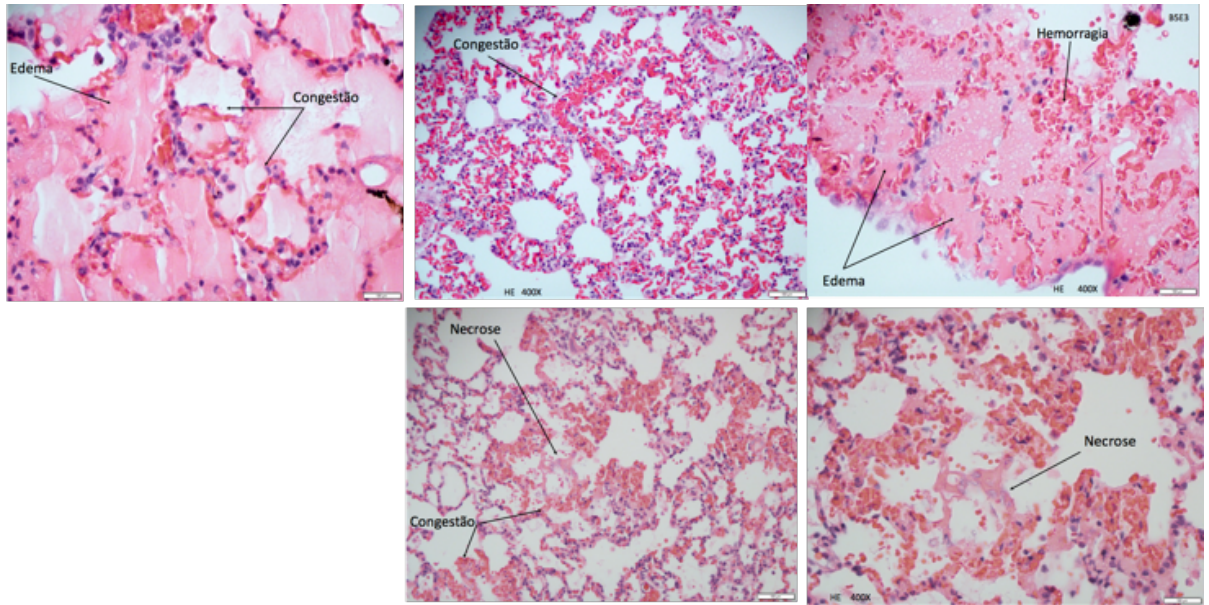


Figura 15: Achados de microfotografias representativos de alterações histológicas (HE) na lesão pulmonar (T60). Na sequência acima, a partir da foto superior à esquerda no sentido horário: edema e congestão, congestão, edema e hemorragia, necrose, embolia arteriolar e necrose e congestão. Todos estes padrões ocorreram indistintamente em ambos os pulmões.

Discussão

A ecografia é o exame ideal para a visualização anatômica de todas as estruturas superficiais. No caso do pulmão, seu uso foi desestimulado pela crença de que o pulmão não estava ao alcance do ultrassom, considerado como um campo de uso fora de cogitação, o que hoje, uma vez implementado, o seu grande alcance desmentiu esta afirmação (15).

As linhas-B, como artefatos, são geradas a partir da interação entre o feixe ultrassônico e o parênquima da periferia do pulmão e são causadas pela perda da aeração pulmonar natural com aumento na densidade da sua superfície. Como artefato são artificios e estes são empregados em qualquer teste com finalidade diagnóstica.

O exame da USP é limitado à periferia do pulmão. Esta, uma verdade sobre a qual não se discute, mas a identificação das linhas-B ganhou notoriedade como uma metodologia diagnóstica e aplicável em um grande número de condições clínicas porque muitas pneumopatias se estendam à superfície pulmonar (16).

Há 23 anos a USP foi desenvolvida, ao prover um índice simples, semiquantitativo e não-invasivo da acumulação de fluídos no espaço extravascular pulmonar (FEEVP) (17) e sua aplicação na clínica foi sedimentada, usada tanto com fins diagnósticos quanto de prognóstico (18) , estabelecida como ferramenta do cotidiano, à beira do leito, nas salas de emergência e das unidades de terapia intensiva (UTI), hemodiálise, naquelas doenças tipicamente associadas com estas áreas fechadas dos hospitais, tais como o edema pulmonar (19), pneumonias inclusive as por COVID-19 (20) e derrames pleurais (21).

