

FLÁVIO AUGUSTO FLÓRIO STILLITANO DE ORGAES

MODELO EXPERIMENTAL DE INFUSÃO RÁPIDA
DE CRISTALOIDE EM RATOS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Orgaes, Flávio Augusto Flório Stillitano de.

Modelo experimental de infusão rápida de cristalóide em ratos / Flávio Augusto Flório Stillitano de Orgaes. – Botucatu : [s.n], 2013

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2013

Orientador: Fausto Viterbo

Capes: 40102149

1. Edema pulmonar - Modelos animais. 2. Pulmões - Doenças. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Hidratação. 5. Hemodiluição.

Palavras-chave: Edema pulmonar; Hemodiluição; Hidratação; Modelos animais; ratos.

Flávio Augusto Flório Stillitano de Orgaes

Modelo Experimental de Infusão Rápida de Cristaloide em Ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

Comissão Examinadora

Prof. Dr.

Universidade

Prof. Dr.

Universidade

Prof. Dr.

Universidade

Botucatu, ____ de _____ de _____ .

Flávio Augusto Flório Stillitano de Orgaes, médico, brasileiro, nascido em Sorocaba, SP, em 1978. Cirurgião Plástico da Clínica Medici Cirurgia Plástica, do Conjunto Hospitalar de Sorocaba-SP e da Unidade de Tratamento de Queimados de Itu-SP. Formado em 2001 pela Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (SP). Aprovado no concurso de Oficial Médico temporário do Exército Brasileiro em 2002. Atuou na carreira militar por um ano, assumindo a reserva em 2003 no posto de 2º tenente. Fez residência médica em Cirurgia Geral na Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (Sorocaba-SP), concluída em 2005. Fez estágio em Cirurgia Plástica na Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (Sorocaba-SP), concluído em 2008. Aprovado em concurso público estadual em Cirurgia Plástica em 2010. É membro associado da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica e membro titular da Sociedade Brasileira de Queimaduras.

Dedicatoria



*Aos meus pais
Waldemar e Regina,
que estiveram sempre ao meu lado,
acreditando e apoiando na realização dos meus sonhos.*

Agradecimentos



Ao meu orientador Dr. Fausto Viterbo, que confiou a mim a realização desta pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos, a disposição para ensinar e a transmissão da essência do espírito científico.

À minha namorada Juliana, que, além do apoio pessoal, participou de maneira determinante em todas as etapas deste trabalho. É impossível estimar a dimensão de sua contribuição.

À Dra. Mariângela Marques, que me orientou e auxiliou em todo o processo de avaliação histológica, dedicando sempre muita atenção.

Ao Prof. José Corrente, pela orientação e auxílio em toda a avaliação estatística.

Ao Dr. Paulo Nascimento, pela contribuição no campo da anestesiologia.

Ao Dr. Flávio Mendes, pela contribuição intelectual na redação final desta dissertação.

À Dra. Cilmery Kurokawa, pela autorização de uso de equipamentos do Laboratório de Pediatria.

Ao meu primo Renato Flório Yabiku, pelo auxílio na execução dos procedimentos em todos os animais.

À equipe do Laboratório de Cirurgia Experimental da FMB, em especial ao Bardella, pela paciência, simpatia e colaboração em todo o tempo de convivência.

Aos professores e colegas de Botucatu que convivi durante o desenvolvimento desta pesquisa, que de alguma maneira contribuíram com meu êxito.

À minha equipe da clínica, colegas de trabalho, amigos e pacientes, por toda compreensão e apoio durante o período de desenvolvimento desta dissertação.

Resumo



ORGAES, F.A.F.S. **Modelo experimental de infusão rápida de cristalóide em ratos**. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Foi descrito um modelo experimental de estudo de infusão rápida de cristalóide em ratos, discutindo-se os resultados clínicos, laboratoriais e histológicos obtidos com a administração de diferentes volumes. Utilizou-se 56 ratos machos da linhagem Wistar com peso médio de 318 g (± 4), divididos aleatoriamente em sete grupos de oito animais. Os animais dos grupos 1 ao 6 receberam solução de Ringer com lactato por via intravenosa, de maneira rápida (25 ml/min), no volume correspondente a 50%, 100%, 150%, 200%, 250% e 300% da volemia (V), respectivamente, formando os grupos de estudo. Os ratos do grupo 0 foram operados da mesma forma, mas não receberam o cristalóide, constituindo o grupo controle (SHAM). A avaliação laboratorial do sangue e dos sinais clínicos foram realizados em dois tempos (antes e dez minutos após a infusão líquida). A avaliação gravimétrica do edema pulmonar (EP) foi feita com o pulmão esquerdo e a histológica com o pulmão direito, ambos extraídos após eutanásia. As variáveis que apresentavam dois tempos foram analisadas através da diferença entre os momentos, comparando com o grupo controle por uma análise de variância, seguido do teste de Dunnet. As análises do índice pulmonar (IP), seco-úmido (ISU), histologia e desfecho foram realizadas utilizando uma análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi fixado em 5%. Os sinais clínicos apresentaram alteração significativa a partir da hidratação com volume correspondente a 2 vezes a V. A queda na taxa de hematócrito foi significativa nos 6 grupos de estudo, confirmando a eficácia do método na promoção de hemodiluição. Os exames laboratoriais de sangue apresentaram-se alterados a partir da infusão de volume igual à V. O EP foi bem caracterizado pelo método gravimétrico e histológico após infusão de líquido de 2,5 vezes a V. A parada respiratória foi observada a partir da hidratação com 1,5 vez a V. O volume de infusão letal a todos os animais foi de 3 vezes a V. O modelo experimental descrito foi de simples execução, gerando dados objetivos, podendo ser aplicado em estudos que envolvam hemodiluição, hidratação com cristalóides e hipervolemia.

Palavras-chave: hidratação; hemodiluição; edema pulmonar; modelos animais; ratos.

Abstract



ORGAES, F.A.F.S. **Animal model of rapid crystalloid infusion in rats.** 2013. 90f.
Thesis (Master) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista,
Botucatu, 2013.

It was described an animal model study of crystalloid rapid infusion in rats, discussing the clinical, laboratorial and histological results acquired with the administration of various amounts. Fifty six male Wistar rats were used with a medium weight of 318 ($\pm$ 4) grams, divided randomly in seven groups of eight animals. The rats of groups 1 to 6 received lactated Ringer's solution intravenously, in a rapid way (25 ml/min), in the amount of 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 fold its blood volume (BV), respectively, composing the study groups. The rats of group 0 were submitted to surgery the same way, but did not receive the crystalloid, composing the control group (SHAM). The laboratorial evaluation of blood and the clinical signs were made in two times (before and ten minutes after the fluid infusion). The gravimetric assessment of pulmonary edema (PE) was made with the left lung and the histological assessment with the right lung, both extracted after euthanasia. The data with two distinct times were analyzed through the difference between the moments, comparing to the control group with an analysis of variance, followed by Dunnett's test. The evaluation of the lung wet weight/body weight ratio (LW/BW), the lung wet/dry weight ratio (W/D), histology and upshot were performed by an analysis of variance (ANOVA). The findings were significant at the 0.05 level. The clinical signs significantly changed in the 2, 2.5 and 3 fold BV groups. The hematocrit reduction was significant in the six study groups, corroborating the method effectiveness to promote hemodilution. The laboratorial blood exams significantly changed from 1 fold BV group. The PE was clearly identified by the gravimetric and histological assessment in the 2.5 and 3 fold BV. The respiratory arrest was observed in the 1.5, 2, 2.5 and 3 fold BV groups. The volume of 3 fold BV was lethal to all animals of the group. This animal model was easily performed generating consisting data and may be applied in further researches of hemodilution, fluid therapy with crystalloids and fluid overload.

Key word: fluid therapy; hemodilution; pulmonary edema; models, animal; rats.

Sumário



RESUMO	
ABSTRACT	
SUMÁRIO.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Modelo experimental	23
1.2 Alterações do equilíbrio hidroeletrolítico	25
1.3 Hidratação do paciente cirúrgico	29
OBJETIVO	33
MÉTODO	35
RESULTADOS	49
4.1 Parâmetros clínicos e oximetria de pulso	50
4.2 Exames hematológicos	52
4.3 Avaliação gravimétrica do edema pulmonar	58
4.4 Avaliação histológica do edema pulmonar	60
4.5 Desfecho	65
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	81
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	89

Lista de abreviaturas

bpm =	batimentos por minuto
cm =	centímetro (s)
cmH ₂ O =	centímetros de água
DC =	débito cardíaco
DP =	desvio-padrão
EP =	edema pulmonar
<i>et al.</i> =	e colaboradores
FC =	frequência cardíaca
FR =	frequência respiratória
G =	grupo
g / Kg =	grama (s) / kilograma (s)
HAD =	hormônio antidiurético
IP =	índice pulmonar
ipm =	incursões por minuto
ISU =	índice seco-úmido
IV =	intravenoso (a)
LEC =	líquido extracelular
LIC =	líquido intracelular
mEq =	miliequivalente (s)
ml / dl / l =	mililitro (s) / decilitro (s) / litro (s)
mmHg =	milímetros de mercúrio
MPS =	massa do pulmão seco (em gramas)
MPU =	massa do pulmão úmido (em gramas)
MR =	massa corporal do rato (em gramas)
OP =	oximetria de pulso
RL =	Ringer com lactato
UI =	unidade (s) internacional (internacionais)
VE =	volume de ejeção
Vi =	volume de infusão

Introdução



Há muito tempo, antes da clássica descrição de William Harvey da circulação corpórea, curadores de várias culturas faziam especulações sobre a natureza da circulação do sangue no homem. Na Mesopotâmia, o fígado representava o centro da vida. O compêndio médico de Nei Ching, na antiga China, descrevia que "o sangue está sob controle do coração e flui em um círculo que nunca para". Aristóteles acreditava que o sangue era produzido no coração e distribuído aos tecidos. Galeno dizia que o fígado produzia o sangue, e este era movido adiante e para trás até ser consumido; esta teoria perdurou por muitos anos (*apud* Barsoum & Kleeman, 2002).

A primeira alusão à terapia intravenosa (IV) é encontrada provavelmente na clássica história dos Argonautas. Ovidius, um poeta romano, relata que a princesa Medea rejuvenesceu o pai de seu marido, Aeson, com uma poção mágica. Ela havia cortado a garganta do idoso, esvaziando as veias e preenchendo-as com sua poção. Em 1492, o então doente Papa Inocêncio VIII recebeu "transfusão" de sangue de três jovens saudáveis na tentativa de salvar sua vida, mas todos morreram. Embora algumas referências descrevam este episódio como a primeira transfusão sanguínea, a maioria dos textos acredita que o sangue foi dado por via oral, como de costume na época (*apud* Barsoum & Kleeman, 2002).

Francis Folly, um médico de Florença, reivindica em 1654 ter sido o primeiro a executar uma transfusão bem sucedida de animal para animal, porém seu trabalho nunca foi publicado. A primeira descrição de infusão IV é de 1656, quando Sir Christopher Wren, arquiteto londrino, relata "um meio de introduzir veneno líquido no sangue". Ele desenvolveu um tubo e um reservatório elástico para instilar vinho, cerveja, ópio e uma solução com antimônio nas veias de um cachorro. A obtenção de um cão intoxicado foi interpretada como sucesso da experiência. Alguns anos depois, em 1662, Johann D. Major, um médico alemão, injetou um composto não purificado na

veia de um homem. O desfecho infeliz influenciou negativamente a sociedade, não havendo outras tentativas de acesso venoso por muito tempo (*apud* Barsoum & Kleeman, 2002).

O primeiro relato de infusão bem sucedida de líquido IV remonta ao século XIX, mais precisamente 1832. O cenário era a Inglaterra, que observava, com horror e pânico, o avanço inexorável da pandemia de cólera da Índia para a Ásia e Europa. Sem ter conhecimento da etiologia da doença, nem do caráter infeccioso, os profissionais de saúde ingleses tentavam executar diferentes abordagens com a intenção de impedir o aumento do número de mortes. Alguns se destacaram demonstrando um pouco de conhecimento científico. Surgiu a ideia que a grande perda de líquido dificultaria a circulação do sangue, e foi sugerida a introdução forçosa de água no estômago; o que não surtiu o efeito desejado devido ao grande índice de vômitos. Um médico, analisando o sangue dos pacientes doentes, observou que havia aumento da coloração e queda na quantidade de água. Foi quando William Brooke O'Shaughnessy, um médico recém formado, descreveu que a proporção de volume e sais do sangue estavam alterados no paciente doente, e para melhora do mesmo, estes itens deveriam ser corrigidos. Fazendo uso desta publicação, Thomas Latta e Robert Lewins, em 1832, realizaram e publicaram a descrição do primeiro acesso venoso com administração de uma solução de sais com água. A técnica foi utilizada em 25 pacientes moribundos, um terço deles sobreviveu à cólera. Seu feito não mudou a história da epidemia, que ainda se alastrou pela América, mas certamente tornou-se um marco na medicina moderna (*apud* Cosnett, 1989)

Em 1876, Sidney Ringer propôs uma solução fisiológica para perfusão à base de sódio, potássio, cloreto e cálcio. Inicialmente, sua solução era usada em laboratórios de fisiologia para banhar corações extraídos de sapos. A fórmula original

de sais inorgânicos foi posteriormente modificada por Alexis Hartmann, adicionando o lactato com o intuito de tratar acidose em crianças. Cento e trinta anos depois, a solução de Ringer com lactato (RL) continua sendo uma das soluções de infusão mais utilizadas no mundo em inúmeras situações, tais como no controle de hidratação do paciente cirúrgico (*apud Rivera et al.*, 2005).

