

Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Fisiologia em Clínica Médica

Rafaelle Batistella Pires

***COMPARAÇÃO ENTRE POSIÇÃO PRONA E
POSIÇÃO SUPINA, ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO
OSCILATÓRIA DE ALTA FREQUÊNCIA, EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA***

Botucatu – SP

2013

Rafaelle Batistella Pires

***COMPARAÇÃO ENTRE POSIÇÃO PRONA E
POSIÇÃO SUPINA, ASSOCIADAS À
VENTILAÇÃO OSCILATÓRIA DE ALTA
FREQUÊNCIA, EM MODELO EXPERIMENTAL
DE LESÃO PULMONAR AGUDA***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica

Orientador: Prof. Adjunto Dr. José Roberto Fioretto

Botucatu – SP

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*

Pires, Rafaelle Batistella.

Comparação entre posição prona e posição supina, associadas à ventilação oscilatória de alta frequência, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda / Rafaelle Batistella Pires. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: José Roberto Fioretto

Capes: 40101002

1. Síndrome do desconforto respiratório. 2. Insuficiência Respiratória.
3. Respiração artificial. 4. Posição prona. 5. Posição supina. 6. Coelho como animal de laboratório.

Palavras-chave: Lesão pulmonar aguda; Posição prona; SDRA; Ventilação oscilatória de alta frequência; Ventilação protetora; VOAF.

RAFAELLE BATISTELLA PIRES**COMPARAÇÃO ENTRE POSIÇÃO PRONA E POSIÇÃO SUPINA, ASSOCIADAS À
VENTILAÇÃO OSCILATÓRIA DE ALTA FREQUÊNCIA, EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientador: Prof. Adjunto Dr. José Roberto Fioretto

Comissão examinadora

Prof. Adjunto Dr. José Roberto Fioretto
Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,

Prof. Dr Mário Ferreira Carpi
Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,

Prof. Dr. Carlos Fernando Ronchi
Universidade do Sagrado Coração
USC - Bauru

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Dedico este trabalho:

*A **Deus**, que me protege e me abençoa a cada dia, permitindo que eu alcance todos os meus feitos.*

*A meu esposo **Rafael**, meu companheiro e acolhedor nas horas difíceis, pelo apoio incondicional, pela compreensão das horas ausentes, por todo carinho e amor a mim dedicados.*

*A meus pais, **Antonio e Maria**, e irmãos **Rafael e Diego**, pelo apoio, amor e dedicação de toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

A meu orientador **Dr. José Roberto Fioretto**, por todo o ensinamento, confiança e dedicação recebidos por todos esses anos, desde a faculdade, residência e especialização, no início de minha carreira profissional e que se mantém agora nesta realização tão importante de minha vida.

Aos colegas da UTI-Pediátrica, **Mário, Sandra, Rossano e Marcos**, que um dia foram meus mestres, depois colegas de trabalho, e hoje grandes amigos. À **Khristiani**, companheira de república, amiga incondicional, companheira de trabalho e comadre. Em especial ao Dr. Mário e ao Dr. Marcos, que participaram ativamente deste trabalho.

À Prof Dr. **Cilmery Suemi Kurokawa** e aos funcionários do Laboratório de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria: **Paulinho, Regina, Cristina e Renata**, pela disponibilidade, dedicação e participação neste trabalho, permitindo sua conclusão.

Às minhas colegas pós-graduandas **Suziane e Débora** e também aos **alunos de iniciação científica** que, em algum momento, fizeram parte deste trabalho.

A todos os colegas, médicos, docentes e funcionários do **Departamento de Pediatria da FMB**. Em especial aos secretários **Fabiano, Adriana e Paulo**, por todo auxílio, disponibilidade e apoio.

A meus **amigos e amigas** por todo apoio.

Resumo

PIRES RF. **Comparação entre posição prona e posição supina, associadas à ventilação oscilatória de alta frequência, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) cursa com alta mortalidade apesar do melhor entendimento de sua fisiopatologia e avanços no tratamento. A Ventilação Oscilatória de Alta Frequência (VOAF) é método protetor por utilizar baixos volumes correntes (VC). Existem terapias adjuvantes à ventilação, dentre as quais se destaca a posição prona, que possibilita homogeneização da distribuição do VC e promove recrutamento alveolar. O objetivo foi investigar o efeito da posição prona associada à VOAF sobre a oxigenação, inflamação, histologia e dano oxidativo pulmonares, comparando-a com a posição supina neste mesmo modo ventilatório em modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida em coelhos. Trinta coelhos foram instrumentados com traqueostomia e acessos vasculares e ventilados. A LPA foi induzida por infusão traqueal de salina aquecida (30mL/Kg, 38°C). Os coelhos foram submetidos à VOAF e divididos em dois grupos (n=15), um ventilado em posição supina (GS) e outro em posição prona (GP). VOAF foi iniciada com pressão aérea média de 16 cmH₂O, que foi diminuída a cada 30 minutos até 10-11 cmH₂O. Nos últimos 30 minutos os coelhos foram reposicionados em posição supina. Parâmetros ventilatórios e hemodinâmicos foram registrados a cada 30 minutos durante 150 minutos. Os desfechos foram: oxigenação, avaliada pela relação PaO₂/FiO₂ e índice de oxigenação (IO); inflamação pulmonar, avaliada pela porcentagem de polimorfonucleares (PMN) no lavado broncoalveolar (BAL) e pelo nível de TNF-alfa medido no BAL e no tecido pulmonar nas áreas ventral e dorsal; estresse oxidativo tecidual pulmonar, determinado pelo método de peroxidação lipídica (malondialdeído); e lesão tecidual pulmonar, determinada por escore histológico de lesão por área pulmonar. O nível de significância avaliado foi 5%. Após a indução, os grupos apresentaram comportamentos semelhantes, com diminuição da relação PaO₂/FiO₂ [GS inicial: 447,6 (364,2-492,8) > GS depois: 72,1 (52,1-86,2); e GP inicial: 481,7 (428,4-493,9) > GP depois: 64,5 (48,3-81,9), p<0,05] e aumento do IO [GS inicial: 1,5 (1,4-2,1) < GS depois: 13,7 (11,2-21,2) e GP inicial: 1,4 (1,4-1,7) < GP depois: 14,7 (11,8-21,3) cmH₂O/mmHg; p<0,05]. Após início da VOAF, o GP recuperou o IO mais rapidamente (aos 90 minutos) que o GS (aos 120 minutos) para valores prévios à LPA. A porcentagem de PMN recuperados do BAL não apresentou diferença entre os grupos (p>0,05). TNF-alfa foi menor no BAL do GP em relação ao GS (GP: 0,32±0,25 < GS: 0,95±0,89ng/ml; p<0,05) e no tecido pulmonar apresentou este mesmo perfil para a região dorsal dos grupos [GP: 14,1 (5,5-30,3) < GS: 36,6 (22,0-51,7) ng/ml, p<0,05], mas sem diferença entre as regiões ventrais [GS: 8,4 (5,1-11,5) = GP: 8,3 (3,9-15,2) ng/ml, p>0,05]. O escore de lesão histológica foi maior para GS que para GP (p<0,05), sem diferença estatística entre as regiões ventral e dorsal de ambos. Não houve diferença entre os grupos para peroxidação lipídica. Concluímos que a posição prona reduz a lesão pulmonar inflamatória e histolopatológica em modelo de LPA induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a VOAF.

Palavras-chave: Lesão pulmonar aguda; Posição prona; SDRA; Ventilação de alta frequência; Ventilação protetora; VOAF.

Fomento: FAPESP (2010/06242-8).

Abstract

PIRES RF. Comparison between prone and supine position, associated to high frequency oscillatory ventilation in an experimental acute lung injury model. 2013. Thesis (Master) – Botucatu Medical School, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, 2013.

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) has been associated to high mortality rate despite better understanding of its pathophysiology and advances in treatment. High-frequency oscillatory ventilation (HFOV) is a protective ventilatory method because of using low tidal volume (V_T). There are also many adjunctive therapies, of which prone position is known to allow homogenization of V_T distribution and to promote alveolar recruitment. The objective was to investigate the prone position and HFOV association effects on oxygenation, inflammation, oxidative damage and lung histology, comparing to the supine position in this same ventilation mode, in experimental acute lung injury (ALI) induced in rabbits. Thirty rabbits were instrumented with tracheotomy and vascular catheters and ventilated. ALI was induced by tracheal infusion of warm saline (30mL/Kg, 38°C). Rabbits were submitted to HFOV and divided in two groups (n=15), one ventilated in supine position (SG), and the other in prone position (PG). HFOV was initiated with mean airway pressure of 16 cmH₂O, which was decreased each 30 minutes until 10-11 cmH₂O. In the last 30 minutes, all rabbits were repositioned to supine position. Ventilatory and hemodynamic parameters were recorded every 30 minutes for 150 minutes. The outcomes were: oxygenation, measured by PaO₂/FiO₂ ratio and oxygenation index (OI); lung inflammation, assessed by the percentage of polymorphonuclear cells (PMN) in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and by the level of TNF- alpha measured in BAL and in lung tissue, in ventral and dorsal areas; lung tissue oxidative stress, determined by the method of lipid peroxidation (malondialdehyde); and lung tissue damage, as determined by a histological score of injury, in each lung area. A significance level of 5% was evaluated. After induction, groups have shown the same behavior, decreasing PaO₂/FiO₂ ratio compared to the moment before the lung injury [SG before: 447.6 (364.2-492.8) > SG after: 72.1 (52.1-86.2); and PG before: 481.7 (428.4-493.9) > PG after: 6.5 (48.3-81.9); p<0.05] and increased the OI [SG before: 1.5 (1.4-2.1) < SG after: 13.7 (11.2-21.2); and PG before: 1.4 (1.4-1.7) < PG after: 14.7 (11.8-21.3) cmH₂O/mmHg; p<0.05]. After HFOV initiated, PG showed faster recovered of OI to values similar to before the injury (at 90 minutes) than SG (at 120 minutes). PMN percentage recovered in the BAL was not different between the two groups (p>0,05). TNF-alpha levels were lower in PG BAL than in SG (PG: 0.32±0.25 < SG: 0.95±0.89 ng/ml; p<0.05) and, in the lung tissue, showed this same change to the dorsal area [PG: 14.1 (5.5-30.3) < SG: 36.6 (22.0-51.7) ng/ml, p<0.05]. However, no statistical difference was seen between ventral areas [SG: 8.4 (5.1-11.5) = PG: 8.3 (3.9-15.2) ng/ml, p>0.05]. The histological damage score was higher to the SG than the PG (p<0.05), but no statistically difference between ventral and dorsal areas of each groups was showed. No difference was seen regarding lipid peroxidation. The conclusion was that prone position reduces inflammatory and histopathologic injury in lung tissue in experimental warm saline induced ALI model in rabbits submitted to HFOV.