As linhas-B foram validadas em estudos transversais (22), ambulatorios (23), internações (24), outdoor (25), exercícios extremos (26), consensos (27) e ensaios clínicos (28), (29). Embora, a identificação das linhas-B e o seu entendimento tenha ganhado uma crescente

aceitação na área clínica e sua grande aplicabilidade tenha sido confirmada pela variedade de estudos, a USP teve seu uso pouco refletido no campo experimental (21). Talvez porque a escolha foi por modelos experimentais de difícil reprodução, com um excessivo número de diferentes espécies de animais, como porcos (30), (31), cães (32), bovinos (33), (34) e de ter sido raramente proposta em animais menores, como, por exemplo, ratos (14).

A aplicação da ultrassonografia pulmonar transtorácica em estudos originais de fase pré clínica desenvolvidos em bancadas de laboratórios com espécies animais pequenas, mais custo-efetivas para a pesquisa, é uma ideia pouco explorada (14), todavia, intuitivamente, as mesmas limitações para os humanos quanto à visualização preferencial por porções periféricas, podem ser estendidas para porcos, ratos, e outros animais, se, como nos humanos, o que ocorre nas porções periféricas refletir o restante do pulmão (21).

A USP com a detecção das linhas-B foi aplicada e validada contra método gravimétrico (14,21) também no contexto da bancada, experimental (30).

Apesar de todo o avanço dos exames das imagens, permanece complexo o uso dos métodos atualmente disponíveis para a medição da quantidade de FEEVP. Clinicamente difícil é pouco reprodutível (35), além de que eles podem ser também influenciados por modificações na perfusão e na ventilação (36). Sem dúvida, a TC de tórax é o exame com maior acurácia para visualizar o parênquima pulmonar, todavia, ela usa radiação ionizante (37) e requer o transporte do paciente para fora da UTI, frequentemente com ventilação mecânica e monitoramento cardiovascular complexo.

A USP é isenta de radiação, é repetível, feita à beira do leito, permite acompanhamento com muito menor custo, rápida e facilmente realizada, e por isto tornou-se atrativa (38), (39). Adicionalmente, ela é capaz de quantificar a extensão da lesão pulmonar. Lichtenstein fez um estudo em que comparou prospectivamente o desempenho diagnóstico da USP com a

ausculta do tórax respiratório e o RX de tórax. Embora em um grupo pequeno de 32 pacientes, a importância deste artigo é o de estabelecer-se as acurácias dos três métodos em diagnosticar o que o autor chamou de síndrome alvéolo-capilar, bem como derrame pleural e consolidação alveolar. Os valores das acurácias para a USP x ausculta x RX de tórax à beira do leito foram, respectivamente, de 95%, 93%, e 97% x 55%, 61%, 36% x 72%, 47% e 75%, respectivamente. A constante k de concordância inter-observadores foi de 0,74, 0,73 e 0,77, respectivamente, para cada uma das três condições clínicas pulmonares. Isto mostra as linhas-B com uma sensibilidade de 98%, e uma especificidade de 88%, desempenhando-se melhor do que a ausculta e o RX de tórax (9).

Há uma necessidade da pesquisa experimental do edema pulmonar naquilo que Grune et al (21) em excelente e recente revisão chama a atenção de um "... campo recentemente emergente da imagem pulmonar ...", com a metodologia de USP, com o que buscamos chamar a atenção da possibilidade de avaliação do edema pulmonar em modelos animais, o "reverse translational approach" mencionado nesta revisão (21).

Para seu uso em animais, da beira do leito para a bancada, no caminho inverso ao usual, e numa analogia do uso em humanos que já está consolidado, há uma demanda de estabelecerem-se protocolos confiáveis da SDRA nos modelos pré-clínicos desta doença.

Ocorreram dificuldades na escolha de um modelo ideal de indução da LPA experimental (30), porque a droga mais usada para desencadeá-la, o ácido oleico (AO), foi usado em diferentes doses, diluições, tempos de observação, tempos para estabelecimento de injúria, regimes de ventilação mecânica, todas estas diferentes configurações aliando-se à carência de informações da mortalidade e dos eventos adversos (40).