Historicamente, o foco das pesquisas de hidratação intraoperatória estava na escolha do fluido, e mais recentemente começaram a surgir algumas evidências científicas acerca da quantidade de fluido a ser administrada. Séries de casos mostrando resultados positivos no uso de grandes volumes de líquido no trauma mudaram o paradigma da cirurgia eletiva do "regime restritivo", como amplamente recomendado até 1950, para o "regime liberal", praticado até hoje. Entretanto, a fisiopatologia e as implicações clínicas dos diferentes regimes de administração de fluidos para a cirurgia eletiva ainda não foram adequadamente descritos, o que dificulta o desenvolvimento de *guidelines* (Holte *et al.*, 2002).

Adicionalmente, a infusão rápida de cristaloides tem aplicação clínica além do controle anestésico do paciente, pois gera um outro fenômeno também muito estudado: a hemodiluição (Messmer, 1975). Esta técnica já demonstrou ser eficaz na prevenção de trombose de microanastomoses vasculares (Farina *et al.*, 2002) e, possivelmente, pode beneficiar pacientes na prevenção de tromboembolia pulmonar em cirurgias plásticas (Viterbo & Siclovan, 2006).

1.1 Modelo experimental

Modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos como a materialização da realidade, com a representação mais próxima da ideal. Por isso, devem ser precisos, apresentar embasamento científico e a limitação em relação à realidade a ser representada. Nas ciências médicas, os modelos experimentais podem ser aplicados no melhor conhecimento da fisiologia, da ação de medicamentos e dos efeitos de procedimentos cirúrgicos ou anestésicos. Sua maior importância está relacionada ao respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em *anima nobile* (Ferreira *et al.*, 2005).

Os cuidados pré-anestésicos de roedores incluem revisão do aspecto físico e nutricional do animal. A água via oral não deve ser restringida. A administração parenteral do agente constitui o método mais comum de anestesia. O volume da droga, o local da administração e propriedades irritantes das substâncias devem ser considerados (Damy *et al.*, 2010).

O protocolo mais seguro e recomendado para ratos é a associação da Cetamina 75 - 100 mg/kg à Xilazina 5 - 10 mg/kg, por via intraperitoneal, capaz de produzir 60 a 100 minutos de anestesia. Suas aplicações mais comuns nestes animais são nas lesões e injeções cerebrais, cateterizações arteriais ou venosas e castrações (John Hopkins University, 2012).

A anestesia deve ser realizada, em animais de laboratório, sempre que o procedimento implique em dor ou desconforto, sendo utilizadas drogas anestésicas, analgésicas, tranquilizantes e a eutanásia. A profundidade anestésica pode ser avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda,

reflexo palpebral e corneal, e das alterações das frequências cardíaca e respiratória, que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia) (Taborda *et al.*, 2004).

O estudo da lesão pulmonar pode envolver desde pequenos achados de edema sem lesão celular até destruições maciças do pulmão. O tamanho reduzido dos ratos e camundongos limita o número de técnicas que podem ser aplicadas na identificação da lesão. Os métodos de avaliação incluem medidas subjetivas e não específicas de quantificação do edema, até técnicas para calcular valores de coeficiente de permeabilidade específica da membrana microvascular nos pulmões. O acúmulo de edema pulmonar (EP) pode ser medido de maneira fácil e objetiva utilizando os métodos gravimétricos, indicando o desequilíbrio das forças que atuam sobre a barreira endotelial. A complacência pulmonar também pode ser aferida, e as microscopias óptica e eletrônica podem ajudar na identificação do edema e danos estruturais (Parker & Townsley, 2004).

A microscopia óptica do pulmão pode gerar evidências qualitativas do dano pulmonar, edema, transbordamento de alvéolos, espessamento dos septos alveolares e compressão de vias aéreas (Parker & Townsley, 2004). O EP inicia-se no tecido conjuntivo perivascular, peribrônquico, seguindo para o interstício. Ele é resultado do desequilíbrio das forças de Starling na barreira endotelial dos capilares pulmonares. O transbordamento alveolar ocorre quando a água extravascular do tecido pulmonar aumenta mais de 35%, e não ocorre de maneira homogênea pelo pulmão (Wu *et al.*, 1995).

Leal Filho *et al.* (2005) estudaram a presença de EP neurogênico após lesão da medula espinhal em ratos. O resultado foi avaliado através de método

gravimétrico e histológico. Na histologia, o critério adotado foi a contagem de alvéolos que continham líquido eosinofílico em seu interior, em cada lâmina.

A morte do animal de laboratório pode ocorrer de maneira previsível (indução, eutanásia) ou imprevisível em um experimento, sendo importante sua precisa identificação. A parada respiratória, ausência de pulsos, perda da coloração ocular e do reflexo corneal são indicativos do óbito (Conselho Federal De Medicina Veterinária, 2012).

1.2 Alterações do equilíbrio hidroeletrolítico

A água desempenha papel fundamental no metabolismo do organismo, correspondendo em média a 60% do peso do homem adulto normal. O líquido intracelular (LIC) corresponde a aproximadamente 40% do peso do homem adulto, e o restante (20%) é de líquido extracelular (LEC). Este espaço é dividido em intravascular (5%) e intersticial (15%) (Ceneviva & Vicente, 2008).

A água e os eletrólitos estão em equilíbrio entre os compartimentos, separados por membranas semipermeáveis. Os principais eletrólitos catiônicos são o sódio e o potássio, e os aniônicos o bicarbonato e o cloreto. Há também uma neutralidade elétrica em cada compartimento somando os íons positivos e negativos. O desequilíbrio deste sistema por algum motivo (traumático, cirúrgico ou infeccioso) pode levar à criação do terceiro espaço. Isto ocorre temporariamente, até a etiologia ser sanada e o líquido resgatado para o espaço intravascular. As trocas entre o plasma e o interstício dependem do gradiente entre a pressão hidrostática e a pressão coloidosmótica nos capilares (lei do equilíbrio de Gibbs Donnan). As alterações

hidroeletrolíticas iniciam-se sempre no compartimento extracelular e podem ou não repercutir em alterações do intracelular (Kurbel & Maric, 2009).

Fisiologicamente, a super-hidratação significa excesso de entrada de líquidos e/ou deficiência na saída. Pode ser instalado edema em todos os tecidos, como pulmão, rim, subcutâneo, além da criação do terceiro espaço (derrame pleural e ascite). O aumento progressivo deste edema pode gerar extravazamento de líquido para a luz dos órgãos, sendo mais evidente no pulmão com a presença de líquido intersticial dentro dos alvéolos. Este estado é caracterizado laboratorialmente pela diminuição na taxa de hemoglobina, hematócrito e proteínas no sangue. A super-hidratação isotônica é caracterizada pelo acúmulo de líquido no organismo. Pode ocorrer devido à falência hepática, insuficiência cardíaca e/ou renal. Há um aumento de volume apenas do espaço extracelular devido à manutenção do equilíbrio de tonicidade. O tratamento pode envolver restrição de líquidos, uso de diuréticos, cardiotônicos e eventualmente diálise. A super-hidratação hipotônica ocorre na excessiva ingestão de água ou administração parenteral de soro com glicose associado à baixa diurese. O aumento do espaço extracelular com queda da tonicidade gera migração de água para o intracelular, aumentando este também. O tratamento é feito basicamente com a restrição hídrica e administração de soluções hipertônicas. A super-hidratação hipertônica ocorre apenas iatrogenicamente se houver infusão excessiva de solução hipertônica (Ceneviva & Vicente, 2008).

A desidratação é decorrente da deficiência na entrada e/ou excesso na saída de líquidos. Pode ser classificada em hipotônica, isotônica e hipertônica. Laboratorialmente pode-se encontrar aumento na taxa de hemoglobina, hematócrito, proteínas totais, uréia e creatinina no sangue. A quantidade de sódio define a classificação da desidratação. A desidratação isotônica ocorre na perda de líquidos

isotônicos como diarreia e vômitos. Há em geral diminuição apenas do espaço extracelular, por ser isotônica, não há troca entre os compartimentos. O tratamento consiste na administração de soluções isotônicas. A desidratação hipotônica ocorre nos indivíduos que apresentam perda de líquido, mas principalmente de sais. Com a diminuição da concentração de eletrólitos no extracelular, a água tende a se deslocar para o espaço intracelular, alcançando o equilíbrio eletrolítico, porém aumentando o volume intracelular. O tratamento pode ser feito com soluções isotônicas na hipotonicidade leve ($Na > 120 \text{ mEq/l}$) ou soluções hipertônicas no caso de hipotonicidade mais acentuada. A desidratação hipertônica é caracterizada pela perda predominante de água, com preservação dos sais. O aumento na concentração de eletrólitos no extracelular favorece o deslocamento de água a partir do intracelular, diminuindo este espaço. O tratamento baseia-se na administração de soluções hipotônicas e posteriormente isotônicas (Ceneviva & Vicente, 2008).

O sódio é o principal cátion do LEC com concentração normal entre 135-145 mEq/l. A hiponatremia consiste na taxa de sódio inferior a estes parâmetros. Ela é dividida em absoluta e dilucional. A absoluta normalmente ocorre por ingestão insuficiente do íon, patologia renal ou uso de algumas drogas. A dilucional é resultado de uma terapia de hidratação inadequada. A correção da hiponatremia dilucional é feita através da eliminação do excesso de água; a reposição de sódio é indicada apenas quando a concentração sérica reduz abaixo de 110 mEq/l. A hipernatremia é menos frequente e ocorre quando a perda hídrica é maior que a salina. A hipernatremia grave é considerada na concentração maior que 160 mEq/l. A correção envolve o tratamento da patologia de base e administração de soro com glicose a 5% (Ceneviva & Vicente, 2008).

O cloro é o principal ânion do LEC com concentração normal entre 95-105 mEq/l. Suas alterações geralmente acompanham o sódio, por isso a hiponatremia pode também ser classificada em absoluta ou dilucional. O tratamento é feito com eliminação do excesso de água, e o íon deve ser repostado quando a concentração for menor que 80 mEq/l. A hipercloremia tem as mesmas causas da hipernatremia. O tratamento específico com soro glicosado a 5% é indicado em concentrações séricas de cloro superiores a 125 mEq/l (Ceneviva & Vicente, 2008).

O potássio é o principal cátion do LIC. Sua concentração no extracelular varia de 3,5-5,0 mEq/l. A hipocalemia é causada pela entrada insuficiente do íon ou saída excessiva, normalmente em pacientes portadores de patologia gastroenterológica, renal, ou em uso de diuréticos perdedores de potássio. É recomendada a reposição do potássio em concentrações inferiores a 3 mEq/l, sempre lentamente para evitar complicações cardíacas. A insuficiência renal é a principal causa de hipercalemia, podendo ocorrer também ou ser agravada quando associado à Doença de Addison, estado de acidose e situações em que haja grande dano celular como hemólise, trauma e cirurgia. A intervenção tem indicação de acordo com a etiologia do desequilíbrio, normalmente sendo a partir dos 5,5 mEq/l. O tratamento ideal é a diálise, mas há outros meios como gluconato de cálcio (neutraliza a ação do potássio na fibra muscular cardíaca), bicarbonato de sódio (pacientes com acidose), solução polarizante (redistribuição do potássio) e resinas de trocas iônicas (extração do potássio das secreções intestinais) (Ceneviva & Vicente, 2008).

1.3 Hidratação do paciente cirúrgico

O estresse cirúrgico leva à liberação de aldosterona e hormônio antidiurético (HAD), e com isso à oligúria e retenção de sódio. O baixo débito urinário é normalmente acentuado pelo jejum do paciente nas cirurgias eletivas. Além disso, o trauma cirúrgico tende a minimizar ainda mais o LEC sequestrando líquido para o terceiro espaço. A queda do volume extracelular gera redução na perfusão justa glomerular, o que estimula a produção de renina e depois angiotensina e aldosterona. Por outro lado, a diminuição da pressão no átrio esquerdo (hipovolemia) estimula a liberação de HAD pelo sistema hipotálamo-hipofisário. Todo esse sistema pode ser interrompido com uma hidratação intraoperatória adequada (Ceneviva & Vicente, 2008).

Não é possível na prática estimar com precisão, durante o ato operatório, as perdas por exposição de vísceras nem a perda interna no terceiro espaço, o que prejudica a estimativa do volume da solução a ser administrada. Infunde-se geralmente de 2 a 10 ml de solução salina por quilo de peso corporal por hora de cirurgia, o que pode induzir em erros, resultando em desidratação ou super-hidratação graves, sobretudo em pacientes criticamente doentes. O rim normal pode corrigir o excesso de água e de eletrólitos, mas dentro de determinados limites (Ceneviva & Vicente, 2008).

A hidratação com sobrecarga hidrossalina tem o objetivo de bloquear ou reduzir a liberação do HAD e aldosterona, interferindo na resposta do organismo ao trauma (cirurgia). Também é capaz de reduzir a incidência de alcalose metabólica no pós-operatório quando comparada com os outros métodos de hidratação (restritivo e de

reposição conforme balanço), uma vez que do 1º ao 3º dia pós-cirurgia a alcalose metabólica é a alteração predominante do equilíbrio ácido-base (Moriya *et al.*, 2000).

Possivelmente a rápida infusão de fluido IV é efetiva em estados hipovolêmicos, mas infusões lentas são mais apropriadas quando se deseja aumentar o volume plasmático em pacientes normovolêmicos, como na indução da anestesia geral. Não há dúvidas que o melhor entendimento dos efeitos dos diferentes regimes de infusão beneficiará o manejo hídrico intraoperatório, principalmente nos pacientes mais críticos (Kramer *et al.*, 2001).

Olsson *et al.* (2004) estudaram a distribuição e eliminação da infusão IV de 20 ml/Kg de RL (1500 ml em média) durante 60 minutos em colecistectomias laparoscópicas. Seus dados mostraram que a meia-vida do cristalóide nos pacientes foi 17 vezes maior que a meia-vida de diluição do plasma, indicando uma forte tendência de formação de edema periférico. Sugeriram que a infusão líquida inicial deve ser rápida na cirurgia e lenta mais tardiamente. Esta estratégia pode criar uma diluição constante do plasma sem o acúmulo indesejado de líquido nos tecidos.