Key words: Acute lung injury; Prone position; ARDS; High frequency oscillatory ventilation; Protective ventilation; HFOV.

Support: FAPESP (2010/06242-8).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração representativa do protocolo de estudo	28
Figura 2 – Pressão arterial média (PAM) ao longo do tempo para os grupos experimentais	34
Figura 3 – Evolução da relação PaO_2/FiO_2 no período experimental	37
Figura 4 – Evolução do índice de oxigenação ($MAP \times FiO_2 \times 100/PaO_2$) no período experimental	38
Figura 5 – Representação dos níveis teciduais de malondialdeído nas regiões ventral e dorsal dos grupos prona e supino na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey	39
Figura 6 – Porcentagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar para os grupos prona e supino.....	40
Figura 7 – Valores de TNF-alfa (ng/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos prona e supino.....	41
Figura 8 – Representação dos níveis de TNF-alfa (ng/ml) no tecido pulmonar das regiões ventral e dorsal dos grupos supino e prona na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey.....	42
Figura 9 – Escore de lesão histológica no tecido pulmonar, nas regiões ventral e dorsal dos grupos prona e supino	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Variáveis de comparação dos grupos supina e prona antes e depois da indução da lesão pulmonar 35
- Tabela 2** – Variáveis de comparação dos momentos antes e depois da indução da lesão pulmonar em cada grupo 36

LISTA DE ABREVIATURAS

LPA	Lesão pulmonar aguda
LPIVM	Lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
VM	Ventilação mecânica
VMC	Ventilação mecânica convencional
V/Q	Relação ventilação/ perfusão
VOAF	Ventilação oscilatória de alta frequência
IO	Índice de oxigenação
MAP	Pressão de via aérea média
PEEP	Pressão expiratória final positiva
PIP	Pressão inspiratória de pico
VC	Volume corrente
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
PaO ₂	Pressão arterial de oxigênio
PaCO ₂	Pressão arterial de dióxido de carbono
pH	Potencial hidrogeniônico
BAL	Líquido broncoalveolar
IL-8	Interleucina-8
MDA	Malondialdeído
PMN	Polimorfonucleares
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral-alfa
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
PAM	Pressão arterial média
Ti	Tempo inspiratório
et al.	Colaboradores
bpm	Batimentos por minuto
cmH ₂ O	Centímetros de água
Hz	Hertz
Kg	Kilo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mg	Miligrama
ng	Nanograma
µg	Micrograma
H	Horas
min	Minutos
°C	Graus Celsius
GS	Grupo Supino
GP	Grupo Prona
USA	Estados Unidos da América
SD	Desvio padrão
NNMU	N-nitroso-N-metiluretano

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	22
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1. <i>Obtenção e preparo dos animais</i>	<i>25</i>
3.2. <i>Instalação do modelo de lesão pulmonar aguda</i>	<i>27</i>
3.3. <i>Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica.....</i>	<i>27</i>
3.4. <i>Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar.....</i>	<i>29</i>
3.5. <i>Medida da concentração de TNF-alfa em lavado broncoalveolar e tecido pulmonar.....</i>	<i>29</i>
3.6. <i>Medida da peroxidação lipídica.....</i>	<i>29</i>
3.7. <i>Manipulação dos pulmões e Histologia Pulmonar</i>	<i>30</i>
3.8. <i>Variáveis analisadas</i>	<i>31</i>
3.9. <i>Análise Estatística.....</i>	<i>32</i>
4. RESULTADOS	33
4.1. <i>Hemodinâmica, Mecânica Pulmonar e Trocas Gasosas</i>	<i>34</i>
4.2. <i>Lesão Pulmonar Oxidativa</i>	<i>39</i>
4.3. <i>Processo Inflamatório Alveolar.....</i>	<i>40</i>
4.4. <i>Histopatologia</i>	<i>43</i>
5. DISCUSSÃO	44
5.1. <i>Escolha da espécie animal</i>	<i>45</i>
5.2. <i>Manipulação dos animais.....</i>	<i>45</i>
5.3. <i>Modelo de Lesão Pulmonar Aguda.....</i>	<i>46</i>
5.4. <i>Características gerais dos grupos</i>	<i>49</i>
5.5. <i>Resposta à posição prona em VOAF</i>	<i>49</i>
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
APÊNDICE A – MODELO DE PROTOCOLO UTILIZADO.....	60

1. INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é doença grave e potencialmente fatal.¹ Caracteriza-se por processo inflamatório que leva à quebra da barreira alvéolo-capilar com desenvolvimento de edema intersticial e alveolar, diminuição da complacência pulmonar, hipertensão pulmonar, desequilíbrio da relação ventilação/perfusão e hipoxemia refratária à administração de oxigênio.² Apesar do melhor entendimento da fisiopatologia e do avanço tecnológico observado na monitoração e tratamento de pacientes com SDRA, a mortalidade permanece elevada, acima de 30%.³⁻⁵

A ventilação pulmonar mecânica (VM) constitui um dos pilares do tratamento da síndrome, sendo capaz de modificar a evolução da doença. Existem dois métodos ventilatórios de proteção pulmonar utilizados na SDRA, um baseado na VM convencional (VMC) e outro na ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF).

Baseado no conceito de comprometimento homogêneo do parênquima pulmonar que prevalecia até a metade dos anos de 1980, o suporte ventilatório na SDRA era fornecido utilizando-se elevados valores de volume corrente (VC), 10 a 15 mL/Kg, bem acima daquele empregado em pacientes sem doença pulmonar (6 a 8 mL/Kg). Tal VC era utilizado com o objetivo de normalizar a PaCO₂, a PaO₂ e o pH, sendo a pressão inspiratória (PIP) liberada para valores tão elevados quanto 40-45 cmH₂O. Posteriormente, contribuiu grandemente para o entendimento da doença, por meio de estudo tomográfico dos pulmões, a observação de que o comprometimento do parênquima pulmonar na SDRA não é homogêneo, existindo áreas de pulmão normal.⁶ Paralelamente, diversas publicações⁷⁻⁹ alertaram para a lesão pulmonar induzida pela VM (LPIVM) ao se utilizar elevados valores de VC e de pico de pressão, até então empregados rotineiramente. A LPIVM pode ser definida como lesão que simula a lesão pulmonar aguda e que ocorre em pacientes submetidos à VM. Ciclos sucessivos de abertura e fechamento dos alvéolos e o consequente desenvolvimento de atelectasia contribuem para a lesão pulmonar, a qual se origina do padrão ventilatório utilizado para o suporte da oxigenação e da ventilação. Essa mudança cíclica no volume pulmonar parece ser causa importante de LPIVM, sugerindo que uma estratégia ventilatória que evite grandes variações no

volume pulmonar poderia ser benéfica.^{10,11} Assim, a ideia que predomina atualmente é a de que o emprego de altos volumes correntes, que geram altas pressões inspiratória e de platô, determina lesão estrutural em áreas de pulmão até então saudáveis, agravando a hipoxemia e piorando a evolução dos pacientes com SDRA. A VM mais agressiva pode, também, propiciar lesão alveolar inflamatória, mimetizando as lesões anatomopatológicas da síndrome em áreas pulmonares saudáveis¹²⁻¹⁶ e aumentar o risco de desenvolvimento de síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (biotrauma).¹⁷

Assim é que em 2000, o grupo *The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*¹⁷ comparou o uso da ventilação mecânica tradicional com a ventilação com VC baixo (6 mL/kg) e pressão de platô limitada em 30 cmH₂O. O trabalho teve que ser interrompido depois da inclusão de 861 pacientes, pois a mortalidade foi significativamente menor no grupo ventilado com VC baixo. Surgiu, então, o conceito de ventilação mecânica convencional protetora.

A recomendação atual para a VMC protetora na SDRA é a utilização de VC baixo (5 a 8 mL/Kg), pressão inspiratória de platô limitada em 30 cmH₂O e pressão expiratória final positiva (PEEP) otimizada, em modos limitados a pressão,¹⁷ permitindo que a saturação arterial de oxigênio fique entre 88-90% (hipoxemia permissiva) e que a PaCO₂ atinja valores de até 100 mmHg (hipercapnia permissiva).¹⁸

Embora a VMC protetora seja efetiva para a maioria dos pacientes, há um número significativo deles que apresenta insuficiência respiratória grave e nos quais a ela pode não garantir a oxigenação e a ventilação. Além disso, a PEEP elevada pode causar superdistensão alveolar devido aos altos picos de pressão gerados.¹⁹ Acrescenta-se que o emprego de VC baixo pode diminuir o volume pulmonar, levando a colapso alveolar, com agravamento da hipoxemia.^{20,21} Nestes casos, quando a proteção pulmonar é mandatória, a VOAF passa a ser uma alternativa atraente.²²

A VOAF é método ventilatório que utiliza VC mais baixo que o volume do espaço morto anatômico (1-3 mL/Kg) com frequência bem acima da fisiológica (3-15 Hertz), evitando as elevadas pressões e os volumes alveolares típicos da VMC.²³ É

método ventilatório único, pois a inspiração e a expiração são ativas, sendo a oxigenação modificada por ajustes da pressão aérea média (MAP), a qual controla a insuflação pulmonar de modo semelhante à PEEP.²⁴

Inicialmente, a VOAF foi utilizada como estratégia de resgate quando outros modos de ventilação falhavam.^{25,26} Em 1997, Fort et al.²⁵ descreveram o uso da VOAF em 17 adultos com SDRA e observaram melhora da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e do índice de oxigenação (IO) em 13 pacientes, com 53% de mortalidade. Subsequentemente, vários outros autores publicaram sua experiência com este modo ventilatório. Em 2002, o MOAT (*Multicenter Oscillatory Ventilation for Acute Respiratory Distress Syndrome Trial*) comparou a ventilação de alta frequência com a ventilação convencional com pressão-controlada. A VOAF aumentou mais rapidamente a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ quando comparada com a ventilação convencional.²⁷ Os autores concluíram que a VOAF é segura e efetiva para tratamento da SDRA. Mehta et al.²⁸ concluíram que a VOAF tem efeitos benéficos sobre a oxigenação, que pode ser tratamento de resgate efetivo na hipoxemia grave e que sua instituição precoce pode ser vantajosa.