Dificuldades na escolha de um modelo ideal da SDRA, pulverizaram as estratégias, levando a publicações com AO em ratos com diferentes períodos de observação e diversos protocolos:

AO puro (41), AO associado a etanol (42) e AO diluído em albumina bovina (43). Os estudos com animais de pequeno porte são importantes sendo custo efetivos.

A avaliação de acumulação de FEEVP em animais já vinha sendo feita, raramente utilizando-se a USP com as linhas-B (14,30) e a manutenção de estabilidade hemodinâmica durante e após a infusão de AO nem sempre foi um objetivo atingido.

Li et al. mostraram que 2 em cada 18 animais com instabilidade hemodinâmica intensa que três animais tiveram importante instabilidade hemodinâmica dentro dos primeiros 30 minutos após a administração de AO seguidos por uma morte precoce (44).

Em um trabalho conduzido no mesmo laboratório deste nosso estudo, a morte precoce totalizou 50% da população (5 porcos). A dose de AO não pareceu estar relacionada à gravidade da lesão pulmonar, pois animais que receberam doses adicionais de AO sobreviveram enquanto outros morreram rapidamente após uma dose única (40).

No presente estudo a USP com detecção das linhas-B mostrou-se capaz de diagnosticar a LPA com diferentes protocolos de AO em modelo experimental agudo de SDRA em ratos.

Estudos clínicos e experimentais estabeleceram o conceito que a acumulação do FEEVP resulta da permeabilidade capilar aumentada que é a anormalidade fisiológica primária nos estágios iniciais da SDRA (45).

Estudos em modelos porcinos (30), (40) corroboram os achados ultraestruturais que Mathay et al (45) publicaram com um número aumentado de neutrófilos intra e extravasculares, plaquetas, e ambas as lesões endoteliais e epiteliais, achados que foram incorporados aos modernos conceitos de edema inflamatório, presente nos ratos do nosso estudo.

A fisiopatologia da SDRA, com suas várias etiologias, merece estudos e o campo está aberto também para os experimentais, como os da sua principal causa, a sepse (46).

O papel da lesão da célula epitelial na disfunção, nos mecanismos que regulam a remoção do fluido de edema alveolar, que não reconhecidos nas considerações primeiras da SDRA, emergiram nos estudos experimentais e clínicos nas últimas décadas (47), (48).

Autores apontam que as linhas-B ocorrem até aos 15 após a injeção de AO, mas, que surpreendentemente, as alterações relatadas na complacência (30) e no número das linhas-B só foi relacionada às mudanças do PaO₂/FIO₂ aos 90 minutos do protocolo de AO.

Este fenômeno da ocorrência muito precoce das linhas-B também foi observado no nosso estudo, em que a grave deterioração fisiológica provavelmente teria ocorrido mais adiante após a infusão, particularmente segundo apontam os achados da gasometria arterial.

A cascata de eventos após injeção IV de AO inicia-se com edema pulmonar rico em proteínas por aumento da permeabilidade seguida por lesão da célula epitelial e disfunção no bojo dos mecanismos que regulam a remoção do FEEVP aumentado, pois, como a formação e acumulação líquida intersticial não é compensada pela inabilidade epitelial de drená-la acaba por este edema se mover do interstício para os espaços aéreos, e, a seguir, quando o volume e as pressões se elevam muito devido aos efeitos da pressão hidrostática no fluxo transvascular de líquido e proteínas há ainda maior geração de edema, e, por fim, mais do que água, mecanismos inflamatórios também ocorrem nesta síndrome (45) .

Esta fase mais avançada da intensa resposta inflamatória tem a ver com o importante papel desempenhado pelas citocinas inflamatórias atuando na mediação, e na amplificação e posteriormente na manutenção de toda esta sequência de eventos (40).

A importância destes nossos achados que vem de acordo a estudos prévios seria a de que eles podem ter implicações clínicas importantes na avaliação precoce da SDRA para um tratamento eficaz do pulmão lesado. (12), (49).

Embora a avaliação da presença de aumento de FEEVP não preencha critérios da SDRA, (American-European Consensus Conference (8)), ela se correlaciona com as medidas da lesão pulmonar e pode ajudar (18), a melhorar a acurácia dos critérios deste Consenso (50).