Shires *et al.* (2005) estudaram a infusão rápida de algumas soluções cristalóides em ratos e seus efeitos sobre a apoptose celular. Observaram que o índice de apoptose é significativamente maior em animais submetidos a choque hemorrágico, e que a infusão rápida de líquidos para ressuscitação diminui o dano celular durante o choque.

Svensen *et al.* (2009) estudaram o efeito da infusão rápida de 15 ml/Kg de RL em quinze voluntários. A análise da cinética dos fluídos mostrou que o volume intravascular arterial começou a diminuir após quatorze minutos, enquanto que o venoso após vinte minutos. Concluíram que a expansão plasmática da solução de RL dura até

30 minutos, e que a distribuição para os tecidos depende de componentes pressóricos, permeabilidade capilar e da diferença de perfusão tecidual nos órgãos e regiões corporais.

A reposição da perda sanguínea com cristaloides ou coloides é empírica devido à falta de acurácia no cálculo da perda e à limitação dos métodos usados na estimativa do volume necessário. As relações mais comumente utilizadas de volume de cristalóide para perda sanguínea são de 3:1 e 5:1. Entretanto, dados experimentais frequentemente diferem de cálculos teóricos. Em animais, a relação 3:1 torna-se progressivamente menos adequada com a evolução da hemorragia, porém alguns dados clínicos sugerem que uma relação inferior a 3:1 pode ser suficiente em algumas circunstâncias (Svensen *et al.*, 2009).

Shires foi o primeiro a afirmar que a reposição do sangue por si só não é suficiente na hemorragia severa e no trauma. Postulou que uma porção do líquido intersticial seria inviável funcionalmente, e teria que ser repostado com soluções balanceadas de sais. O termo "perda para o terceiro espaço" mantém-se controverso, e vem sendo discutido há anos. Parece que é mais apropriado dizer que o que foi investigado no choque hemorrágico pode não ser válido para os casos eletivos (Svensen *et al.*, 2009).

Jacob *et al.* (2012) estudaram a hemodiluição isovolêmica em mulheres submetidas a histerectomia por câncer de colo de útero. Utilizaram marcadores para medir a volemia antes e depois da hemodiluição utilizando uma relação de 3:1 de RL. Observaram que esta relação utilizada foi incapaz de manter a volemia normal, e o principal efeito colateral foi o notável acúmulo de líquido intersticial. Recomendaram a substituição do sangue por cristaloides na proporção de 5:1 e o uso de uma solução iso-

oncótica (albumina humana 20%) no caso de sangramento agudo em paciente que necessite de prevenção rigorosa de edema (Jacob *et al.*, 2012).

Sendo assim, neste estudo serão descritas as alterações clínicas e fisiológicas da administração intravenosa rápida de diferentes volumes de solução de Ringer com lactato, através de um novo modelo experimental.

Objetivo

Descrever um modelo experimental de infusão intravenosa rápida em ratos, utilizando diferentes volumes de solução de Ringer com lactato, discutir os resultados clínicos, laboratoriais e histológicos encontrados, bem como o volume letal.

Método

Foram utilizados 56 ratos Wistar machos, adultos, de linhagem heterogênea, com peso variando de 280 g a 360 g, com média de 318 g (± 4), provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Todos os ratos foram alimentados com ração padronizada e água, sem restrição, até o momento da anestesia.

O protocolo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP sob protocolo nº 799 de 28 de abril de 2010 (Anexo 1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos. Todos os ratos foram submetidos à infusão IV rápida de solução de RL conforme o grupo ao qual pertenciam. O volume de cristalóide infundido variou proporcionalmente à massa corporal de cada animal, com aumento correspondente a 50% da volemia original entre um grupo e outro, seguindo a fórmula: $V_i = MR \times G \times 0,027$. Onde V_i é o Volume de infusão (ml), MR é o Peso do rato (g), G é o número do grupo e 0,027 é a constante correspondente à metade da volemia por grama de massa corporal (ml/g). A volemia estimada do rato foi considerada como 5,4 ml / 100g de peso (Hirano *et al.*, 2003). No G 0 não houve hidratação ($V_i = 0$) constituindo o controle (SHAM). As médias de volume administrado e de peso dos animais de cada grupo podem ser observadas com mais detalhes na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos com seus respectivos volumes de hidratação.

Grupo	n	Peso (g)	Volume de infusão (ml)
		$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
0 (SHAM)	8	327 $\pm$ 26	0
1 (50% V)	8	309 $\pm$ 26	8,3 $\pm$ 0,7
2 (100% V)	8	325 $\pm$ 24	17,6 $\pm$ 1,3
3 (150% V)	8	311 $\pm$ 23	25,2 $\pm$ 1,8
4 (200% V)	8	317 $\pm$ 25	34,2 $\pm$ 2,7
5 (250% V)	8	315 $\pm$ 24	42,5 $\pm$ 3,2
6 (300% V)	8	326 $\pm$ 25	52,7 $\pm$ 4

V = volemia do rato; n = número de animais em cada grupo; $\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão

A mesa de cirurgia foi montada com instrumental cirúrgico delicado, dois cateteres de 24 gauges do tipo *Abbocath®*, duas seringas de plástico de 1 ml, três seringas de plástico de 20 ml e um frasco de Ringer com lactato. As seringas de 1 ml foram heparinizadas aspirando e desprezando em seguida uma solução de heparina a 5000 UI/ml. Com as seringas de 20 ml aspirou-se o volume de RL correspondente ao rato tratado.

Cada animal foi anestesiado com administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina a 80 mg/Kg e xilazina a 5 mg/Kg, individualmente, imediatamente antes da realização do procedimento. Durante todo o experimento o animal permaneceu sem suporte adicional de oxigênio, respirando apenas em ar ambiente. Após a anestesia foi realizada tricotomia com aparelho elétrico em toda face

ventral do animal. O posicionamento foi em decúbito dorsal sobre uma placa emborrachada rígida com o segmento cefálico voltado para o cirurgião. As duas patas dianteiras e a pata traseira direita foram fixadas em abdução com elástico. Na pata traseira esquerda foi colocado o sensor de oximetria. Neste momento deu-se início à monitorização da frequência cardíaca (FC), respiratória (FR) e oximetria de pulso (OP) (Fig. 1). O aparelho utilizado foi o *Care Vision OM-100* da empresa IMFtec (São Paulo, Brasil) com sensor pediátrico.



Figura 1 - Monitorização do animal com aparelho de oximetria.

Foi feita antissepsia da face ventral dos animais com álcool a 70% utilizando pinça de Pean e gaze estéril. Realizada uma incisão longitudinal mediana na

região cervical e outra transversal na transição entre o pescoço e tórax com bisturi, ambas com aproximadamente 3 cm, formando um "T" invertido, interessando a pele. Em seguida, dissecação do tecido conjuntivo com tesoura curva, a fim de obter a exposição necessária para acesso às duas veias jugulares. Após dissecação fascial e muscular com tesoura curva delicada, foi exposta a veia jugular esquerda (Fig. 2).



Figura 2 - Exposição da veia jugular esquerda.

A veia jugular esquerda foi isolada com uso de pinças de Halsted curvas. Em seguida foi puncionada com dispositivo intravenoso de cateter plástico sobre agulha (*Abbocath®*) em ângulo de 45°. O cateter de 24 gauges foi introduzido delicadamente no sentido caudal; retirada então a agulha do dispositivo e conectado uma seringa de plástico de 1 ml (Fig. 3).



Figura 3 - Cateter introduzido na veia jugular esquerda.

Depois de a seringa estar bem acoplada ao cateter, foi realizada a primeira coleta de sangue (Fig. 4). Devido ao calibre e delicadeza do vaso interessado, e possibilidade de colapamento, eventualmente foi movimentado o cateter cefalicamente para maior eficácia na aspiração. A amostra coletada foi de 0,4 ml, padronizada para adequado funcionamento do aparelho de análise laboratorial. Ao final da aspiração foi determinado o primeiro tempo de avaliação (T_1), sendo também anotados os valores de FC, FR e OP.

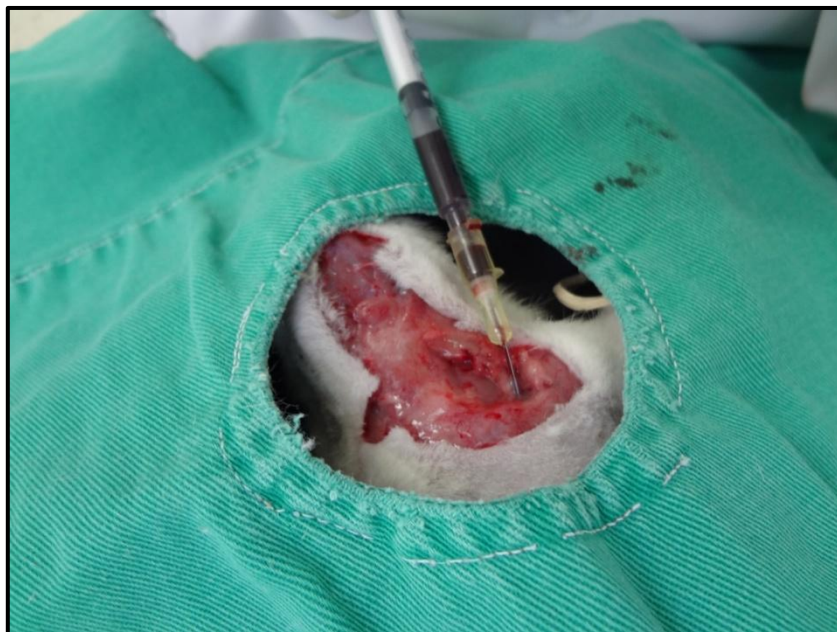


Figura 4 - Primeira amostra de sangue.

Colhida a primeira amostra, a seringa de 1 ml foi sacada cuidadosamente e imediatamente substituída no cateter por outra seringa de plástico de 20 ml previamente preenchida com o volume de RL previsto para a hidratação do animal. A infusão IV do cristalóide foi feita de maneira rápida, na velocidade de 25 ml/min, máximo possível para o cateter utilizado (Fig. 5).



Figura 5 - Infusão intravenosa rápida do cristalóide.

Após o término da infusão iniciou-se o período de dez minutos de observação. O cateter foi sacado da veia jugular esquerda e o orifício deixado no vaso foi imediatamente obliterado com pinça de Kelly curva para evitar sangramento.

A primeira amostra de sangue foi então submetida a análise. O aparelho utilizado para tal foi o *ABL80-flex blood gas analyzer* da empresa Radiometer Medical ApS (Bronshøj, Dinamarca). Os testes realizados foram o hematócrito, pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, sódio, potássio, cloro, bicarbonato e saturação de oxigênio.

Neste período observou-se a ocorrência de parada respiratória ou óbito. Foi considerado como parada respiratória a interrupção temporária do ciclo ventilatório, com retorno espontâneo em até 1 minuto. Foi considerado como óbito a interrupção definitiva do ciclo ventilatório, associado à ausência de pulsos por período superior a 5 minutos.

Em seguida foi iniciada a dissecação e isolamento da veia jugular direita com tesoura curva delicada e pinças de Kelly curvas. O mesmo procedimento de punção e introdução do cateter já descrito para o lado esquerdo foi aplicado ao lado direito. O segundo tempo de avaliação (T_2) foi caracterizado como sendo o término do período de observação (dez minutos após o final da infusão do líquido) ou na constatação de óbito. Após a anotação dos dados de FR, FC, e OP, foi aspirado 0,4 ml de sangue, constituindo a segunda amostra coletada. Esta foi submetida à análise bioquímica dos exames anteriormente citados. O cateter foi sacado da veia jugular direita e o orifício deixado no vaso imediatamente obliterado com pinça de Kelly curva.

Para a continuação do procedimento, a placa onde apoiava-se o animal foi girada em 180° posicionando o segmento caudal para o cirurgião, para facilitar a abordagem cirúrgica da caixa torácica. Realizada incisão sobre a pele, tangencial à borda inferior do arcabouço costal bilateral utilizando bisturi de lâmina fria. Com uma tesoura curva, os músculos da parede abdominal e peritônio foram seccionados chegando à cavidade abdominal. O músculo diafragma foi delicadamente pinçado com pinça de Adisson, tendo-se a cautela de preservar o lobo inferior dos pulmões. Este músculo foi seccionado com tesoura delicada curva, permitindo acesso à cavidade torácica. Sob visão direta, os pulmões direito e esquerdo foram afastados para secção das costelas no sentido longitudinal bilateralmente. Os órgãos foram liberados da parede anterior do tórax remanescente, e esta foi rebatida no sentido cranial, utilizando uma pinça de Kelly reta, oferecendo total exposição do coração, pulmões e vasos. O procedimento todo foi realizado com mínima perda sanguínea, já que, orientado pela anatomia, não houve lesão de órgãos ou vasos de grande porte.

Para a extração dos pulmões nas melhores condições possíveis, foi executada uma sequência rápida de intervenções: pinçamento da veia cava inferior e dos

vasos da base do coração utilizando pinças de Kelly curvas, e ligadura do hilo pulmonar esquerdo e seguido do direito (Fig. 6). Cada ligadura foi realizada com a passagem de dois fios de nylon 5.0 utilizando-se uma pinça de Kelly curva sob os vasos pulmonares e brônquios.



Figura 6 - Pinçamento da veia cava inferior e vasos da base do coração.

O hilo pulmonar foi seccionado em ambos os lados com tesoura curva no espaço entre os fios e os pulmões esquerdo e direito, que foram extirpados consecutivamente (Fig. 8). Findo este procedimento, as pinças de Kelly foram retiradas, e os vasos da base do coração seccionados com tesoura curva para exsanguinação e eutanásia do animal.