Em pediatria, a VOAF foi inicialmente utilizada com sucesso em neonatos^{22,29,30} e, apesar do aumento da utilização deste modo ventilatório em crianças com SDRA, existem apenas treze publicações sobre mortalidade,³¹ poucos estudos prospectivos^{22,32,33} e apenas um estudo randomizado e controlado.²² Ben Jaballah et al.³¹ demonstraram em estudo clínico prospectivo de 12 crianças com SDRA que a VOAF melhora a troca gasosa de modo rápido e sustentado nos pacientes que apresentaram falha com a VMC.

Estudos em animais sugeriram que a VOAF reduz a LPIVM.³⁴⁻³⁷ Imai et al.³⁴ estudaram coelhos nos quais a SDRA foi induzida por meio de lavagem pulmonar com solução salina aquecida, comparando a VOAF com duas outras estratégias protetoras de ventilação mecânica (VC baixo, 5-6 mL/Kg, com PEEP dois pontos acima do ponto de inflexão da curva pressão-volume; e VC baixo, 5-6 mL/Kg, com PEEP de 8-10 cmH_2O) e um grupo controle (VC de 10-12 mL/Kg e PEEP de 4 – 5 cmH_2O). Os autores concluíram que VOAF atenuou a diminuição da complacência pulmonar, diminuiu a inflamação pulmonar avaliada pela infiltração de leucócitos polimorfonucleares e pela concentração de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-

alfa) no espaço alveolar, e, também, diminuiu as lesões histológicas de pequenas vias aéreas e alvéolos de forma mais efetiva que as outras estratégias ventilatórias. Rotta et al.³⁵, por sua vez, também estudaram coelhos submetidos à lavagem pulmonar com salina, compararam VOAF e VMC com PEEP alta (10 cmH₂O) e baixa (2 cmH₂O), ventilação com PEEP 2 cmH₂O acima do primeiro ponto de inflexão da curva pressão-volume (estratégia protetora) e animais sem SDRA sob ventilação convencional. Os autores demonstraram que a VOAF atenuou a lesão oxidativa pulmonar avaliada pelos métodos da mieloperoxidase e malondialdeído, marcadores da leucoestase pulmonar e do dano oxidativo do compartimento lipídico, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Viana et al.³⁶ estudando coelhos com lesão pulmonar induzida pela infusão venosa de lipopolissacarídeo de *E. coli* e por lavagem pulmonar com salina. Meyer et al.³⁷, por sua vez, submeteram coelhos à lavagem pulmonar com salina para induzir SDRA e estudaram duas frequências respiratórias durante VOAF (15 Hz vs. 5 Hz) e observaram que ambas as estratégias restauraram a oxigenação e a ventilação, com o achado adicional de que a frequência mais baixa aumentou o infiltrado neutrofílico do lavado alveolar.

Em 2011, nosso grupo publicou, pela primeira vez, resultados da comparação entre VMC protetora e VOAF quanto ao estresse oxidativo total, avaliando os compartimentos aquoso e lipídico no tecido pulmonar de coelhos, concluindo que a VOAF atenua a lesão oxidativa em modelo de SDRA induzida por lavagem pulmonar com salina aquecida.³⁸

Em decorrência da alta mortalidade observada na SDRA tanto em adultos como em crianças, novas estratégias terapêuticas, adicionais à VM, vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas, destaca-se a posição prona.³⁹

Os estudos tomográficos de pulmões com SDRA descritos anteriormente, além de demonstrarem que o comprometimento pulmonar era heterogêneo, mostraram também que a lesão variava de acordo com a posição do paciente, sendo mais importante nas áreas dependentes da gravidade, ou seja, na região pulmonar dorsal e posterior, quando o paciente está em posição supina.⁶ Nesta posição, o volume reduzido de áreas pulmonares aeradas não dependentes está em risco de superdistensão e de lesão por ciclos repetidos de abertura de fechamento de unidades alveolares quando a VM é utilizada com volumes e pressões elevadas.⁴⁰

Desta forma, a colocação do paciente em posição prona passou a integrar o arsenal de terapias adjuvantes na SDRA.

A posição prona, primeiramente descrita por Bryan⁴¹, pode melhorar as trocas gasosas por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, entre os quais destacam-se: 1) redistribuição da ventilação para áreas pulmonares dorsais melhor perfundidas.⁴² Há melhora da relação V/Q nas regiões dorsais, onde o colapso pulmonar e a relação V/Q desigual predominam na posição supina;⁴³ 2) homogeneização da distribuição do VC associada com alterações na mecânica da parede torácica;⁴⁴ 3) recrutamento alveolar;⁴⁵ 4) redirecionamento de forças compressivas exercidas pelo peso do coração sobre os pulmões;⁴⁶ 5) e melhor remoção de secreções.

Estudos em animais mostraram que a posição prona melhora a oxigenação em relação a posição supina. Além disso, manobras de recrutamento alveolar parecem ser mais efetivas para melhorar a oxigenação se realizadas quando o animal está em posição prona, sendo que a manutenção do efeito destas manobras se consegue com o uso de PEEP mais baixos que na posição supina e o efeito da posição prona sobre a oxigenação é mantido após voltar a posição supina.⁴³ Foi demonstrado, em cães, que a posição prona promove LPIVM de menor gravidade e mais homogênea que a posição supina.⁴⁷ Estes resultados foram posteriormente confirmados por Valenza et al.⁴⁸, que mostraram em ratos com pulmão normal, que a posição prona retarda a evolução da LPIVM, além de permitir ventilação mais homogênea. De fato, o volume corrente preferencialmente tensiona as regiões pulmonares não dependentes na posição supina, enquanto que na posição prona o deslocamento do diafragma para baixo é mais relevante.

Em 2004, Guérin et al.⁴⁹ realizaram estudo multicêntrico, controlado e randomizado com 791 pacientes adultos com insuficiência respiratória hipoxêmica aguda ($PaO_2/FiO_2 < 300$) em VM. Não houve diferença na mortalidade de 28 dias entre os grupos prona e supina, e nem quanto ao sucesso de extubação. No entanto, a oxigenação foi melhor no grupo prona e a incidência de pneumonia associada a VM (PAV) foi significativamente menor neste grupo. No ano seguinte, Mentzelopoulos et al.⁵⁰ avaliaram 10 adultos com SDRA grave ($PaO_2/FiO_2 < 100$) sob FiO_2 de $0,79 \pm 0,07$, PEEP de $9,4 \pm 1,3$ cmH₂O e VC de $9,0 \pm 0,9$ mL/Kg ajustados para

manter a pressão de platô pulmonar abaixo de 30 cmH₂O. Os pacientes foram estudados em posição supina a 60°, depois foram colocados em prona e, por fim, novamente em decúbito a 60°. Os autores observaram redução de indicadores de estresse pulmonar parenquimatoso total e de tensão pulmonar com a posição prona. Este foi o primeiro estudo realizado em humanos que mostrou a possibilidade de redução de LPIVM quando a posição prona é adotada. Romero et al.⁵¹, em 2009, estudaram 15 adultos com SDRA grave ($PaO_2/FiO_2 < 100$) submetidos a posição prona por maior tempo, 48 horas ou mais, até atingir índice de oxigenação (IO) menor do que 10. Os autores demonstraram melhora significativa da relação PaO_2/FiO_2 e do IO, diminuição da $PaCO_2$ e da pressão de platô e aumento da complacência estática.

Em crianças com SDRA, a posição prona vem sendo avaliada em estudos clínicos de formas variadas. Relvas et al.⁵², mantiveram 40 crianças, de 1 mês a 18 anos de idade, continuamente em prona e observaram diminuição do IO, aumento da relação PaO_2/FiO_2 , em 6-10h, e melhora ainda mais acentuada da oxigenação em 18-24h, sem mudança significativa na pressão aérea média. Concluíram que a posição prona melhora a oxigenação em crianças com SDRA submetidas a VMC e que a manutenção dos pacientes em prona por mais de 12 horas está associada a melhora mais pronunciada e estável do IO comparada a períodos mais curtos. Casado-Flores et al.⁵³ utilizaram a posição prona em 23 crianças com SDRA, mudando a posição de prona para supina a cada oito horas. Observaram que três em cada quatro crianças responderam à posição prona com melhora da relação PaO_2/FiO_2 , ao passo que ao voltar para posição supina não houve melhora e até mesmo ocorreu piora da oxigenação em alguns pacientes. Das crianças que responderam à posição prona, 33% não responderam na primeira vez. Os autores concluíram que a posição prona é um procedimento simples, praticamente sem complicações, bem tolerado e que melhora a oxigenação na maioria das crianças com SDRA.