Além disto, a avaliação da presença de edema correspondendo ao aumento de FEEVP pode ser de valia, pois foi comprovado que ele pode ser um bom e independente preditor da sobrevivência nos pacientes criticamente doentes, inclusive os com a SDRA (51).

Pacientes com ambas agressões, direta (exemplo: pneumonia, pneumectomia, contusão pulmonar, *blast* torácico, inalação ou aspiração de material) e indireta (exemplo: politraumatismo, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, pancreatite aguda, embolia gordurosa) podem ser facilmente submetidos à USP à beira do leito com a procura de linhas-B, aceleração diagnóstica da iminente SDRA, eventualmente prevenir a hipóxia.

Os achados da USP devem ser interligados ao contexto clínico e as informações de linhas-B sejam integradas com outras informações, tais como as hemodinâmicas pela ecocardiografia para avaliação das pressões de enchimento ventricular, que estão aumentadas na IC, outra condição associada com as linhas-B (4), (52).

Autores salientam (18) que pacientes com iminente IC aguda, têm um período de dias ou semanas com lenta acumulação líquida, e na sequência que virá o edema pulmonar pode ser detectado através das linhas-B antes do aparecimento dos sinais clínicos da congestão.

Por uma analogia se a detecção das linhas-B na SDRA puder apontar para uma iminente instalação do aumento do FEEVP antes que o quadro clínico seja totalmente evidente pode-

se talvez iniciar medida de suporte ventilatório mais precocemente, prevenindo a progressão da deterioração sistêmica.

Na pneumonia da COVID-19 também se tem salientado que formas da SDRA, em que a elevação de d-dímeros ocorre, podendo associar-se a desajustes no binômio ventilação-perfusão com hipoxemia, sugerindo-se que a ausência de alteração na mecânica pulmonar e a frequente até 50% dos casos) ocorrência de coagulopatia é fator de risco adicional (53).

Evidentemente tantos dados associados e a complexidade das diversas etiologias da SDRA necessitam confirmação futura em seres humanos e seria interessante constatar-se que um método diagnóstico surgido à beira do leito foi levado à bancada para depois ser novamente transferido para a área clínica, inclusive em estudos randomizados.

Nossos dados são amplamente consistentes com estudos experimentais prévios mostrando que a acumulação de FEEVP, avaliada por USP, é um sinal precoce da cascata de eventos que leva à SDRA (50), e nossos achados estão de acordo com experiência clínica preliminar sugerindo a aplicação potencial das linhas-B da USP na avaliação diagnóstica da SDRA (9).

Em síntese, os resultados deste estudo sugerem que a USP oferece as condições para ser útil em vários outros experimentos, idealmente com uma futura transladação para a área clínica, e em que todos os pacientes em alto risco de desenvolverem SDRA, independentemente dos seus valores de PaO_2/FiO_2 já poderiam auferir benefícios de tratamento mais precoce.

Em estudos prévios em humanos, as linhas-B foram detectadas com transdutores cardíacos de 2,5–7,5 MHz (17), (4), (5), (6), (9), (17).

No presente trabalho um transdutor "vascular" de 7,5- MHz foi usado. Como aparelhos de ultrassom comercialmente disponíveis são equipados com um certo padrão mais ou menos definido de transdutores, a escolha de um deles a um outro é de pouca relevância prática.

No contexto clínico ou experimental ambos são válidos para detectar as linhas-B. Com o transdutor cardíaco, as linhas-B se propagam a partir do mesmo ponto proximal de convergência, com o transdutor "vascular" linear, as linhas-B correm numa maneira paralela à tela, o que faz com que a contagem das linhas-B seja mais fácil (21).

No presente estudo, escolhemos o transdutor linear pois sua frequência maior propicia-nos maior resolução espacial com um melhor delineamento da linha pleural e uma demarcação mais fácil do número de linhas-B em cada hemitórax.

Diagnosticar-se na fase aguda não necessariamente evita lesão pulmonar posterior ao longo do inteiro curso da doença, mas isto poderia propiciar ajustes na estratégia de ventilação que podem realçar a segurança.

Conclusões

Avaliação da presença e número de linhas-B com USP permite detecção de SDRA por AO em ratos, provendo avaliação não invasiva precoce e quantitativa de lesão pulmonar aguda. Comprometimento proeminente com achados histopatológicos semelhantes à SDRA nos grupos AO e AO-a no sacrifício dos ratos foi demonstrada.