O tempo total de cada cirurgia variou de 20 a 40 minutos. Os animais do grupo controle (SHAM) foram anestesiados e operados da mesma maneira que os

demais. A única diferença foi a não administração de solução cristalóide após a primeira punção venosa.



Figura 7 - Pulmões direito e esquerdo após a extração.

Para pesagem dos pulmões foi utilizado papel alumínio, sendo recortado 56 quadrados de 5 x 5 cm, cada um identificado à caneta com números de 1 a 56, ou seja, um para cada animal. Estes papéis foram pesados individualmente em balança de precisão e seus respectivos valores anotados em tabela. O pulmão esquerdo retirado de cada animal foi colocado sobre seu respectivo papel alumínio e pesado. O peso do órgão, portanto, foi obtido através da diferença entre o peso total e do papel alumínio, representando a massa do pulmão úmido (MPU) (Fig. 8).

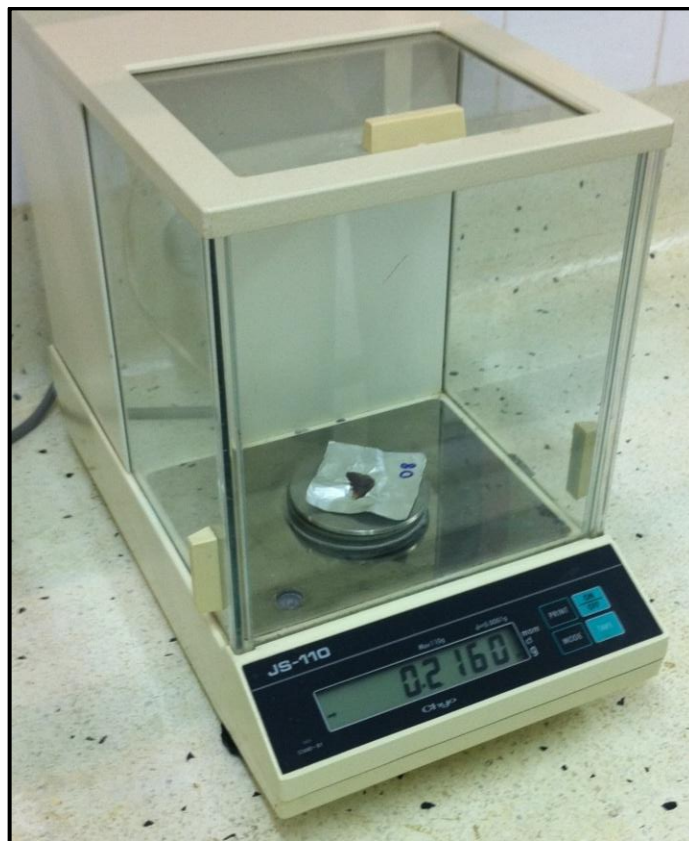


Figura 8 - Pulmão sendo pesado na balança de precisão.

Após pesagem, cada conjunto de papel alumínio com pulmão foi colocado em forno com temperatura fixada em 60°C para processo de secagem, onde ficaram por 48 horas. Após este período, o conjunto foi retirado para nova aferição da massa. A nova massa, subtraída da massa do papel alumínio, representou a Massa do pulmão seco (MPS). Estes dados foram necessários para a obtenção do índice pulmonar (IP) e seco-úmido (ISU). Onde $IP = 100 \times (MPU / MR)$, e $ISU = MPU / MPS$.

O pulmão direito foi inserido em Becker com solução de formaldeído a 10% e, com o auxílio de gases, mantido submerso por 48 horas para fixação. Após este período, cada órgão foi transferido para pequeno recipiente plástico fenestrado, individual, numerado, e imerso em álcool anidro para desidratação. Em seguida foi

submetido a banho de xilol e de parafina fundida. Após resfriamento da parafina na forma, foi obtido o bloco. Cada bloco foi fatiado em diferentes posições pelo micrótomo para obter amostras de diversos pontos do tecido pulmonar (ápice, região intermédia e base). As fatias delgadas foram adequadamente posicionadas em lâminas, novamente banhadas com xilol para retirada da parafina, e finalmente coradas com hematoxilina e eosina.

A avaliação histológica visou observar a presença de edema nas lâminas de tecido pulmonar. Este edema foi mensurado com a análise do tecido intersticial, peribrônquico, perivascular e unidades alveolares. A quantificação foi atribuída em notas que variaram entre 1, 2, 3 e 4, sendo a menor nota correspondente ao mínimo de edema encontrado e a maior nota ao maior edema encontrado. Foi observada também a presença ou não de transudato no interior de alvéolos. As lâminas foram estudadas em microscópios ópticos com aumentos de 200 e 400 vezes, e as fotos realizadas com aparelho de fotografia acoplado. A análise foi realizada por um único observador cego, uma vez que as lâminas estavam numeradas mas não havia referência a que grupo cada uma pertencia.

A avaliação estatística foi realizada no sentido de comparar os resultados de cada grupo em relação ao controle (SHAM). Nos parâmetros em que havia dois períodos (T_1 e T_2), foi considerado a diferença entre eles em cada grupo para a comparação com o controle. As variáveis quantitativas foram apresentadas através de resíduos descritivos (média, desvio-padrão, valores máximos e mínimos, mediana e diferença). Os resultados do edema foram apresentados em porcentagens. As comparações entre grupos, tempos e a interação grupo *versus* tempo (para parâmetros clínicos, exames laboratoriais e oximetria) foram feitas utilizando-se um modelo em medidas repetidas, levando-se em conta a correlação existente entre os momentos.

Para o IP e ISU, a avaliação foi realizada utilizando-se uma análise de variância ANOVA (modelo linear generalizado com distribuição gama), seguido de teste de Tukey (comparações múltiplas). Para as demais variáveis foram calculadas as diferenças entre os momentos, e a comparação entre os grupos foi realizada por meio de uma análise de variância (a um fator), seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (comparações com o controle). Para a variável edema, também foi utilizado a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Todas as análises foram efetuadas utilizando-se o programa *SAS for Windows*® v9.2.

O nível de significância para todos os testes foi fixado em 5% ($p < 0,05$) ou utilizado o " p " correspondente.

Resultados

4.1 Parâmetros clínicos e oximetria de pulso

Houve uma grande variação na FR dos animais antes e após o procedimento. A média de incursões por minutos antes do início do procedimento variou de 65 (G 100%) a 87 (G 0), quase 35% de diferença para o T₁ (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da frequência respiratória em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (ipm)	87 ± 27	83 ± 20	65 ± 25	84 ± 20	69 ± 20	66 ± 10	72 ± 22
T ₂ (ipm)	63 ± 9	62 ± 23	54 ± 35	58 ± 16	54 ± 20	44 ± 38	0
Dif	-24	-21	-11	-26	-15	-22	-72
<i>p</i>	n / a	0,9995	0,7185	1	0,923	1	0,0014

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; ipm = incursões por minuto; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

A média da FC entre os grupos variou de 233 bpm (G 100%) a 288 bpm (G 0), diferença de pouco menos que 25%. Observou-se redução estatisticamente significativa nos grupos G 200%, G 250% e G 300% (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da frequência cardíaca em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (bpm)	288 ± 25	267 ± 49	233 ± 37	252 ± 50	276 ± 35	271 ± 32	282 ± 20
T ₂ (bpm)	292 ± 23	240 ± 60	201 ± 63	201 ± 68	182 ± 53	105 ± 96	0
Dif	4,2	-26,7	-31,5	-51	-93,3	-166	-281,7
<i>p</i>	n / a	0,7523	0,6324	0,2173	0,0055	< 0,0001	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; bpm = batimentos por minuto; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

A média de saturação periférica de oxigênio medida pelo sensor de oximetria variou no T₁ de 79% (G 250%) a 94% (G 50%). Após hidratação, apenas os grupos G 250% e G 300% apresentaram uma variação estatisticamente significativa entre o T₁ e T₂, em comparação com o grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da saturação periférica de oxigênio em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (%)	87 ± 5	94 ± 5	89 ± 7	84 ± 11	88 ± 9	79 ± 9	85 ± 7
T ₂ (%)	89 ± 6	88 ± 9	72 ± 16	65 ± 22	69 ± 18	54 ± 35	0
Dif	2	-6	-17	-19	-19	-25	-85
<i>p</i>	n / a	0,907	0,2324	0,1655	0,1613	0,0428	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

4.2 Exames hematológicos

A redução no valor do hematócrito foi, em média, de aproximadamente 25% no G 50%, 45% no G 100%, 59% no G 150%, 75% no G 200%, 91% no G 250% e 94% no G 300%. A hidratação proposta foi significativamente efetiva em todos os grupos com $p < 0,0001$ (Tabela 5 e Gráfico 1).

Tabela 5 - Valores médios e respectivos desvios-padrões do hematócrito em T₁, T₂ e a relação da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (%)	53 $\pm$ 5,1	49,4 $\pm$ 3,3	49,5 $\pm$ 5,9	53,1 $\pm$ 4,1	52,1 $\pm$ 3,2	43,6 $\pm$ 5,7	48,5 $\pm$ 5,1
T ₂ (%)	53,4 $\pm$ 3,4	36,9 $\pm$ 2,2	27,3 $\pm$ 4	22 $\pm$ 2	12,8 $\pm$ 2,7	3,9 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1,5
T ₂ / T ₁	1,01	0,75	0,55	0,41	0,25	0,09	0,06
<i>p</i>	n / a	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; T₂ / T₁ = relação entre T₂ e T₁; Teste de Dunnett.

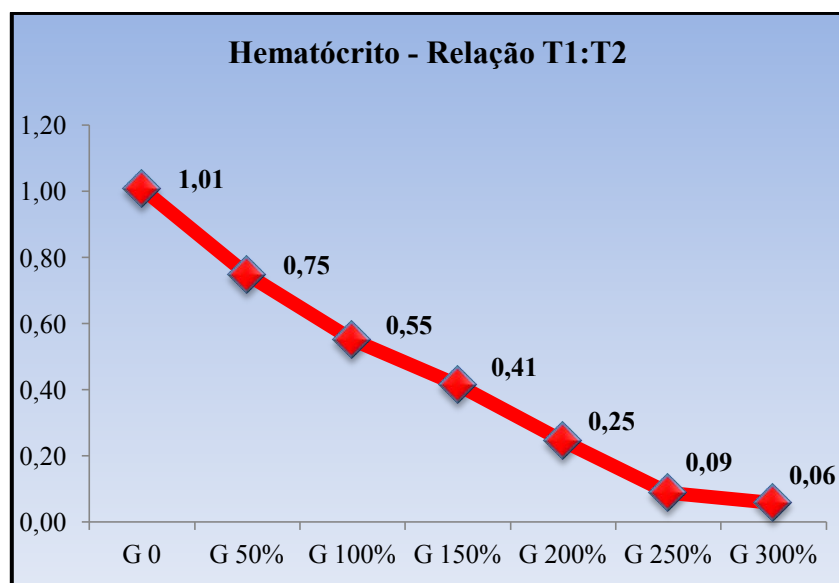


Gráfico 1 - Relação da média do hematócrito entre T_1 e T_2 .

O pH variou no T_1 de 7,29 (G 0) a 7,37 (G 300%). Os grupos G 100%, G 150%, G 200%, G 250% e G 300% apresentaram redução estatisticamente significativa no valor do pH, tendo o G 300% a menor média (7,08) (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios e respectivos desvios-padrões do pH em T_1 , T_2 e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T_1	7,3 $\pm$ 0,11	7,32 $\pm$ 0,05	7,33 $\pm$ 0,03	7,33 $\pm$ 0,03	7,32 $\pm$ 0,05	7,32 $\pm$ 0,05	7,37 $\pm$ 0,04
T_2	7,31 $\pm$ 0,07	7,30 $\pm$ 0,05	7,26 $\pm$ 0,03	7,25 $\pm$ 0,04	7,20 $\pm$ 0,05	7,22 $\pm$ 0,04	7,08 $\pm$ 0,09
Dif	0,01	-0,02	-0,07	-0,08	-0,12	-0,1	-0,29
<i>p</i>	(-)	0,907	0,0475	0,0198	0,0004	0,0025	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; Dif = diferença entre T_1 e T_2 ; teste de Dunnett.

A $p\text{CO}_2$ variou de 49,9 mmHg (G 300%) a 57,4 mmHg (G 0) no T_1 . Apenas o G 300% apresentou diferença estatisticamente significativa, tendo a média se elevado 12,9 pontos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da $p\text{CO}_2$ em T_1 , T_2 e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$	$\bar{x} \pm \text{DP}$
T_1 (mmHg)	57,4 $\pm$ 14,9	51,1 $\pm$ 8,7	52,1 $\pm$ 7,1	53,9 $\pm$ 5,8	55,5 $\pm$ 5,6	52 $\pm$ 4,1	49,9 $\pm$ 5,4
T_2 (mmHg)	59,3 $\pm$ 12,8	51,1 $\pm$ 6,4	59,5 $\pm$ 4,5	53,3 $\pm$ 7,5	52,6 $\pm$ 8,3	59,6 $\pm$ 4,5	62,8 $\pm$ 9,1
Dif	1,9	0	7,4	-0,6	-2,9	7,6	12,9
<i>p</i>	(-)	0,9835	0,3704	0,938	0,5166	0,3276	0,0086

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mmHg = milímetros de mercúrio; Dif = diferença entre T_1 e T_2 ; teste de Dunnett.