Em 2005 foi publicado estudo controlado e randomizado com 102 crianças de duas semanas a 18 anos de idade com o diagnóstico de lesão pulmonar aguda.⁵⁴ O estudo demonstrou melhora da oxigenação na maioria dos pacientes randomizados para a posição prona (20 horas/dia), caracterizando 90% deles como respondedores por melhora da oxigenação. Porém, não houve diferença significativa entre os

grupos em dias livre de VM, mortalidade, tempo de recuperação da lesão pulmonar e dias livre de falência orgânica. Em 2008, revisão sistemática da Biblioteca *Cochrane* demonstrou em crianças com SDRA que a posição prona melhora a saturação de oxigênio, a PaO_2 , o IO, a sincronia tóraco-abdominal e ocasiona menos episódios de queda da saturação.⁵⁵

Em revisão publicada em 2006, Guérin⁵⁶ concluiu que a posição prona melhora a oxigenação sem induzir ou até mesmo prevenindo a superdistensão pulmonar e a hiperinsuflação. Continuando os estudos, o assunto foi objeto de três metanálises que compararam a posição prona com a supina. Duas delas ocuparam-se apenas de trabalhos controlados e randomizados em adultos com insuficiência respiratória hipoxêmica (4 estudos com 1.271 pacientes)⁵⁷ ou com SDRA (5 estudos com 1.316 pacientes)⁵⁸. A outra metanálise avaliou adultos e crianças com insuficiência respiratória aguda (lesão pulmonar aguda ou SDRA) em estudos controlados e randomizados (13 estudos com 1.559 pacientes)⁵⁹. Todas concluíram que, apesar de melhorar a oxigenação e diminuir o risco de pneumonia associada a VM, a posição prona não se associa a diminuição da mortalidade. No entanto, há efeito benéfico nos pacientes mais graves.⁵⁸ Em 2010, Sud et al.⁶⁰ conduziram nova metanálise que avaliou estudos clínicos com adultos e crianças fora do período neonatal e concluíram que a posição prona reduziu significativamente a mortalidade em pacientes com insuficiência respiratória hipoxêmica grave ($PaO_2/FiO_2 < 100$).

Assim, a posição prona faz parte da estratégia terapêutica de proteção pulmonar, sendo maneira fisiologicamente apropriada para ser utilizada em pacientes com SDRA grave.⁶¹

Considerando-se a gravidade da maior parte dos casos de SDRA e os efeitos benéficos da VOAF e da posição prona, é possível que a associação de VOAF e de posição prona determine melhora mais acentuada da oxigenação além de reduzir a intensidade da lesão pulmonar induzida pela VM.

Poucos foram os estudos que avaliaram a associação de VOAF com a posição prona. Estudo clínico prospectivo e randomizado⁶² com 39 adultos com SDRA ($PaO_2/FiO_2 \leq 150$), após 12 horas de uso de VMC protetora em posição supina, distribuiu os pacientes em 3 grupos: 1) posição prona associada a VMC protetora; 2) posição prona associada a VOAF; 3) posição supina associada a

VOAF. Os pacientes foram ventilados nestas modalidades por mais 12 horas. Os autores analisaram a oxigenação por meio da relação PaO_2/FiO_2 e do índice de oxigenação, e a inflamação pulmonar por meio das citocinas séricas e do lavado broncoalveolar (BAL) e citologia do BAL. Os autores concluíram que a posição prona associada à VMC ou à VOAF melhorou a oxigenação dentro de 12 horas, em contraste com a posição supina associada à VOAF. Além disso, a posição prona reduziu os níveis séricos de IL-8 e o número de neutrófilos no BAL quando comparada com a posição supina associada a VOAF, indicando diminuição da inflamação pulmonar. Demory et al.⁶³ em outro estudo prospectivo e randomizado estudaram 43 pacientes com SDRA ($PaO_2/FiO_2 < 150$ em $PEEP > 5\text{cmH}_2\text{O}$) que foram divididos em 3 grupos: 1) VMC com 12 horas em posição prona e após 12 horas em posição supina; 2) VMC com 12 horas em posição prona e após 12 horas de posição supina em VOAF; 3) VMC com 12 horas em posição supina e após 12 horas desta mesma posição em VOAF. Concluíram que a posição prona melhorou a oxigenação a partir da primeira hora, o que não aconteceu no grupo ventilado inicialmente com a posição supina. A melhora só foi mantida no grupo posteriormente ventilado com VOAF. Não houve aumento da oxigenação, em nenhum momento, no grupo que permaneceu todo o tempo em posição supina, mesmo após ser colocado na VOAF. Os autores sugeriram que a VOAF é capaz de manter o recrutamento alveolar induzido pela posição prona e seu uso após a posição prona permite reduzir a FiO_2 para níveis potencialmente menos tóxicos.

Estudo experimental em porcos, nos quais a SDRA foi induzida por lavagem com salina, demonstrou que a VOAF associada à posição prona melhora a oxigenação, além de determinar redução significativa da fração de *shunt* pulmonar e normalizar o débito cardíaco com menores pressões aéreas médias que a VOAF associada à posição supina.⁶⁴

Assim, considerando as características protetoras da VOAF e a capacidade de redistribuição da ventilação para áreas pulmonares melhor perfundidas e o potencial de recrutamento da posição prona, nossa hipótese é que a somatória de efeitos benéficos da VOAF e da posição prona promova melhora mais acentuada da oxigenação, determine lesão histopatológica mais homogênea e de menor intensidade e atenua a lesão pulmonar tecidual oxidativa e inflamatória quando comparada com VOAF em posição supina.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da posição prona associada à VOAF sobre a oxigenação, inflamação, histologia e dano oxidativo pulmonar, comparando-o com a posição supina neste mesmo tipo de ventilação em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida em coelhos. Os desfechos analisados foram índices fisiopatológicos de lesão pulmonar aguda: oxigenação e trocas gasosas; histologia e dano oxidativo do pulmão; nível de TNF-alfa em lavado broncoalveolar e em homogenato de tecido pulmonar; e contagem de polimorfonucleares no fluido do lavado pulmonar.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Centro de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.1. Obtenção e preparo dos animais

Trata-se de estudo prospectivo, *in vivo* e em animais de laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o protocolo nº795. Foram utilizados coelhos jovens brancos fornecidos pelo Biotério da UNESP – Campus de Botucatu, com peso corporal variando de 2,0 a 3,0 Kg.

Após pesagem, os animais foram anestesiados e sedados com uma solução de cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg) administradas por via intramuscular. Posteriormente, os animais foram colocados em goteira cirúrgica, receberam oxigênio a 100% por meio de cateter nasal e foram submetidos à tricotomia cervical e torácica para colocação de eletrodos de monitoração da frequência cardíaca (FC). Se a FC diminuísse para valores abaixo de 180 bpm, era administrada atropina na dose de 0,01 mg/Kg por via intravenosa na veia auricular. A região anterior do pescoço dos animais foi anestesiada com xilocaína 2% para realização de traqueostomia, dissecação da artéria carótida e veia jugular interna. A traqueostomia foi realizada e, então, foi introduzido tubo traqueal de maior calibre possível (diâmetro interno de 3,0 a 3,5 mm, *Portex, Hythe, UK*), mantido em posição por meio de fita cirúrgica. Imediatamente, foi iniciada a ventilação mecânica com o aparelho *Galileo Gold (Hamilton Medical AG, Suíça)*. Os parâmetros ventilatórios iniciais foram: modo pressão-regulada volume controlado, com VC alvo de 6 mL/Kg; frequência respiratória (FR) de 40 ciclos por minuto, ajustada de acordo com a PaCO₂; tempo inspiratório (Ti) de 0,5 segundo; Pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH₂O; e fração inspirada de O₂ (FiO₂) de 1,0. Estes parâmetros foram mantidos por período de estabilização de 10 minutos até o momento da indução da lesão pulmonar.

Depois da traqueostomia, foram dissecadas a artéria carótida e a veia jugular interna. Na artéria foi introduzido um cateter de lúmen único (22 Gauge Jelco, *Introcan® Safety™* - B-Braun, Melsungen, Germany) e na veia um cateter de duplo lúmen (5^{Fr.} - Arrow International Inc., Reading, Philadelphia-USA), introduzido até a junção entre o átrio direito e a veia cava superior. O cateter arterial foi utilizado para obtenção de gasometrias e para monitoração contínua da pressão arterial média (PAM) com auxílio de um sistema de monitoração de pressão (*LogiCal®* da Medex, Dublin, USA) conectado a monitor multiparamétrico (*Dixtal, Manaus, Brasil*). O cateter na veia cava foi utilizado para administração de sedativos em infusão contínua, soro de manutenção e drogas vasoativas.

Obtidos os acessos vasculares, a anestesia foi mantida por meio de administração intravenosa contínua de 10 mg/Kg/h de cetamina até a conclusão do experimento. Além disso, os animais foram submetidos a bloqueio neuromuscular por meio da administração intravenosa de 0,2 mg/Kg de pancurônio, sendo o bloqueio mantido com doses adicionais de 0,1 mg/Kg a cada 30 a 60 minutos. Em qualquer momento do experimento, caso a pressão arterial média (PAM) atingisse valores inferiores a 50 mmHg, iniciava-se infusão intravenosa contínua de noradrenalina em dose inicial de 0,5 µg/Kg/min, com aumentos até 2 µg/Kg/min se fosse necessário.

Durante o experimento, a temperatura corporal foi monitorada com o auxílio de um termômetro de mercúrio por via retal, sendo mantida entre 38 e 40°C com auxílio bolsas térmicas, e a volemia mantida por meio de infusão contínua de 4 mL/Kg/h de solução salina acrescida de 5% de dextrose.

3.2. Instalação do modelo de lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) foi induzida conforme técnica previamente descrita pelo grupo.^{38, 65} Resumidamente, através da cânula traqueal eram realizadas lavagens sucessivas do pulmão com soro fisiológico aquecido a 37-38°C em alíquotas de 30 mL/Kg, a uma pressão máxima de 30 cmH₂O. Cada procedimento de lavagem durava aproximadamente 60 segundos, sendo 20 segundos reservados para infusão e o tempo restante para retirada, a qual era feita por gravidade, movimentos externos de compressão torácica e gentil sucção. Completada a retirada, o procedimento era repetido seis vezes a cada 3-5 minutos. Após 10 minutos de estabilização, era colhida uma gasometria. Se a relação PaO₂/FiO₂ atingisse valores menores do que 100 mmHg a lesão era considerada induzida, em caso contrário, eram realizadas mais duas lavagens na sequência e, depois de 10 minutos, nova gasometria era obtida e assim sucessivamente até atingir relação PaO₂/FiO₂<100. Atingindo o critério, os animais foram divididos para compor os grupos experimentais.