Considerações finais

Identificação das linhas-B pela ultrassonografia pulmonar em um modelo de infusão de ácido oleico em ratos de laboratório ocorreu precocemente e houve correlação entre a agressão pulmonar identificada por esta metodologia e a demonstração patológica de lesões de edema intersticial e alveolar e necrose nos animais dos grupos de ácido oleico puro e diluído com albumina bovina, que foram significativamente maiores nestes dois grupos do que em um grupo controle de solução salina infundida. A ocorrência precoce vem de encontro e corrobora perfeitamente experimentos previamente publicados e também concorda com os

achados mais tardios de alterações funcionais das trocas gasosas arteriais previamente salientadas. A aplicabilidade de aparelhos comercialmente disponíveis de ecocardiografia e ecografia com os transdutores disponíveis em animais de pequeno porte estende o uso da metodologia em futuros estudos com este modelo de animais.

Referências

1. Noble WH, Kay JC, Maret KH, Caskanette G. Reappraisal of extravascular lung thermal volume as a measure of pulmonary edema. *J Appl Physiol.* janeiro de 1980;48(1):120–9.
2. Agricola E, Bove T, Oppizzi M, Marino G, Zangrillo A, Margonato A, et al. “Ultrasound comet-tail images”: a marker of pulmonary edema: a comparative study with wedge pressure and extravascular lung water. *Chest.* maio de 2005;127(5):1690–5.
3. Lichtenstein D, Mezière G, Biderman P, Gepner A. The comet-tail artifact: an ultrasound sign ruling out pneumothorax [Internet]. Vol. 25, *Intensive Care Medicine.* 1999. p. 383–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s001340050862>
4. Picano E, Frassi F, Agricola E, Gligorova S, Gargani L, Mottola G. Ultrasound lung comets: a clinically useful sign of extravascular lung water. *J Am Soc Echocardiogr.* março de 2006;19(3):356–63.
5. Jambrik Z, Monti S, Coppola V, Agricola E, Mottola G, Miniati M, et al. Usefulness of ultrasound lung comets as a nonradiologic sign of extravascular lung water. *Am J Cardiol.* 15 de maio de 2004;93(10):1265–70.
6. Frassi F, Gargani L, Gligorova S, Ciampi Q, Mottola G, Picano E. Clinical and echocardiographic determinants of ultrasound lung comets. *Eur J Echocardiogr.* dezembro de 2007;8(6):474–9.
7. Volpicelli G, Elbarbary M, Blaivas M, Lichtenstein DA, Mathis G, Kirkpatrick AW, et al. International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultrasound. *Intensive Care Med.* abril de 2012;38(4):577–91.
8. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* março de 1994;149(3 Pt 1):818–24.
9. Lichtenstein D, Goldstein I, Mourgeon E, Cluzel P, Grenier P, Rouby J-J. Comparative diagnostic performances of auscultation, chest radiography, and lung ultrasonography in acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology.* janeiro de 2004;100(1):9–15.
10. Rubenfeld GD. Epidemiology of acute lung injury. *Crit Care Med.* abril de 2003;31(4 Suppl):S276–84.
11. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 4 de maio de 2000;342(18):1334–49.