A $p\text{O}_2$ variou de 37,6 mmHg (G 200%) a 41,9 mmHg (G 150%) no T_1 . Apenas os grupos G 200% e G 300% apresentaram queda estatisticamente significativa no índice de $p\text{O}_2$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da pO₂ em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (mmHg)	41,5 ± 4,4	41,6 ± 4,2	39,5 ± 4,2	41,9 ± 4,4	37,6 ± 3,9	41,3 ± 2,9	38 ± 3,6
T ₂ (mmHg)	38,3 ± 5	40,8 ± 6,1	38,3 ± 11,9	37,1 ± 14,7	21,9 ± 8,6	25,8 ± 7,6	19,1 ± 8,4
Dif	-3,2	-0,8	-1,2	-4,8	-15,7	-15,5	-18,9
<i>p</i>	(-)	0,9906	0,9962	0,9992	0,0485	0,0551	0,0084

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mmHg = milímetros de mercúrio; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

As concentrações de sódio variaram de 136 mEq/l a 142 mEq/l nas médias dos grupos no T₁, não apresentando alteração estatisticamente significativa em nenhum grupo (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da concentração sérica de sódio em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (mEq/l)	142 ± 13	138 ± 2	137 ± 1	137 ± 2	136 ± 2	140 ± 3	138 ± 3
T ₂ (mEq/l)	142 ± 11	138 ± 2	139 ± 2	138 ± 1	140 ± 2	141 ± 2	138 ± 3
Dif	0	0	2	1	4	1	0
<i>p</i>	(-)	1	0,7272	0,9648	0,0951	0,5916	1

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mEq/l = miliequivalentes por litro; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

As concentrações de potássio sérico variaram de 3,71 mEq/l (G 250%) a 4,84 mEq/l (G 100%) no T₁. Apenas o G 300% apresentou alteração estatisticamente significativa, tendo elevado em 2,19 na média (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da concentração sérica de potássio em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (mEq/l)	4,29 ± 0,50	3,89 ± 0,83	4,84 ± 1,12	4,76 ± 1,76	4,5 ± 0,80	3,71 ± 0,48	3,74 ± 0,62
T ₂ (mEq/l)	4,11 ± 0,54	3,98 ± ,32	4,93 ± 1,38	4,16 ± 0,39	4,28 ± 0,51	4,43 ± 0,78	5,93 ± 2,64
Dif	0,18	-0,09	-0,09	0,6	0,22	-0,72	-2,19
<i>p</i>	(-)	0,9988	0,9988	0,9849	1	0,711	0,0161

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mEq/l = miliequivalentes por litro; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

A média das concentrações de cloro variou de 91,6 mEq/l (G 200%) a 94,6 mEq/l (G 250%) no T₁. Apenas os grupos G 200% e G 250% apresentaram alteração estatisticamente significativa na diferença entre T₁ e T₂ (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da concentração sérica de cloro em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (mEq/l)	93,6 ± 2,1	92,4 ± 2,4	94 ± 2,5	93,8 ± 2,4	91,6 ± 2,1	94,6 ± 3,4	92,5 ± 3
T ₂ (mEq/l)	94,8 ± 2,3	93,6 ± 1,8	96,1 ± 1,2	95,1 ± 1,8	96,4 ± 1,7	99,4 ± 2,2	94,9 ± 2,2
Dif	-1,2	-1,2	-2,1	-1,3	-4,8	-4,8	-2,4
<i>p</i>	(-)	1	0,8802	0,9999	0,0112	0,0112	0,7454

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mEq/l = miliequivalentes por litro; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

A média dos níveis de bicarbonato variou de 25,2 mEq/l (G 50%) a 30,3 mEq/l (G 0) no T₁. Apenas o G 300% apresentou variação estatisticamente significativa com uma redução de 13,7 pontos na média (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da concentração sérica de bicarbonato em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (mEq/l)	30,3 ± 5,4	25,2 ± 3,7	26,6 ± 2,9	27,8 ± 2,3	27,5 ± 3	27 ± 2,9	28,7 ± 2,2
T ₂ (mEq/l)	26,6 ± 2,1	24,1 ± 2,7	25,8 ± 1,6	22,6 ± 2,5	19,6 ± 3,3	20,2 ± 3,2	15 ± 3,1
Dif	3,7	1,1	0,8	5,2	7,9	6,8	13,7
<i>p</i>	(-)	0,4398	0,3613	0,87	0,0695	0,2455	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; mEq/l = miliequivalentes por litro; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

A saturação venosa de oxigênio no T₁ variou de 64,9% (G 200%) a 72,7% (G 250%). Houve queda estatisticamente significativa destes índices nos grupos G 200%, G 250% e G 300% (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores médios e respectivos desvios-padrões da saturação venosa de O₂ em T₁, T₂ e a diferença da média entre os tempos.

	G 0	G 50%	G 100%	G 150%	G 200%	G 250%	G 300%
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
T ₁ (%)	69,6 ± 8,2	71,2 ± 7,2	69 ± 7	72,4 ± 5,6	64,9 ± 8,3	72,7 ± 5	68,2 ± 7,8
T ₂ (%)	64,6 ± 5,1	71,3 ± 6,6	66,3 ± 12,4	61 ± 17,7	29,8 ± 15	36,6 ± 16,6	16,6 ± 10,2
Dif	5	-0,1	2,7	11,4	35,1	36,1	51,6
<i>p</i>	(-)	0,9361	0,9986	0,8519	0,0002	0,0001	< 0,0001

$\bar{x}$ = média; DP = desvio-padrão; Dif = diferença entre T₁ e T₂; teste de Dunnett.

4.3 Avaliação gravimétrica do edema pulmonar

O IP no grupo controle foi de 2,35, atingindo 5,96 no G 300%, um aumento de cerca de 2,5 vezes. Porém apenas os grupos G 250% e G 300% apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Gráfico 2).

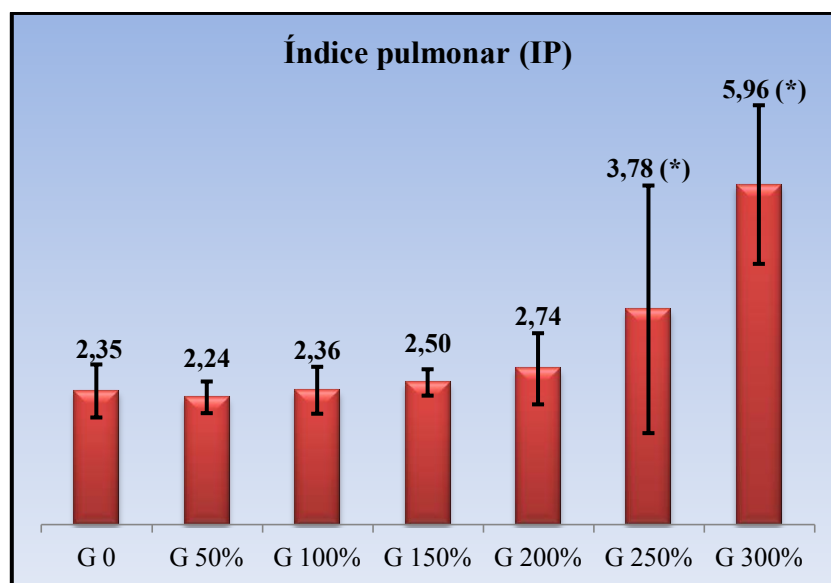


Gráfico 2 - Média e desvio-padrão do índice pulmonar em cada grupo; (*) $p < 0,05$ (teste de Tukey).

O ISU no grupo controle foi de 4,73, chegando a 13,14 no G 300%, um aumento superior a 2,5 vezes. Apenas os grupos G 250% e G 300% apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Gráfico 3).

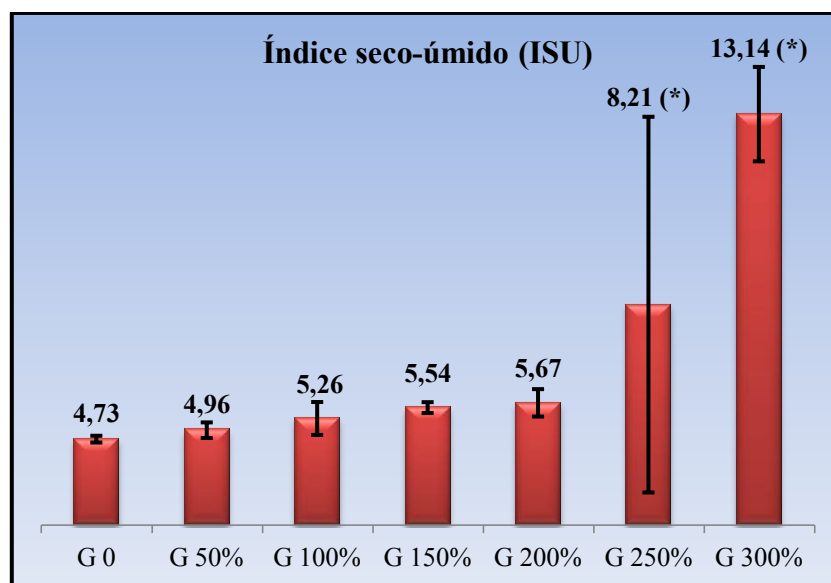


Gráfico 3 - Média e desvio-padrão do índice seco-úmido em cada grupo; (*) $p < 0,05$ (teste de Tukey).

4.4 Avaliação histológica do edema pulmonar

As médias das notas de cada grupo podem ser observadas no Gráfico 4. Os grupos G 150%, G 200%, G 250% e G 300% apresentaram diferença estatística de resultado em relação ao controle. Em dois animais do G 250% e cinco animais do G 300% foi observado o maior grau de edema e a presença de líquido na luz de alguns alvéolos, sendo atribuído a maior nota (4). Nas Figuras 9, 10, 11 e 12 pode ser observado o aspecto histológico correspondente às notas 1, 2, 3 e 4 respectivamente. A Figura 13 caracteriza a presença de transudato no interior dos espaços alveolares em uma lâmina que recebeu nota 4.

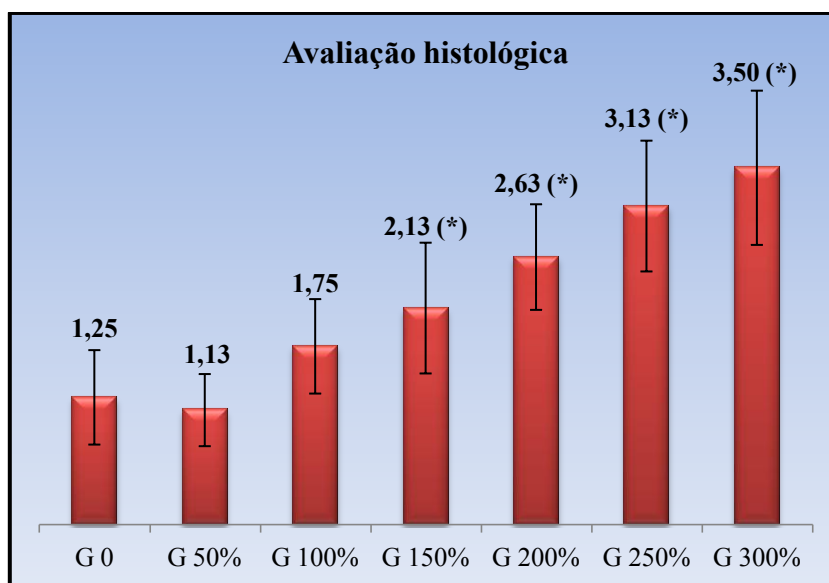


Gráfico 4 - Média e desvio-padrão da nota atribuída na avaliação histológica em cada grupo; (*) $p < 0,05$ (ANOVA, seguido de teste de Dunnet).

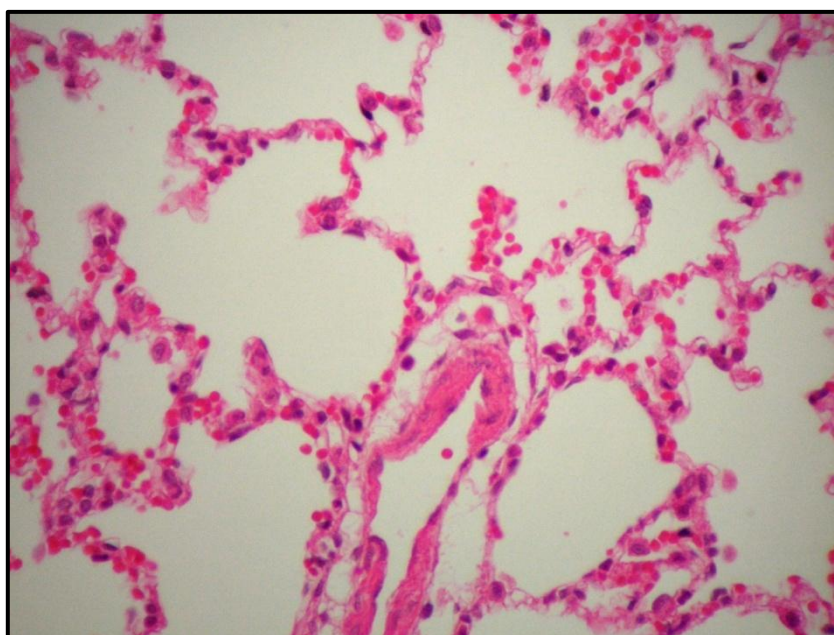


Figura 9 - Avaliação histológica do edema pulmonar nota 1. É possível visualizar a preservação estrutural dos alvéolos e septos alveolares.