3.3. Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica

Os animais foram divididos para compor dois grupos experimentais:

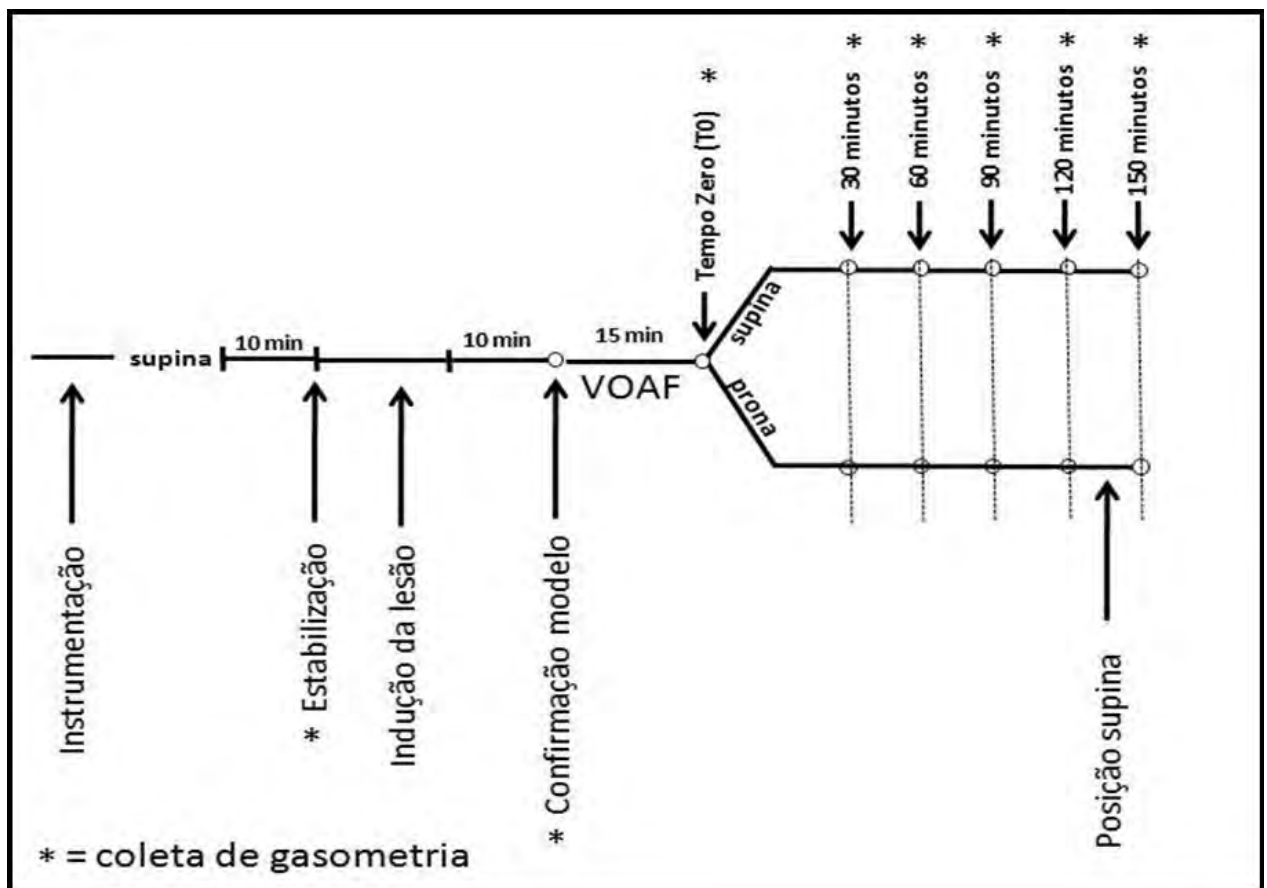
- Animais com LPA submetidos à VOAF em posição supina (GS; n=15);
- Animais com LPA submetidos à VOAF em posição prona (GP; n=15).

De acordo com o comportamento das variáveis analisadas em outros estudos que utilizaram metodologia semelhante, foram estudados 15 coelhos por grupo.³⁴⁻³⁸

Após confirmação da indução da LPA, os animais eram colocados em VOAF, fornecida pelo oscilador SensorMedics 3100A (*Viasys Healthcare, Yorba Linda, USA*) com pressão média de via aérea inicial de 16 cmH₂O, Ti de 33%, FR de 10Hz e amplitude de 22 cmH₂O, FiO₂ de 100%, sendo a FR e a amplitude ajustadas para manter PaCO₂ em níveis fisiológicos (PaCO₂=40-45 mmHg). Após 15 minutos de estabilização, os animais eram colocados em posição prona ou mantidos em posição

supina, sendo este momento denominado tempo zero (T0). Iniciava-se, então, os primeiros 30 minutos com pressão média de vias aéreas de 16 cmH₂O, sendo esta diminuída a cada 30 minutos para 14, 12 e 10-11 cmH₂O, completando duas horas de experimento. Após este período, os animais do GP eram recolocados em posição supina e os do GS mantidos nesta posição. Os parâmetros finais foram mantidos mais 30 minutos, terminando o protocolo. Foram colhidas gasometrias antes da indução da lesão, na confirmação da lesão pulmonar, no tempo zero e a cada 30 minutos pelos 150 minutos do protocolo experimental (figura 1).

Figura 1 – Ilustração representativa do protocolo de estudo



3.4. Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar

As células totais do lavado broncoalveolar (BAL) foram contadas por meio de câmara de Neubauer. O volume de lavado broncoalveolar era medido e centrifugado. As células obtidas por centrifugação eram suspensas novamente em 1 mL de salina e depois diluídas 1:10 em solução de Turk para contagem. A contagem diferencial foi realizada em esfregaço da mesma amostra de células, em lâminas e coloração de Leishman. A fixação das células em lâminas foi realizada por meio de citocentrifugação.

3.5. Medida da concentração de TNF-alfa em lavado broncoalveolar e tecido pulmonar

As dosagens de TNF-alfa no BAL e tecido pulmonar foram realizadas utilizando-se o método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), conforme Imai et al.³⁴ e protocolo fornecido pelo fabricante (PharMingen®). O método de ELISA utilizou o anticorpo policlonal de cabra anti-TNF-alfa como anticorpo de captura na concentração de 4 µg/mL e o anticorpo de cabra policlonal anti TNF-alfa biotinilado como anticorpo de revelação.

3.6. Medida da peroxidação lipídica

A quantificação do malondialdeído foi realizada utilizando o *kit* comercial "Tbars assay kit" da Cayman Chemical CompanyTM (Ann Arbor, MI, USA). O tecido pulmonar de cada área avaliada foi fragmentado utilizando um homogeneizador de mão Ultra Stirrer 80 em tampão recomendado pelo fabricante do kit. Após fragmentação do tecido o homogenato foi centrifugado e o sobrenadante usado no ensaio.

3.7. Manipulação dos pulmões e Histologia Pulmonar

Antes do término do experimento, os animais receberam 1 mL de heparina e foram sacrificados com a administração intravenosa rápida de cetamina. Após o sacrifício, o tubo traqueal era ocluído e o tórax aberto para excluir a presença de pneumotórax oculto, confirmar a posição dos cateteres vasculares e do tubo traqueal e coletar amostra para análise histológica e para lavado broncoalveolar. Nos animais que foram realizados o lavado broncoalveolar (n=7 para cada grupo), o brônquio fonte direito era ligado por meio de uma fita cirúrgica, o bloco pulmão/coração removido e o pulmão esquerdo lavado duas vezes, utilizando-se alíquota de 15 mL/Kg de salina normal. O fluido drenado era coletado para análise do BAL. Nos animais submetidos à análise histológica, o bloco traqueia/pulmão/coração era removido, os pulmões e a traqueia separados do coração e o pulmão esquerdo preenchido com solução de formol a 10%. O preenchimento era realizado por meio de uma coluna de equipo de soro de 30 cm de comprimento conectada em uma de suas extremidades a um frasco, que continha formol, e na outra a traqueia do animal. A partir desse sistema, o formol gotejava por gravidade, lentamente, de forma a preencher os espaços alveolares, preservando a arquitetura alveolar. Após período mínimo de fixação de 24 horas, fragmentos eram embebidos em parafina e então realizados cortes axiais de pulmão que foram corados com hematoxilina e eosina e examinados por dois patologistas, de forma cega e independente.^{38,54} Para o estudo histológico os cortes foram examinados por microscopia óptica, utilizando-se aumento de 200x, com auxílio de uma grade de área conhecida em uma das oculares composta por 100 pontos e 50 retas. Em cada lâmina, o espécime foi dividido em duas zonas distintas, representando as regiões dependentes (dorsais) e não dependentes (ventrais) do pulmão. Dez campos microscópicos foram aleatoriamente selecionados para o exame, sendo cinco em cada região. O dano histopatológico pulmonar foi quantificado por um escore que analisa sete variáveis (inflamação alveolar, inflamação intersticial, hemorragia alveolar, hemorragia intersticial, edema, atelectasia e necrose) com cinco graus individuais de gravidade para cada uma delas.^{65,66}

3.8. Variáveis analisadas

Protocolo com as variáveis que foram anotadas para cada animal está anexado após as referências bibliográficas. Resumidamente, foram analisadas:

- a) Variáveis hemodinâmicas: frequência cardíaca e pressão arterial média;
- b) Gasometria arterial: pH e PaO₂

Mecânica pulmonar: complacência pulmonar antes e depois da indução da LPA.

- c) Dano oxidativo pulmonar: peroxidação lipídica (concentração de malondialdeído) em tecido pulmonar.
- d) Índices derivados para avaliar trocas gasosas: relação PaO₂/FiO₂, índice de oxigenação (FiO₂ x pressão média vias aéreas x 100/PaO₂).
- e) Processo inflamatório alveolar: nível de TNF-alfa e contagem de polimorfonucleares no BAL, TNF-alfa no homogenato de tecido pulmonar das áreas dorsais e ventrais.
- f) Histologia: dano histológico nas áreas dorsais e ventrais pulmonares, definido por escore de lesão descrito no item *Manipulação dos pulmões e Histologia Pulmonar*.

3.9. Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio do programa *SigmaStat for Windows*® versão 11.0. Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre momentos de cada grupo por meio de teste-*t* com medidas pareadas e expressas em média \pm desvio-padrão. Dados com distribuição não normal foram comparados pelo teste Mann-Whitney, com medidas pareadas expressas em mediana (variação).