12. Gattinoni L, Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri VM, Quintel M, et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 27 de abril de 2006;354(17):1775–86.
13. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury [Internet]. Vol. 149, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994. p. 245–60. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.149.1.8111590>
14. Ma H, Huang D, Zhang M, Huang X, Ma S, Mao S, et al. Lung ultrasound is a reliable method for evaluating extravascular lung water volume in rodents. *BMC Anesthesiol*. 12 de novembro de 2015;15:162.
15. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Larry Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles Internal Medicine 20/E (Vol.1&Vol.2)*,(ebook).McGraw Hill Professional; 2018.
16. Volpicelli G. Lung sonography. *J Ultrasound Med*. janeiro de 2013;32(1):165–71.
17. Lichtenstein D, Mézière G, Biderman P, Gepner A, Barré O. The comet-tail artifact. An ultrasound sign of alveolar-interstitial syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. novembro de 1997;156(5):1640–6.
18. Picano E, Gargani L. Ultrasound lung comets: the shape of lung water. *Eur J Heart Fail*. novembro de 2012;14(11):1194–6.
19. Ang S-H, Andrus P. Lung ultrasound in the management of acute decompensated heart failure. *Curr Cardiol Rev*. maio de 2012;8(2):123–36.
20. Strapazzon G, Hilty MP, Bouzat P, Pratali L, Brugger H, Rauch S. To compare the incomparable: COVID-19 pneumonia and high-altitude disease. *Eur Respir J [Internet]*. junho de 2020;55(6). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01362-2020>
21. Grune J, Beyhoff N, Hegemann N, Lauryn JH, Kuebler WM. From bedside to bench: lung ultrasound for the assessment of pulmonary edema in animal models. *Cell Tissue Res*. maio de 2020;380(2):379–92.
22. Picano E, Scali MC. The lung water cascade in heart failure. *Echocardiography*. outubro de 2017;34(10):1503–7.
23. Dwyer KH, Merz AA, Lewis EF, Claggett BL, Crousillat DR, Lau ES, et al. Pulmonary Congestion by Lung Ultrasound in Ambulatory Patients With Heart Failure With Reduced or Preserved Ejection Fraction and Hypertension. *J Card Fail*. abril de 2018;24(4):219–26.
24. Torino C, Gargani L, Sicari R, Letachowicz K, Ekart R, Fliser D, et al. The Agreement between Auscultation and Lung Ultrasound in Hemodialysis Patients: The LUST Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 7 de novembro de 2016;11(11):2005–11.
25. Pratali L, Cavana M, Sicari R, Picano E. Frequent subclinical high-altitude pulmonary

edema detected by chest sonography as ultrasound lung comets in recreational climbers. *Crit Care Med.* setembro de 2010;38(9):1818–23.

26. Bianchini E, Bruno RM, Di Lascio N, Vezzoli A, Mrakic-Sposta S, Corciu AI, et al. Acute Cardiovascular Adaptation to Strenuous Exercise: An Integrative Ultrasound Study. *J Ultrasound Med.* fevereiro de 2019;38(2):463–70.

27. Platz E, Jhund PS, Girerd N, Pivetta E, McMurray JJV, Peacock WF, et al. Expert consensus document: Reporting checklist for quantification of pulmonary congestion by lung ultrasound in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 19 de julho de 2019;21(7):844–51.

28. Picano E, Ciampi Q, Citro R, D'Andrea A, Scali MC, Cortigiani L, et al. Stress echo 2020: the international stress echo study in ischemic and non-ischemic heart disease. *Cardiovasc Ultrasound.* 18 de janeiro de 2017;15(1):3.

29. Scali MC, Ciampi Q, Picano E, Bossone E, Ferrara F, Citro R, et al. Quality control of B-lines analysis in stress Echo 2020. *Cardiovasc Ultrasound.* 25 de setembro de 2018;16(1):20.

30. Gargani L, Lionetti V, Di Cristofano C, Bevilacqua G, Recchia FA, Picano E. Early detection of acute lung injury uncoupled to hypoxemia in pigs using ultrasound lung comets. *Crit Care Med.* dezembro de 2007;35(12):2769–74.

31. Jambrik Z, Gargani L, Adamicza A, Kaszaki J, Varga A, Forster T, et al. B-lines quantify the lung water content: a lung ultrasound versus lung gravimetry study in acute lung injury. *Ultrasound Med Biol.* dezembro de 2010;36(12):2004–10.

32. Vezzosi T, Mannucci T, Pistoresi A, Toma F, Tognetti R, Zini E, et al. Assessment of Lung Ultrasound B-Lines in Dogs with Different Stages of Chronic Valvular Heart Disease. *J Vet Intern Med.* maio de 2017;31(3):700–4.

33. Hussein HA, Binici C, Staufenbiel R. Comparative evaluation of ultrasonography with clinical respiratory score in diagnosis and prognosis of respiratory diseases in weaned dairy buffalo and cattle calves. *Hanguk Tongmul Chawon Kwahakhoe Chi.* 3 de dezembro de 2018;60:29.

34. Corradi F, Ball L, Brusasco C, Riccio AM, Baroffio M, Bovio G, et al. Assessment of extravascular lung water by quantitative ultrasound and CT in isolated bovine lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 1^o de julho de 2013;187(3):244–9.