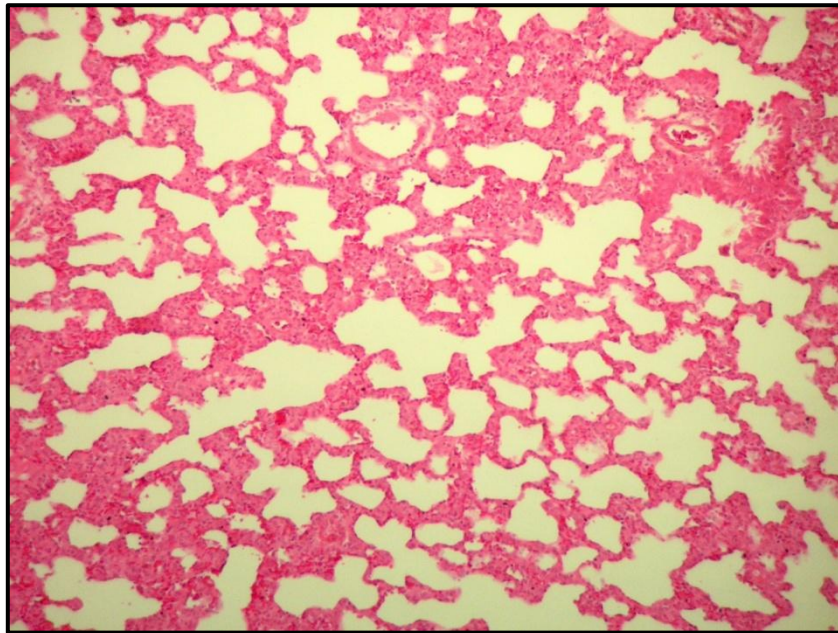


Figura 10 - Avaliação histológica do edema pulmonar nota 2. Pode-se observar preservação dos alvéolos, porém com aumento da espessura dos septos devido ao edema, principalmente perivascular.

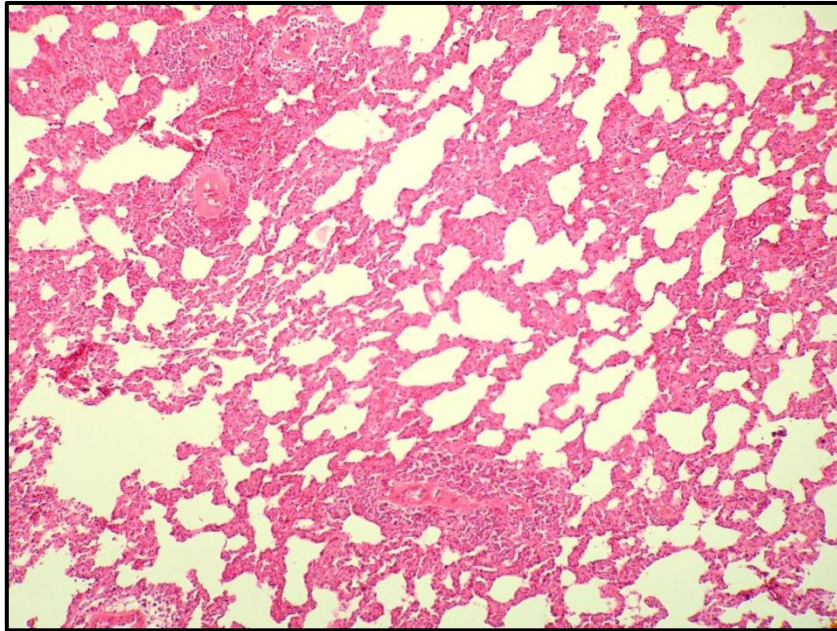


Figura 11 - Avaliação histológica do edema pulmonar nota 3. Pode-se observar a perda da estrutura de alguns alvéolos, edema mais evidente nos espaços perivascularres e nos septos alveolares.

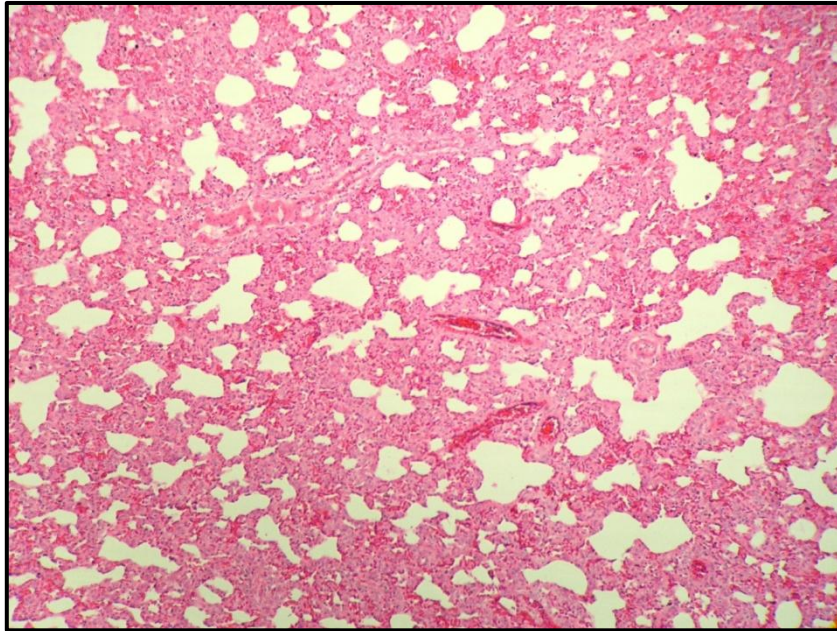


Figura 12 - Avaliação histológica do edema pulmonar nota 4. Pode-se observar a destruição da morfologia característica do pulmão, com o espaço predominantemente ocupado pelo tecido conjuntivo (intersticial) ao invés dos alvéolos.

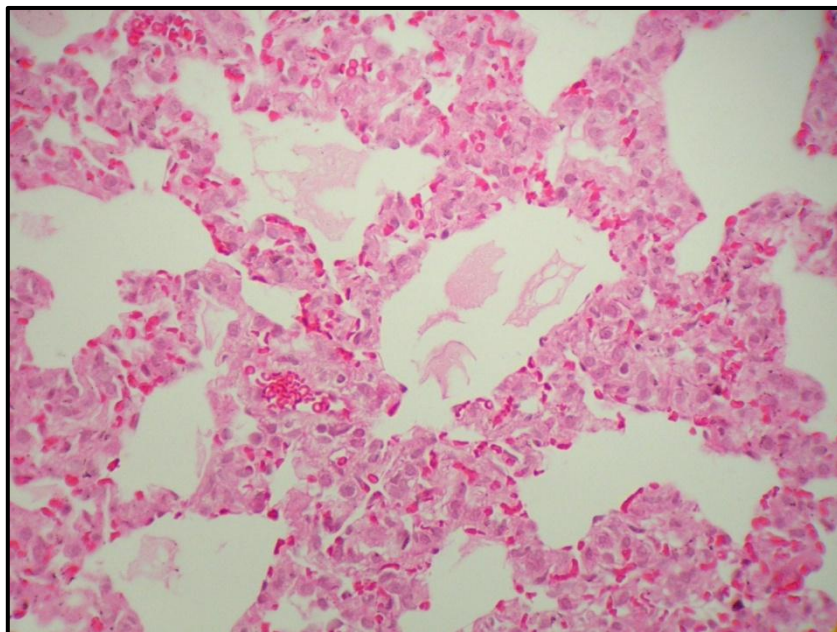


Figura 13 - Avaliação histológica do edema pulmonar nota 4. É possível observar o espessamento dos septos alveolares com edema e a presença de líquido no interior dos alvéolos.

4.5 Desfecho

Foi evidenciada parada respiratória, após a hidratação, em 50% dos animais do G 150% e 100% dos animais dos grupos G 200%, G 250% e G 300%. Esta parada foi temporária (< 1 minuto) em todos os animais que a apresentaram nos grupos G 150% e G 200%, e em 75% dos animais do G 250%. Nestes casos, os animais voltaram a respirar espontaneamente sem qualquer intervenção. Em 25% dos animais do G 250% e 100% do G 300%, a parada respiratória foi definitiva levando os animais a óbito.

Todos os animais dos grupos G 0, G 50%, G 100%, G 150% e G 200% permaneceram vivos, tendo sido sacrificados para o término do experimento. Apenas 25% dos animais do G 250% e 100% do G 300% evoluíram para o óbito. No Gráfico 5 pode-se observar a ocorrência de parada respiratória e óbito em cada grupo.

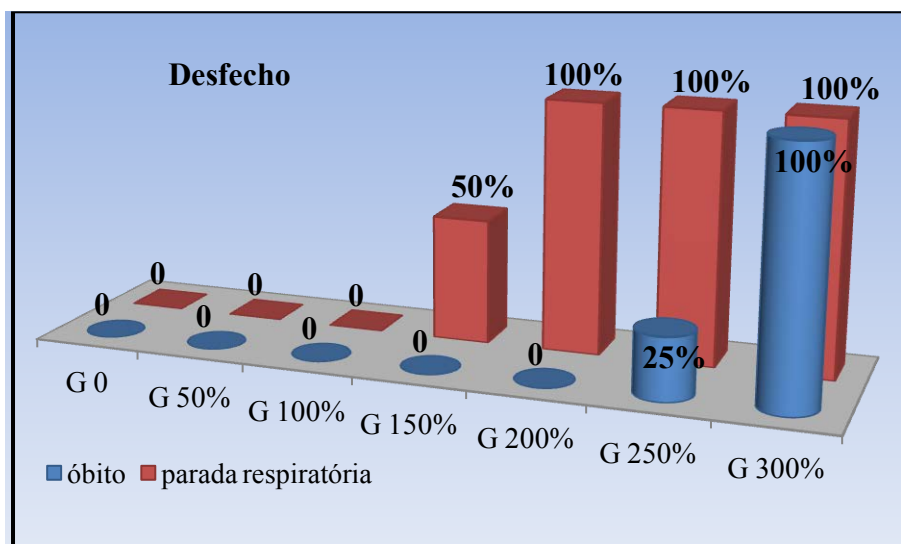


Gráfico 5 - Incidência de parada respiratória e óbito nos grupos ($p < 0,0001$ - ANOVA).

Discussão

A descrição de um modelo experimental de infusão IV rápida de líquidos envolve a determinação do limiar de toxicidade, ou seja, quando o sujeito da pesquisa fica exposto a alterações anatômicas e fisiológicas irreversíveis e potencialmente letais. Sabe-se que as principais consequências maléficas da rápida administração de grandes volumes de cristaloides são o distúrbio eletrolítico, a queda do pH e o EP, por desequilíbrio das pressões entre os compartimentos e pela insuficiência cardíaca (Ceneviva & Vicente, 2008). Neste trabalho foram estudados estes efeitos e foi possível identificar em que momento cada um dos parâmetros se altera de maneira significativa.

Foi escolhido o rato para a pesquisa por ser um animal que apresenta características biológicas próximas a de mamíferos maiores, e de certa forma, do homem; somado à possibilidade de uso de um número grande de indivíduos devido à facilidade de reprodução em cativeiro, o que permite maior acurácia da análise estatística. O animal macho adulto apresenta todas suas funções fisiológicas adequadamente maduras e não sofre interferência de ações hormonais periódicas (Steiner *et al.*, 1981).

Como o estudo está diretamente relacionado ao volume de líquido circulante no animal, estes foram alimentados de maneira padronizada com ração e água sob livre demanda até o início da anestesia. Ainda assim, o estado de hidratação prévio pode gerar um viés. Considerando que os ratos utilizados eram da mesma raça (Wistar), sadios e não apresentavam diferença significativa de peso, a taxa de hematócrito prévia à intervenção pode revelar maior ou menor diluição dos hemocomponentes (Messmer, 1975). O animal com menor taxa inicial (mais hidratado) apresentou 31 % e o maior 62 % (menos hidratado). Ainda assim, a amostra se apresentou estatisticamente homogênea, permitindo a análise dos resultados.

Para evitar possível viés em relação à quantidade de líquido administrada em cada animal, o volume infundido de fluido obedeceu a uma fórmula que considerou a massa corporal e o grupo ao qual este pertencia. Utilizando um índice de ajuste de 5,4 ml de sangue para cada 100 g de peso (Hirano *et al.*, 2003), foi possível estabelecer de maneira padronizada o volume adequado para cada indivíduo nos diferentes grupos.

A utilização de dois acessos vasculares foi importante. A coleta de sangue através do mesmo cateter e vaso em que foi injetado o líquido poderia causar uma diluição errática da amostra do T₂, alterando os resultados. Inicialmente foi aventada a ideia de obter um acesso venoso para infusão e um arterial para coleta dos exames. Os acessos arteriais de rato descritos na literatura são a cateterização da artéria femoral ou carótida, e punção da artéria aorta (Oliveira *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2008). A cateterização arterial envolve o isolamento e secção do vaso para introdução do cateter. Neste processo é frequente a perda de alguma quantidade de sangue, o que poderia interferir de maneira significativa neste estudo devido ao controle dos volumes. A punção da artéria aorta exige uma laparotomia prévia. Esta cirurgia poderia acarretar perdas sanguíneas pelo acesso cirúrgico, perdas hídricas adicionais pela evaporação das vísceras, bem como interferir na dinâmica ventilatória do animal e consequentemente nos resultados. Por esses motivos optou-se pela utilização de dois acessos venosos.

O cristalóide escolhido foi a solução de Ringer com lactato por apresentar algumas vantagens em relação à solução salina a 0,9%, como descrito na literatura (Schott, 2010). Por mais de cem anos, há um debate significativo de méritos das várias composições fluídas utilizadas na ressuscitação do adulto. O dogma estabeleceu-se devido aos médicos clínicos utilizarem invariavelmente a solução salina a 0,9%, enquanto que os cirurgiões declararam a solução de RL de Hartmann o "único" composto realmente fisiológico disponível. Pacientes que requerem ressuscitação aguda

e manejo clínico crítico são susceptíveis a alterações metabólicas, principalmente de parâmetros que aumentem a morbidade ou mortalidade. Em um trabalho de revisão, Schott (2010) observou evidências que a super-hidratação com soro fisiológico 0,9% causa acidose hiperclorêmica como também ajuda a modular a coagulação em modelos de hemorragia. Concluiu que não há um fluido de ressuscitação que seja uma "arma mágica". Mas a solução de RL parece ter a maior eficácia na substituição volumétrica do sangue causando os menores desequilíbrios metabólicos, e por isso pode ser o fluido de escolha na ressuscitação do paciente. Pode-se dizer que apesar das diluições extremas realizadas neste estudo, a solução de RL produziu realmente pouco desequilíbrio eletrolítico. As alterações mais pontuais foram no G 300% com o pH e bicarbonato. Mesmo assim, como todos os animais deste grupo evoluíram ao óbito, parte deste desequilíbrio pode ser atribuído à parada da função renal e acúmulo de ácidos orgânicos produzidos.