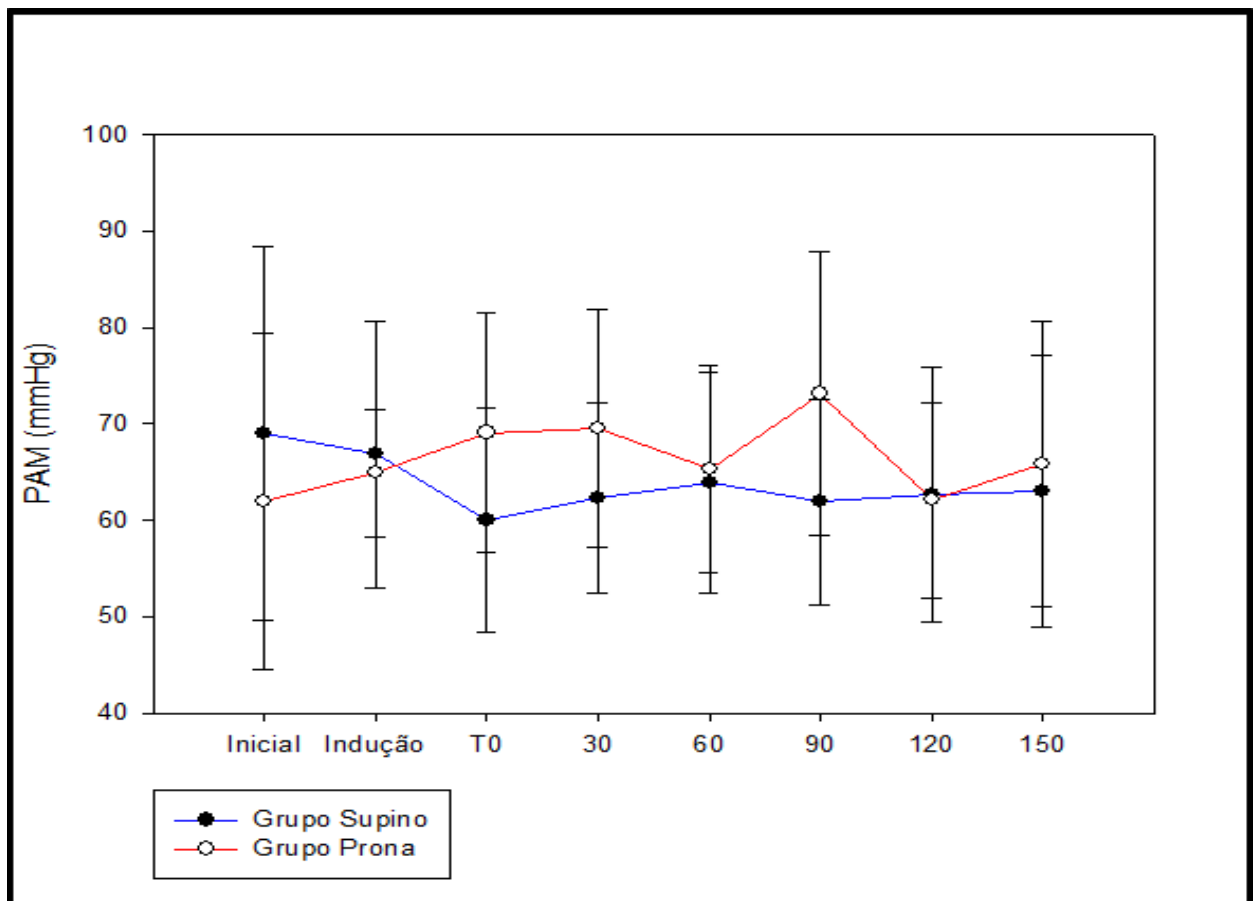
Comparações de momentos dentro de cada grupo foram realizadas utilizando-se os testes de medidas repetidas, sendo os resultados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de medidas repetidas). Em caso de distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com comparações pareadas avaliadas pelo método de Dunn, com resultados expressos em mediana (variação). A análise dos níveis de TNF-alfa no tecido pulmonar, do malondialdeído e do escore de lesão pulmonar, comparando os grupos e regiões pulmonares (ventral e dorsal), foi realizada pela ANOVA Two Way. A significância estatística foi definida por $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Hemodinâmica, Mecânica Pulmonar e Trocas Gasosas

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à estabilidade hemodinâmica avaliada pela medida da pressão arterial média (PAM) ($p > 0,05$, Figura 2). A pressão arterial média foi mantida acima de 50 mmHg por meio de suporte vasoativo. Houve 3 óbitos durante o período experimental, sendo os três ocorridos no grupo supino. Portanto, 10% de óbitos no total do experimento.

Figura 2 – Pressão arterial média (PAM) ao longo do tempo para os grupos experimentais



Dados expressos em média \pm SD. Não houve diferença estatística significativa entre os momentos experimentais de cada grupo e na comparação entre os grupos ($p > 0,05$). Testes: ANOVA de Medidas Repetidas e ANOVA.

Igualmente, não houve diferença estatística significativa comparando os grupos quanto ao peso dos animais e o número de lavagens necessárias para a indução da lesão ($p > 0,05$). Também, não houve diferença entre os grupos para a

relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, o IO, a complacência estática e a pressão média de via aérea (MAP), comparando-os no momento antes da lesão ou no momento depois da indução da lesão pulmonar (tabela 1). Comparando os momentos, antes e depois da lesão pulmonar (tabela 2) dentro de cada grupo, houve hipoxemia significativa, diminuição da complacência pulmonar e aumento da MAP após a indução da lesão, em ambos os grupos ($p < 0,05$). Também houve acidose significativa em ambos os grupos após a indução da lesão.

Tabela 1 – Variáveis de comparação dos grupos supina e prona antes e depois da indução da lesão pulmonar

Variáveis	Grupos		
	Supino (n=15)	Prona (n=15)	
Peso (Kg)	2,481 ± 0,298	2,565 ± 0,387	
Número de lavagens	8 (6-10,7)	6 (6-12)	
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	Antes da indução	447,6 (364,2-492,8)	481,7 (428,4-493,9)
	Após a indução	68,2 ± 19,1	63,8 ± 19,3
Índice de oxigenação ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{mmHg}$)	Antes da indução	1,5 (1,4- 2,1)	1,4 (1,4-1,7)
	Após a indução	13,7 (11,2-21,2)	14,7 (11,8-21,3)
Complacência pulmonar estática (cmH_2O)	Antes da indução	3,5 ± 0,7	3,6 ± 1,1
	Após a indução	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Pressão aérea média (cmH_2O)	Antes da indução	7,0 (6,9-7,1)	6,9 (6,7-7,2)
	Após a indução	9,8 ± 0,6	10,0 ± 0,8

Sendo MAP=Pressão média de vias aéreas

Valores expressos em média ± SD, se distribuição normal, e mediana (variação) em caso contrário

Distribuição normal: Teste *t*. Distribuição não normal: Mann-Whitney Rank Sum test

$p > 0,05$ comparando grupo prona e grupo supino para todas as variáveis analisadas.

Tabelas 2 – Variáveis de comparação dos momentos antes e depois da indução da lesão pulmonar em cada grupo

Variáveis	Grupos	Momentos de avaliação		Nível descritivo
		Antes da lesão	Após a lesão	
PaO ₂ /FiO ₂	GS	447,6 (364,2-492,8)	72,1 (52,1-86,2)	p< 0,05
	GP	481,7 (428,4-493,9)	64,5 (48,3-81,9)	p< 0,05
Índice de oxigenação (cm H ₂ O/mm Hg)	GS	1,5 (1,4-2,1)	13,7 (11,2-21,2)	p< 0,05
	GP	1,4 (1,4-1,7)	14,7 (11,8-21,3)	p< 0,05
Complacência pulmonar estática (cmH ₂ O)	GS	3,3 (3,1-3,7)	1,2 (1,0-1,3)	p< 0,05
	GP	3,8 (2,8-4,4)	1,2 (1,0-1,4)	p< 0,05
Pressão aérea média (cmH ₂ O)	GS	7,0 (6,9-7,1)	10,0 (9,5-11,0)	p< 0,05
	GP	7,04±0,5	9,8 ± 0,6	p< 0,05
pH	GS	7,24 ± 0,07	7,10 ± 0,06	p<0,05
	GP	7,24 ± 0,08	7,11 ± 0,08	p<0,05

GS= Grupo supino; GP=grupo prona;