35. Baudendistel L, Shields JB, Kaminski DL. Comparison of double indicator thermodilution measurements of extravascular lung water (EVLW) with radiographic estimation of lung water in trauma patients. *J Trauma.* dezembro de 1982;22(12):983–8.

36. Rossi P, Wanecek M, Rudehill A, Konrad D, Weitzberg E, Oldner A. Comparison of a

single indicator and gravimetric technique for estimation of extravascular lung water in endotoxemic pigs. *Crit Care Med.* maio de 2006;34(5):1437–43.

37. Picano E. Sustainability of medical imaging. *BMJ.* 6 de março 2004;328(7439):578–80.

38. Bedetti G, Gargani L, Corbisiero A, Frassi F, Poggianti E, Mottola G. Evaluation of ultrasound lung comets by hand-held echocardiography. *Cardiovasc Ultrasound.* 31 de agosto de 2006;4:34.

39. Bouhemad B, Zhang M, Lu Q, Rouby J-J. 10.1186/cc5668 [Internet]. Vol. 11, *Crit Care.* 2007. p. 205. Disponível em:

<http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc5668>

40. Borges AM, Ferrari RS, Thomaz LDGR, Ulbrich JM, Félix EA, Silvello D, et al.

Challenges and perspectives in porcine model of acute lung injury using oleic acid. *Pulm Pharmacol Ther.* dezembro de 2019;59:101837.

41. Pan L, Yao D-C, Yu Y-Z, Li S-J, Chen B-J, Hu G-H, et al. Necrostatin-1 protects against oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 de setembro de 2016;478(4):1602–8.

42. Dickey BF, Thrall RS, McCormick JR, Ward PA. Oleic-acid-induced lung injury in the rat. Failure of indomethacin treatment or complement depletion to ablate lung injury. *Am J Pathol.* junho de 1981;103(3):376–83.

43. Salman AE, Yetişir F, Kılıç M, Onal O, Dostbil A, Zeybek D, et al. The impact of pretreatment with bolus dose of enteral glutamine on acute lung injury induced by oleic acid in rats. *J Anesth.* junho de 2014;28(3):354–62.

44. Li X, Liu Y, Wang Q, Zhu Y, Lv X, Liu J. A novel and stable “two-hit” acute lung injury model induced by oleic acid in piglets. *Acta Vet Scand.* 30 de março de 2009;51:17.

45. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol.* outubro de 2005;33(4):319–27.

46. Xu Z, Huang Y, Mao P, Zhang J, Li Y. Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators Inflamm.* 1^o de novembro de 2015;2015:205054.

47. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome [Internet]. Vol. 33, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2005. p. 319–27. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.f305>

48. Neumann P, Berglund JE, Mondéjar EF, Magnusson A, Hedenstierna G. Effect of Different Pressure Levels on the Dynamics of Lung Collapse and Recruitment in Oleic-Acid-induced Lung Injury [Internet]. Vol. 158, *American Journal of Respiratory and*

Critical Care Medicine. 1998. p. 1636–43. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.158.5.9711095>

49. Borges JB, Okamoto VN, Matos GFJ, Caramez MPR, Arantes PR, Barros F, et al.

Reversibility of lung collapse and hypoxemia in early acute respiratory distress syndrome.

Am J Respir Crit Care Med. 1^o de agosto de 2006;174(3):268–78.

50. Hedlund LW, Vock P, Effmann EL, Putman CE. Morphology of oleic acid-induced lung injury. Observations from computed tomography, specimen radiography, and histology.

Invest Radiol. janeiro de 1985;20(1):2–8.

51. Sakka SG, Klein M, Reinhart K, Meier-Hellmann A. Prognostic value of extravascular lung water in critically ill patients. *Chest.* dezembro de 2002;122(6):2080–6.

52. Agricola E, Picano E, Oppizzi M, Pisani M, Meris A, Fragasso G, et al. Assessment of stress-induced pulmonary interstitial edema by chest ultrasound during exercise echocardiography and its correlation with left ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr.* abril de 2006;19(4):457–63.

53. Rello J, Storti E, Belliato M, Serrano R. Clinical phenotypes of SARS-CoV-2:

implications for clinicians and researchers. *Eur Respir J* [Internet]. maio de 2020;55(5).

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01028-2020>