Pellegrino *et al.*, em 2003, infundiram solução salina a 0,9% na dose de 30 ml/Kg em vinte minutos em humanos. Observaram os parâmetros clínicos e de espirometria. Em concordância com estudos prévios, a quantidade de líquido infundida foi incapaz de causar EP, de acordo com os dados espirométricos, embora tenha-se observado a instalação de congestão vascular pulmonar. Não houve diferença estatística entre os parâmetros avaliados antes e após a sobrecarga volêmica (Pellegrino *et al.*, 2003).

A quantidade de líquido utilizada por Pellegrino *et al.* equivale a 9 ml em um rato de 300 g e 1800 ml em um humano de 60 Kg, ou seja, pouco mais de 50% da volemia. Avaliando a FR em T₁ e T₂, o grupo correspondente à hidratação de 50% não apresentou alteração significativa em relação ao controle, aliás, apresentou uma diferença ainda menor entre os dois tempos. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento

da circulação pulmonar e melhora da oxigenação, como sugere outro trabalho (Muir *et al.*, 1975). O único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa foi o G 300%, no qual todos os animais evoluíram com óbito, ou seja todos apresentaram T_2 igual a zero.

A FR parece não ter sido um parâmetro adequado para avaliação da influência da sobrecarga volêmica e EP. O protocolo de anestesia com cetamina e xilazina interfere na FR do animal, reduzindo mais ou menos em cada indivíduo. Esta heterogenicidade de efeito na mecânica ventilatória causada pela anestesia pode ter interferido significativamente nos resultados deste parâmetro. Apesar do protocolo utilizado ser descrito como de baixa interferência na atividade ventilatória (Taborda *et al.*, 2004), a xilazina é uma droga relaxante muscular e pode atuar, mesmo que pouco, no músculo diafragma e musculatura intercostal.

Muir *et al.* publicaram um artigo sobre os efeitos da infusão rápida de 2000 ml de solução salina em humanos (mais de 50% da volemia, considerando um adulto de 60Kg), tendo sido observados em três tempos: na aplicação, 10 e 20 minutos após. Este volume não causou nenhum sintoma ou sinal respiratório tais como dispneia ou estertores crepitantes. Através de resultados de espirometria, foi presumido que houvesse algum aumento na quantidade de líquido intersticial pulmonar. A FC dos indivíduos não se alterou, apesar do aumento nítido do débito cardíaco de 4,67 l/min (antes) para 6,1 l/min (20 min) (Muir *et al.*, 1975). Diferentemente do descrito, neste trabalho os animais apresentaram redução de 10% na FC já no G 50%, sendo esta redução progressivamente maior nos grupos subsequentes. Isto pode ser explicado pela fisiologia circulatória, onde o débito cardíaco (DC) é resultado do produto entre o volume de ejeção (VE) e a FC. Como o VE aumentou devido ao aumento da volemia, a FC tende a abaixar para estabilizar o DC.

Muir *et al.* (1975) ainda observaram uma queda no valor da oximetria, apesar de não ter encontrado grandes alterações nas pressões dos gases no sangue. Associaram este fato à menor concentração sanguínea de oxigênio, consequência natural da hemodiluição, não traduzindo necessariamente em queda da oxigenação tecidual. Neste trabalho, o valor da saturação periférica de oxigênio avaliada pelo oxímetro de pulso foi progressivamente menor, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas nos grupos G 250% e G 300%. Porém, avaliando os grupos G 100% e G 150%, nota-se, concordante com Muir *et al.*, uma dissociação na queda do valor da oximetria de pulso e da pO_2 . No G 100% houve uma queda de 19% na oximetria e 3% na pO_2 , e no G 150% queda de 22,5% na oximetria e 11% na pO_2 . Isto sugere que talvez a oximetria de pulso realmente não seja um parâmetro confiável em animais submetidos à hemodiluição.

A saturação periférica de oxigênio variou no T_1 de 79,1% (G 250%) a 93,8% (G 50%). Este pode ser mais um dado indicativo da interferência da anestesia na mecânica ventilatória.

Em relação à pressão dos gases, Muir *et al.* (1975) observaram aumento da pO_2 e inalterabilidade da pCO_2 . Associaram esta observação ao aumento da pressão da artéria pulmonar, com aumento do fluxo sanguíneo pulmonar e consequentemente maior oxigenação do sangue. Este trabalho apresentou números congruentes com o de Muir *et al.*, sendo que a pO_2 sofreu alteração significativa apenas com hidratação de 2 vezes da volemia, enquanto que a pCO_2 apresentou diferença estatística apenas no G 300%.

O cirurgião suíço Kronecker, em 1886, demonstrou que cães sobrevivem com hemodiluição isovolêmica com solução salina a 0,6% até um hematócrito superior

a 15%. Na literatura são encontrados muitos estudos com a intenção de determinar o grau de tolerância da hemodiluição, utilizando cristaloides e coloides. Takaori e Safar, em 1966, publicaram que cães resistem até 3 g/dL de concentração de hemoglobina. Messmer, em 1967, mostrou que cães resistem à hemodiluição com Dextran 60 até o nível de 2,8 g/dL de hemoglobina (*apud* Messmer, 1975).

Após elucidação de mecanismos compensatórios nas reduções agudas da taxa de hemoglobina (aumento do DC, aumento da extração de oxigênio e alterações na microcirculação), pode-se afirmar que a oxigenação tecidual está preservada até um índice de hematócrito de 20%. Vários autores demonstraram que esta diluição não compromete a oxigenação do pâncreas, intestino delgado, fígado, rim, músculo esquelético, cérebro e miocárdio (Messmer, 1975).

Considerando que o hematócrito é um ótimo índice para quantificar a hemodiluição (Messmer, 1975), a metodologia de hidratação executada neste estudo foi eficaz. O nível do hematócrito foi progressivamente menor, desde a média de 53,4% no grupo controle até 2,8% no grupo hidratado com 3 vezes a volemia. A hidratação com adicional de 150% da volemia em cristalóide levou a uma média de 22% de hematócrito, nível este capaz de manter a adequada oxigenação tecidual de acordo com a literatura.

Foi notado um pequeno aumento no hematócrito (inferior a 1%) entre o T₁ e T₂ nos animais do grupo controle. Não deveria haver diferença entre os tempos porque não houve infusão de líquido, apenas a retirada de 0,4 ml de sangue em cada punção. Isto pode ter ocorrido devido à desidratação provocada pela exposição da ferida operatória ou devido ao próprio aparelho de leitura laboratorial que possui margem de erro de 1%.

Os principais íons responsáveis pelo equilíbrio eletrolítico, os quais devem ser alvo de maior atenção no paciente cirúrgico são o sódio, potássio e cloro (Ceneviva & Vicente, 2008). Apesar da administração de grandes volumes provocada nesta pesquisa, com hemodiluições extremas, apenas o bicarbonato apresentou grande variação em sua concentração, e ainda assim apenas no G 300% que houve infusão de volume de 300% da volemia em cristalóide. O sódio, cloro e potássio sofreram pequenas alterações com aumento ou queda após a hidratação.

O sódio é o principal cátion do LEC. A correção da hiponatremia por diluição é feita através da eliminação do excesso de água; o tratamento da baixa taxa de sódio é indicada apenas quando a concentração sérica atinge menos de 110 mEq/l, enquanto que a hipernatremia deve ser corrigida acima de 160 mEq/l (Ceneviva & Vicente, 2008). Nenhum dos grupos apresentou queda ou aumento significativos da taxa de sódio em relação ao controle. E nenhum animal observado apresentou uma concentração de sódio inferior a 110 mEq/l ou superior a 160 mEq/l.

O cloro é o principal ânion do LEC. As intervenções são indicadas se a concentração ficar abaixo de 80 mEq/l ou acima de 125 mEq/l (Ceneviva & Vicente, 2008). Apenas os grupos G 200% e G 250% apresentaram aumento significativo na taxa de cloro. Nenhum rato do estudo apresentou cloremia inferior ou superior aos níveis de alerta para tratamento.

O potássio é o principal cátion do LIC. Atenção especial deve ser considerada a este íon que apresenta interferência significativa na contratilidade do músculo miocárdico, e por isso sua oscilação não tem uma faixa muito extensa de segurança. Concentrações inferiores a 3 mEq/l e superiores a 5,5 mEq/l podem exigir intervenção para evitar possíveis complicações cardíacas (Ceneviva & Vicente, 2008).

Apenas o G 300% apresentou elevação significativa no nível de potássio. Porém, um animal do G 250% (12,5%) e quatro animais do G 300% (50%) apresentaram nível superior a 5,5 mEq/l, tendo extrapolado a faixa de segurança.

Em relação ao pH, Muir *et al.* observaram queda de 0,03 após a hidratação (Muir *et al.*, 1975). O uso de bicarbonato de sódio para atenuar a queda do pH na acidose láctica é alvo de controvérsias há mais de 20 anos. Nas acidoses metabólicas hiperclorêmicas, existe um déficit real de bicarbonato no LEC. Na prática, este fato tem implicações terapêuticas, pois significa que a concentração sérica de bicarbonato só retornará ao normal espontaneamente se os rins forem capazes de aumentar a excreção urinária de prótons e regenerar bicarbonato. Isto pode ocorrer quando a acidose hiperclorêmica é de origem não renal, como no caso da diarreia. A acidose pode ainda ocorrer quando não houve aumento significativo do cloro, porém aumento de ácidos orgânicos. Com o tratamento da doença de base e a reversão das condições metabólicas responsáveis pela produção excessiva destes ácidos, o acetato e o lactato são rapidamente convertidos em bicarbonato (sendo, por isso, considerados precursores de bicarbonato ou “bicarbonato em potencial”). A implicação terapêutica desse fato é que, nas acidoses orgânicas, os esforços devem ser concentrados na correção da doença de base, e não na administração exógena de bicarbonato. No entanto, a acidose severa ($\text{pH} < 7,15$) tem seus riscos metabólicos, respiratórios, cerebrais e cardiovasculares, não sendo prudente aguardar a compensação renal. E por isso, nestes casos, pode estar indicado o uso do bicarbonato (Rocha, 2009).

À exceção do G 50% e controle, todos os grupos apresentaram queda significativa na taxa de pH do sangue. Porém, há de se observar que as quedas foram discretas, chegando a 0,12 no G 200% e 0,1 no G 250%. Apenas o G 300% apresentou uma queda que levasse o animal a uma acidose severa, com uma média de pH de 7,08.

E apenas neste grupo houve animais (75%) que apresentaram o pH inferior a 7,15. Pode-se dizer portanto que a hidratação com solução de RL de volume igual ou superior à volemia induziu a uma queda do pH, mas com importância clínica apenas a partir do volume de 3 vezes a volemia. Congruente a este achado está a avaliação do bicarbonato sérico (que atua como tampão), pois apenas no G 300% apresentou uma queda significativa.

Quanto ao EP, sua maneira mais simples de avaliação é o método gravimétrico, considerado como padrão ouro na literatura. As três principais medidas são: peso do pulmão úmido (MPU), índice pulmonar (IP) e o índice seco-úmido (ISU). Estes índices são facilmente aplicados no rato, necessitando apenas de uma balança de precisão e um forno para secagem. Raças puras de animais tem o IP relativamente uniforme em qualquer idade, tornando esta medida bastante útil. Porém o ISU é ainda mais útil porque leva em consideração as pequenas variações na massa seca do pulmão do animal, devendo ser utilizado em linhagens heterogêneas. O ISU obteve uma excelente correlação com a albumina e proteína total de lavado broncoalveolar durante lesão por pressão de vias aéreas superiores em ratos (Yoshikawa *et al.*, 2003). Se houver necessidade de determinar apenas o edema intersticial, pode-se recorrer a outro índice mais específico: a água pulmonar extravascular (EVLW). Descrito pela primeira vez em 1965 (Pearce *et al.*, 1965) e posteriormente modificado para uso em ratos (Fukuda *et al.*, 2000). Este índice é aferido indiretamente utilizando a medida de água do espaço intravascular, através de diluição da hemoglobina, ou ainda de maneira mais específica com uso de marcador radioativo no sangue (Hedlund & Putman, 1985; Katzenelson *et al.*, 2004; Parker & Townsley, 2004).

Todos os grupos apresentaram aumento do ISU em relação ao controle. Isto pode significar que todos possuíam um certo grau de edema, dependendo do peso

do líquido intravascular de cada animal. Apenas os grupos G 250% e G 300% apresentaram diferença significativa em relação ao controle, sendo considerados verdadeiramente edemaciados, segundo este critério.

Snashall *et al.* compararam a quantidade de EVLW de cães submetidos a expansão de volume extracelular com grupo controle. Quando a expansão de volume aumentou as forças intravasculares dos capilares (devido à queda da pressão osmótica e elevação da pressão hidrostática) acima de 20 cmH₂O, houve um aumento linear do EVLW. Três cães não seguiram este padrão, apresentando aumento desproporcional da EVLW, o que foi relacionado ao transbordamento alveolar (Snashall *et al.*, 1977). Isto também foi observado no presente estudo. O ISU dos grupos G 250% e G 300% foram desproporcionalmente mais altos, e detinham os animais que apresentaram preenchimento de alvéolos.

O EP inicia-se no tecido conjuntivo perivascular, peribrônquico, seguindo para o interstício. O transbordamento alveolar ocorre quando a água extravascular do tecido pulmonar aumenta mais de 35%, e não ocorre de maneira homogênea pelo pulmão (Wu *et al.*, 1995). Porém, este fluido alveolar é derivado do filtrado microvascular, e não do espaço intersticial (tecido conjuntivo) (Zumsteg *et al.*, 1982). O espaço pleural, que atua como compartimento de reserva, parece ser recrutado apenas quando a capacidade do sistema linfático é ultrapassada e o transbordamento alveolar já ocorreu (Wiener-Kronish & Broaddus, 1993). Neste estudo, foram observados alvéolos preenchidos por líquido apenas após hidratação com volume de 2,5 vezes a volemia ou mais.