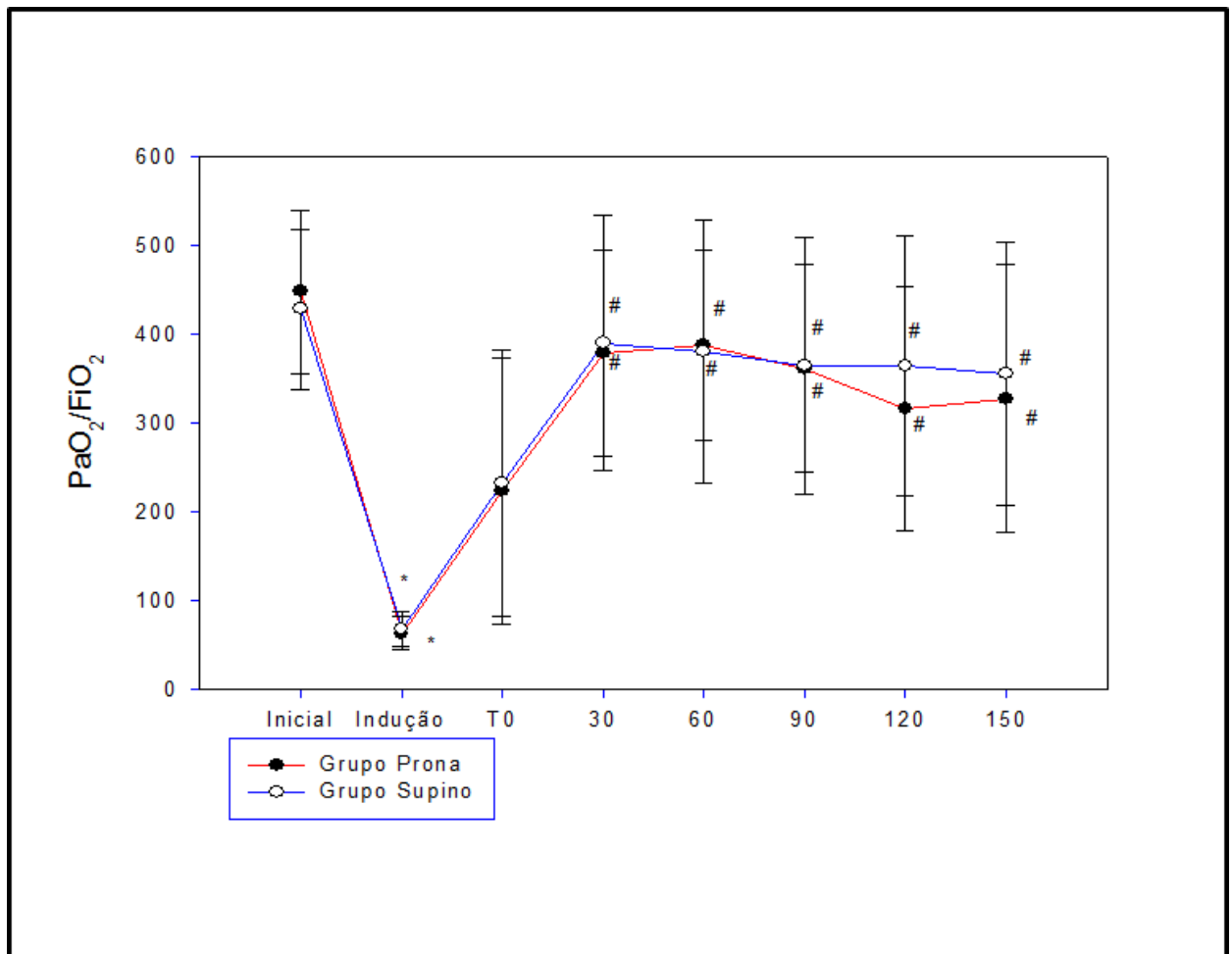
Valores expressos em média ± SD, se distribuição normal, ou em mediana (variação) em caso contrário

Distribuição normal: Teste t; distribuição não normal: Mann-Whitney

p<0,05 comparando os momentos antes e depois da lesão pulmonar para todas as variáveis.

Após 30 minutos sob ventilação oscilatória de alta frequência, os dois grupos aumentaram a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (figura 3) em comparação com o momento pós-indução ($p < 0,05$), retomando os valores correspondentes à linha de base ($p > 0,05$).

Figura 3 – Evolução da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ no período experimental



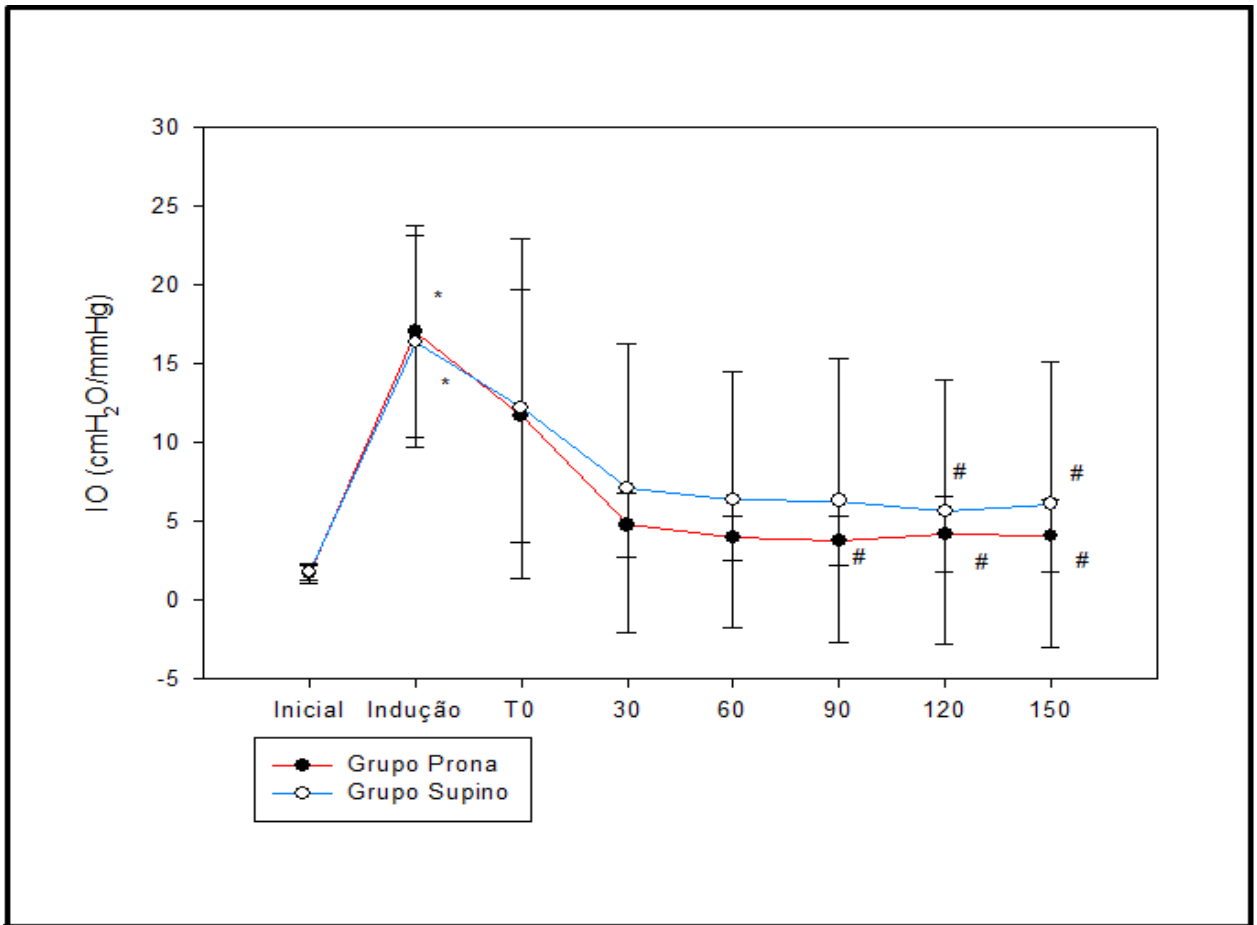
Os grupos não diferiram entre si em cada momento do experimento ($p > 0,05$). Após a indução, os dois grupos evoluíram com hipoxemia significativa em relação à linha de base (indução em relação a inicial). Após 30 minutos de ventilação, os dois grupos apresentaram melhora significativa em relação ao período da indução ($p < 0,05$), tornando os valores semelhantes à linha de base.

* $p < 0,05$ em relação ao período inicial, # $p > 0,05$ em relação ao período inicial.

Testes estatísticos: Teste *t* para comparar os grupos; ANOVA de Medidas Repetidas para comparar os momentos.

O índice de oxigenação (IO, Figura 4) apresentou o mesmo comportamento, sendo a recuperação de seus valores mais rápida no grupo prona, aos 90 minutos [IO → GP inicial: 1,4 (1,4-1,7) = GP T90: 3,1 (2,6- 4,7) cmH₂O/mmHg, $p>0,05$], enquanto que no grupo supino, a melhora ocorreu aos 120 minutos [IO → GS inicial: 1,5 (1,4-2,1) = GS T120: 2,6 (2,2- 3,1) cmH₂O/mmHg, $p>0,05$].

Figura 4 – Evolução do índice de oxigenação ($MAP \times FiO_2 \times 100/PaO_2$) no período experimental



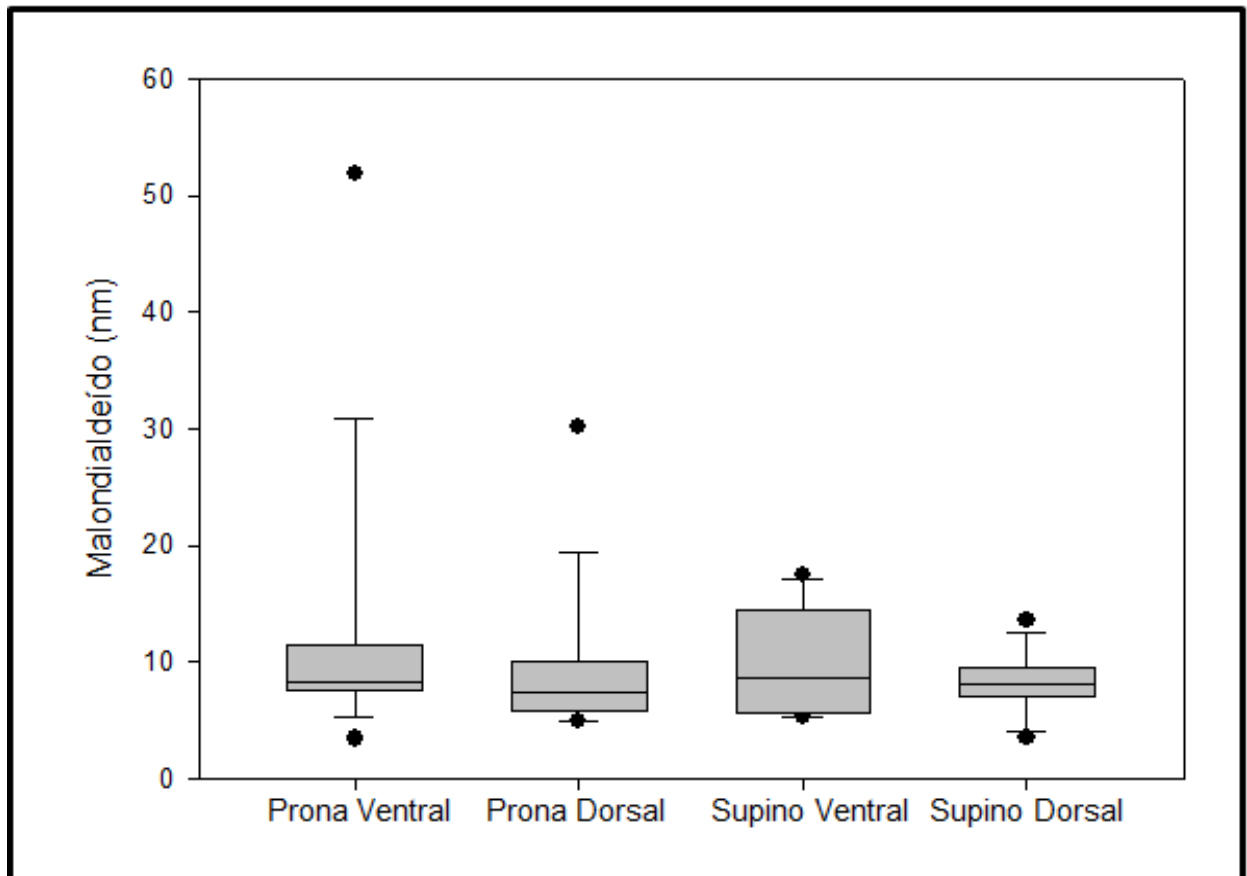
Os grupos não diferiram entre si em cada momento do experimento. Após a indução da lesão, os dois grupos evoluíram com significativo aumento deste índice em relação ao valor inicial. O grupo prona apresentou recuperação de valores que retornaram aos valores iniciais aos 90 minutos, enquanto que para o grupo supino isso ocorreu aos 120 minutos.