A microscopia óptica do pulmão pode gerar evidências qualitativas do dano pulmonar, edema, transbordamento de alvéolos, espessamento dos septos

alveolares e compressão de vias aéreas. Pode ser facilmente detectado o acúmulo de hemácias, leucócitos e transudato nos espaços alveolares. Uma avaliação mais detalhada de alterações celulares no tecido pulmonar requer microscopia eletrônica. Esta pode ajudar a diferenciar edemas causados por aumento da pressão hidrostática daqueles oriundos de alterações endoteliais (Parker & Townsley, 2004). Exatamente como descrito no trabalho de Parker *et al.* e também de Wu *et al.* (Wu *et al.*, 1995), foi observada maior presença de edema nos espaços perivasculares pulmonares dos animais dos grupos G 50%, G 100%, G 150% e G 200%. Nos animais dos demais grupos (G 250% e G 300%) esta diferença não foi bem observada devido ao grande edema que se apresentava em praticamente todo o corte histológico. Embora os grupos G 150%, G 200%, G 250% e G 300% terem apresentado aumento significativo do edema na avaliação estatística, foram considerados como efetivamente edemaciados apenas os ratos dos últimos dois grupos. Isto porque, apenas nos animais onde a hidratação foi de 2,5 e 3 vezes a volemia, houve uma alteração do padrão de inchaço tecidual, ocupando todo o pulmão tanto quanto os espaços perivasculares. Além destes grupos terem sido os únicos a apresentar animais com transbordamento de líquido para os alvéolos. Interpretação esta também realizada por Leal Filho *et al.*, que avaliaram a presença de EP pela quantidade de alvéolos que continham líquido eosinofílico em seu interior (Leal Filho *et al.*, 2005).

O EP causado pela alteração de permeabilidade é mais comumente relacionado a processos inflamatórios sistêmicos, como pneumonias ou estados pós-operatórios, queimaduras, trauma ou sepse. Embora algumas situações de EP por aumento da permeabilidade sejam atribuídas aos efeitos de toxinas no endotélio dos pulmões, há progressivamente mais evidências que as citocinas tenham o papel fundamental. Estas tem como efeito a ativação do endotélio, na expressão de moléculas

de adesão e na quimiotaxia leucocitária. A ligação entre as citocinas e a ativação neutrofílica está clara, porém seu efeito direto sobre a formação do edema permanece obscuro. A presença de atividade inflamatória, com migração de leucócitos pode diferenciar histologicamente o EP por alteração da permeabilidade capilar do causado por desequilíbrio eletrolítico e/ou pressórico entre os compartimentos (Pittet *et al.*, 1997). Os cortes histológicos de pulmões observados neste estudo não apresentaram presença desproporcional de células leucocitárias fora dos vasos, isto caracterizou a lesão pulmonar exclusiva por diferencial pressórico, já que os eletrólitos não sofreram significativas alterações.

Hogg *et al.*, em 1972, utilizando cães, dividiram a resistência das vias aéreas com um *bypass* biventricular e observaram que ela aumentou quando a pressão no átrio esquerdo aumentou. Isto foi reversível até quando a pressão no átrio esquerdo não superou 15 mmHg. Acima deste valor, a resistência periférica aumentou gradativamente e não foi mais reversível. As alterações de resistência nas vias aéreas centrais foram menos consistentes. Concluíram que o aumento inicial da resistência nas vias aéreas periféricas provavelmente ocorreu pela competição de espaço entre as arteríolas e as pequenas vias aéreas nas unidades bronco-vasculares (Hogg *et al.*, 1972). Esta constatação provavelmente explique a presença progressiva de parada respiratória nos animais deste estudo, sendo transitória até o G 200%, onde possivelmente não tenham atingido um valor pressórico no átrio esquerdo proporcional aos 15mmHg encontrado por Hogg *et al.* em cães. No G 250%, alguns animais (25%) apresentaram parada respiratória irreversível, evoluindo ao óbito. No G 300% esta evolução ocorreu com todos os animais.

A execução deste modelo experimental foi simples e não exigiu treinamento em microcirurgia. Seu método e resultados podem ser utilizados em novas

pesquisas que envolvam a administração de grandes quantidades de líquido, como estudos de hemorragia, choque, alteração da coagulação, prevenção de trombose, hemodiluição, hidratação e hipervolemia.

Os efeitos da infusão aguda de grandes volumes de líquido por via intravenosa foram aqui descritos. O resultado da manutenção deste estado de hipervolemia por tempo prolongado necessita ainda ser avaliado. A oferta adicional de oxigênio por cateter nasal, máscara ou tubo endotraqueal com pressão positiva possivelmente resultaria em novos números e conclusões. A extrapolação dos dados aqui apresentados para a prática clínica em humanos deve ser feita com cautela.

Conclusão

A infusão de volume igual à volemia do animal não alterou significativamente a frequência cardíaca, respiratória, oximetria de pulso e não produziu parada respiratória em ratos. Quando administrado até o volume igual à 1,5 vez a volemia do animal não alterou significativamente os parâmetros laboratoriais de pO_2 , pCO_2 , sódio, potássio, cloro, bicarbonato e saturação venosa de oxigênio. A hidratação com solução de Ringer com lactato produziu acidose severa nos ratos apenas após infusão de volume correspondente a 2,5 vezes da volemia. O modelo experimental descrito foi eficaz na promoção de hemodiluição em todos os grupos de estudo.

A infusão no volume de 50% da volemia já pode gerar acúmulo de líquido nos pulmões; porém o edema pulmonar apresenta-se bem caracterizado pelo método gravimétrico e histológico, apenas em hidratações com volumes iguais ou superiores a 2,5 vezes da volemia.

A administração de volume correspondente a 3 vezes o valor da volemia foi letal em todos os animais submetidos a esta hidratação.

Bibliografia

Barsoum N, Kleeman C. Now and then, the history of parenteral fluid administration. *Am J Nephrol*. 2002; 22: 284-289.

Brito MVH, Cunha ICC, Aragon MG, Braga TGM, Lima FD. Efeitos da estocagem sanguínea em gelo na bioquímica e gasometria arterial de ratos. *Acta Cir Bras*. 2008; 23(5): 462-468.

Ceneviva R, Vicente YAMVA. Equilíbrio hidroeletrólítico e hidratação no paciente cirúrgico. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008; 41(3): 287-300.

Conselho Federal De Medicina Veterinária. Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia de animais. Disponível em: <http://www.cfmv.gov.br/portal/_doc/guiabbp_eutanásia_animal.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

Cosnett JE. The origins of intravenous fluid therapy. *Lancet*. 1989; 1(8641): 768-71.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFPP. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(1): 103-11.

Farina JA, Piccinato CE, Rossi MA, Mazzer N, Llorach-Velludo MA. Effect of isovolemic hemodilution with 3% albumin on thrombus formation at venous microanastomosis in rats. *Microsurgery*. 2002; 22: 152-157.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005; 20(2): 28-34.

Fukuda N, Folkesson HG, Matthay MA. Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies. *J Appl Physiol*. 2000; 89: 672–679.

Hedlund LW, Putman CE. Methods for detecting pulmonary edema. *Toxicol Ind Health*. 1985; 1(2):59–68.

Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Fontelles MJP. Modelo experimental de choque hemorrágico. *Acta Cir. Bras*. 2003; 18(5): 465-470.

Hogg JC, Agarwal JB, Gardiner AJS, Palmer WT, Macklem PT. Distribution of airway resistance with developing pulmonary edema in dogs. *J Appl Physiol*. 1972; 32: 20-24.

Holte K, Sharrock NE, Kehlet H. Pathophysiology and clinical implications of perioperative fluid excess. *Br J Anaesth*. 2002; 89(4): 622-32

Jacob M, Chapell D, Hofmann-Kiefer K, Helfen T, Schuelke A, Jacob B, Burges A, Conzen P, Rehm M. The intravascular volume effect of Ringer's lactate is below 20%: a prospective study in humans. *Crit Care*. 2012; 16(3): R86.

John Hopkins University. Animal care an use. Disponível em: <<http://web.jhu.edu/animalcare/rdf/index.html>>. Acesso em: 23 jan. 2012.

Katzenelson R, Perel A, Berkenstadt H, Preisman S, Kogan S, Sternik L, Segal E. Accuracy of transpulmonary thermodilution versus gravimetric measurement of extravascular lung water. *Critical Care Medicine*. 2004; 32(7): 1550-54.

Kramer GC, Svensen CH, Prough DS. To bolus or not to bolus - is that the question? *Clin Sci (Lond)*. 2001; 101(2): 181-3.

Kurbel S, Maric S. Gibbs-Donnan effects & traffic between fluid compartments: A digest for students. *Am Biol Teach*. 2009; 71(5): 269-270.

Leal Filho MB, Morandin RC, Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges G, Gontijo JAR. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(4): 990-996.

Messmer K. Hemodilution. *Surg Clin North Am*. 1975; 55(3): 659-78.

Moriya T, Martins ACP, Cherri J, Piccinato CE, Okano N, Carneiro JJ, Iwakura R. Hidratação e equilíbrio ácido-base em pacientes cirúrgicos. *Acta Bras Cir*. 2000; 15(2): 34-38.

Muir AL, Flenley DC, Kirby BJ, Sudlow MF, Guyatt AR, Brash HM. Cardiorespiratory effects of rapid saline infusion in normal man. *J Appl Physiol*. 1975; 38: 786–793.

Oliveira ES, Guimarães SB, Gadelha DD, Araújo Filho AM, Vasconcelos PRL. Alterações metabólicas, in vivo, induzidas por oclusão carotídea bilateral, no sangue e tecido ocular de ratos Wistar. *Acta Cir Bras*. 2003; 18(4): 308-313.

Olsson J, Svensen CH, Hahn RG. The volume kinetics of acetated Ringer's solution during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 2004; 99: 1854-60.

Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286: 231-246.

Pearce ML, Yamashita J, Beazell J. Measurement of pulmonary edema. *Circ Res*. 1965; 16:482–8.

Pellegrino R, Dellaca R, Macklem PT, Aliverti A, Bertini S, Lotti P, Agostoni PG, Locatelli A, Brusasco V. Effects of rapid saline infusion on lung mechanics and airway responsiveness in humans. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 728–734.

Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1187–1205.

Rivera AM, Strauss KW, Van Zundert A, Mortier E. The history of peripheral intravenous catheters: how little plastic tubes revolutionized medicine. *Acta Anaesthesiol Belg*. 2005; 56(3): 271-82.

Rocha PN. Uso de bicarbonato de sódio na acidose metabólica do paciente gravemente enfermo. *J Bras Nefrol*. 2009; 31(4): 297-306.

Schott C. Ringers Lactate, Normal Saline or Albumin: which is the best for fluid resuscitation? *E M Journal Club*. 2010; Disponível em: <http://www.emjournalclub.com/uploads/Ringers_Lactate_vs._Normal_Saline_Schott_1.2010.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

Shires GT, Browder LK, Steljes TPV, Williams SJ, Browder TD, Barber AE. The effect of shock resuscitation fluids on apoptosis. *Am J Surg*. 2005; 189(1): 85-91.

Snashall PD, Weidner WJ, Staub NC. Extravascular lung water after extracellular fluid volume expansion in dogs. *J Appl Physiol*. 1977; 42(4):624-629.

Steiner M, Katz RJ, Baldrighi G, Carroll BJ. Motivated behavior and the estrous cycle in rats. *Psychoneuroendocrino*. 1981; 6 (1): 81-90.

Svensen CH, Rodhe PM, Olsson J, Borsheim E, Aarsland A, Hahn RG. Arteriovenous differences in plasma dilution and the distribution kinetics of lactated ringer's solution. *Anesth Analg*. 2009; 108(1): 128-33.

Svensen CH, Rodhe PM, Prough DS. Pharmacokinetic aspects of fluid therapy. Best practice & research. *Clinical Anaesthesiology*. 2009; 23(2): 213-24.

Taborda C, Mehnert DU, Silva CA. Manual de normas técnicas. Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, 2004.

Viterbo F, Siclovan H. Prevention of thromboembolism by saline solution perfusion. *Aesth Plast Surg*. 2006; 30: 629-630.

Wiener-Kronish JP, Broaddus VC. Interrelationship of pleural and pulmonary interstitial liquid. *Annu Rev Physiol*. 1993; 55: 209-226.

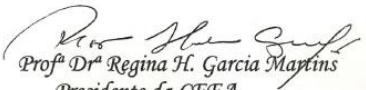
Wu DX, Weibel ER, Bachofen H, Schurch S. Lung lesions in experimental hydrostatic pulmonary edema: an electron microscopic and morphometric study. *Exp Lung Res*. 1995; 21: 711-730.

Yoshikawa S, Reynolds SD, Parker JC. Ventilator induced lung injury detected by plasma levels of Clara cell specific protein in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: A775.

Zumsteg TA, Havill AM, Gee MH. Relationships among lung extravascular fluid compartments with alveolar flooding. *J Appl Physiol*. 1982; 53(1): 267-271.

Anexos

Anexo 1 - Certificado de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.

	
	
Certificado	
<i>Certificamos que o Protocolo n.º 799 sobre o projeto de pesquisa "Determinação do limite máximo de hidratação em ratos", de autoria de Flavio A. F. Stillitano de Orgaes, com a colaboração de Bruno Pires do Amaral Marques, orientados pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</i>	
<i>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/04/2010.</i>	
 Prof.ª Dr.ª Regina H. Garcia Martins Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br	
Comissão Ética em Exp. Animal F.S. nº 28	