*: $p<0,05$ comparando indução com inicial para os dois grupos; #: $p>0,05$ comparando os momentos 90 (grupo prona), 120 (prona e supino) e 150 minutos (prona e supino) em relação ao período inicial. Testes estatísticos: Teste *t* para comparar os grupos; ANOVA de Medidas Repetidas para comparar os momentos.

4.2. Lesão Pulmonar Oxidativa

O malondialdeído foi utilizado como método de avaliação do estresse oxidativo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e entre as regiões pulmonares dorsais e ventrais [GP ventral: 8,2 (7,7-11,4) = GP dorsal: 7,4 (5,9-0,8) = GS ventral: 8,7 (5,7-13,6) = GS dorsal: 8,1 (7,1-9,5) nm; $p > 0,05$] (figura 5).

Figura 5 - Representação dos níveis teciduais de malondialdeído nas regiões ventral e dorsal dos grupos prona e supino na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey

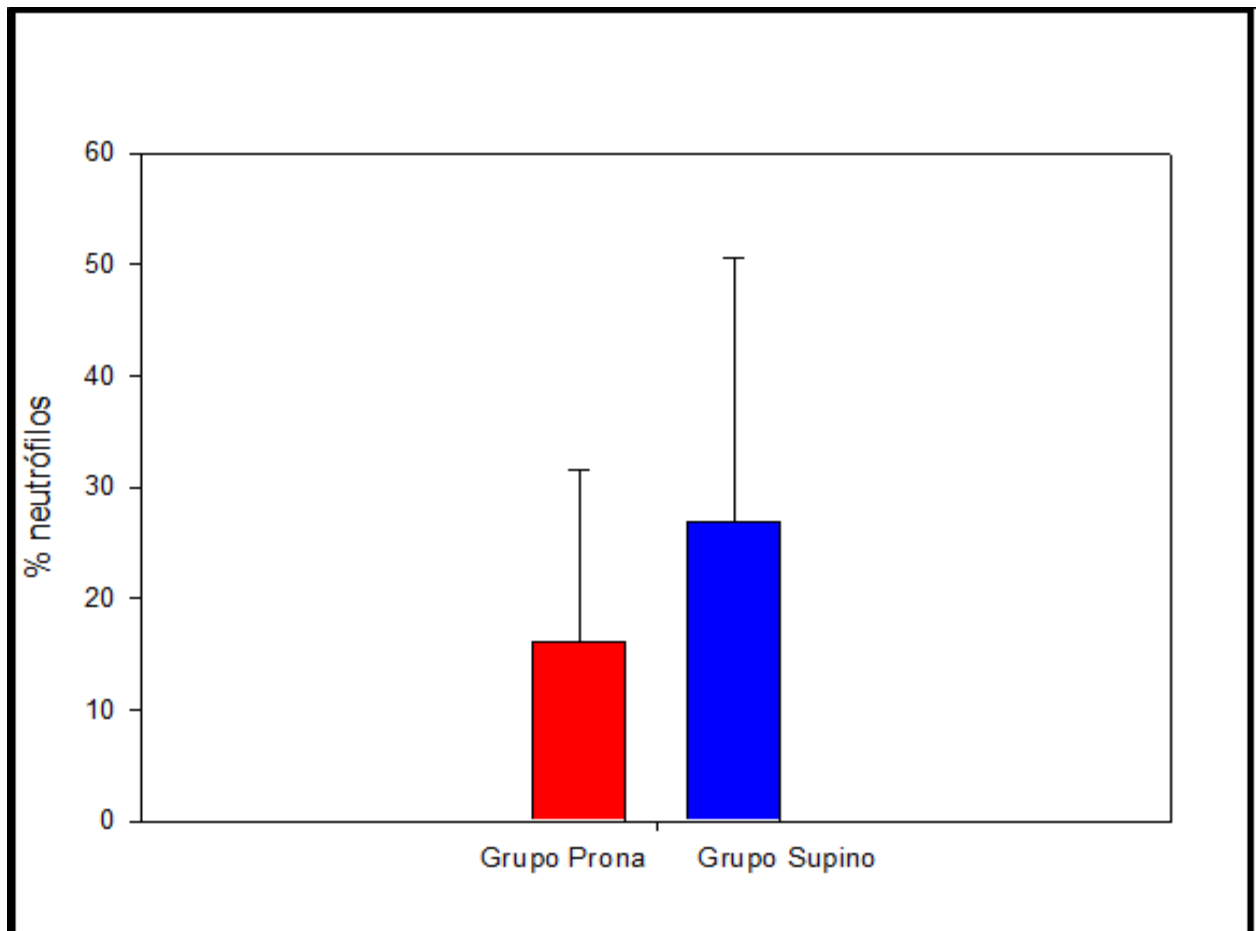


As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos preenchidos representam os valores individuais. $p > 0,05$. (ANOVA *Two Way*).

4.3. Processo Inflamatório Alveolar

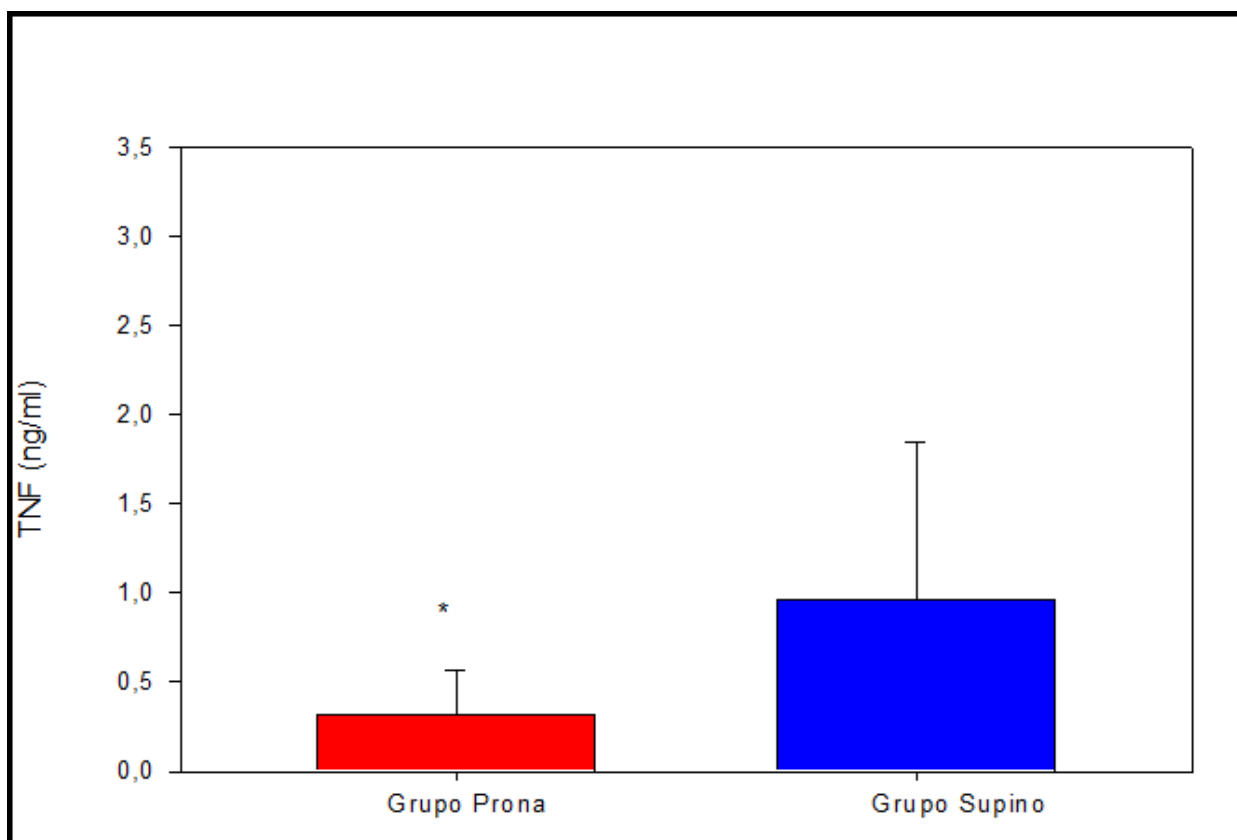
Não houve diferença estatística significativa entre a porcentagem de neutrófilos medida no BAL de cada grupo (GP: 16,2% \pm 15,4 = GS: 26,9% \pm 23,8; $p > 0,05$) (figura 6). No entanto, os níveis de TNF-alfa (figura 7) foram significativamente menores no BAL dos animais do grupo prona (GP: 0,32 \pm 0,25 < GS: 0,95 \pm 0,89ng/ml; $p < 0,05$).

Figura 6 – Porcentagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar para os grupos prona e supino



Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$); Teste *t*.

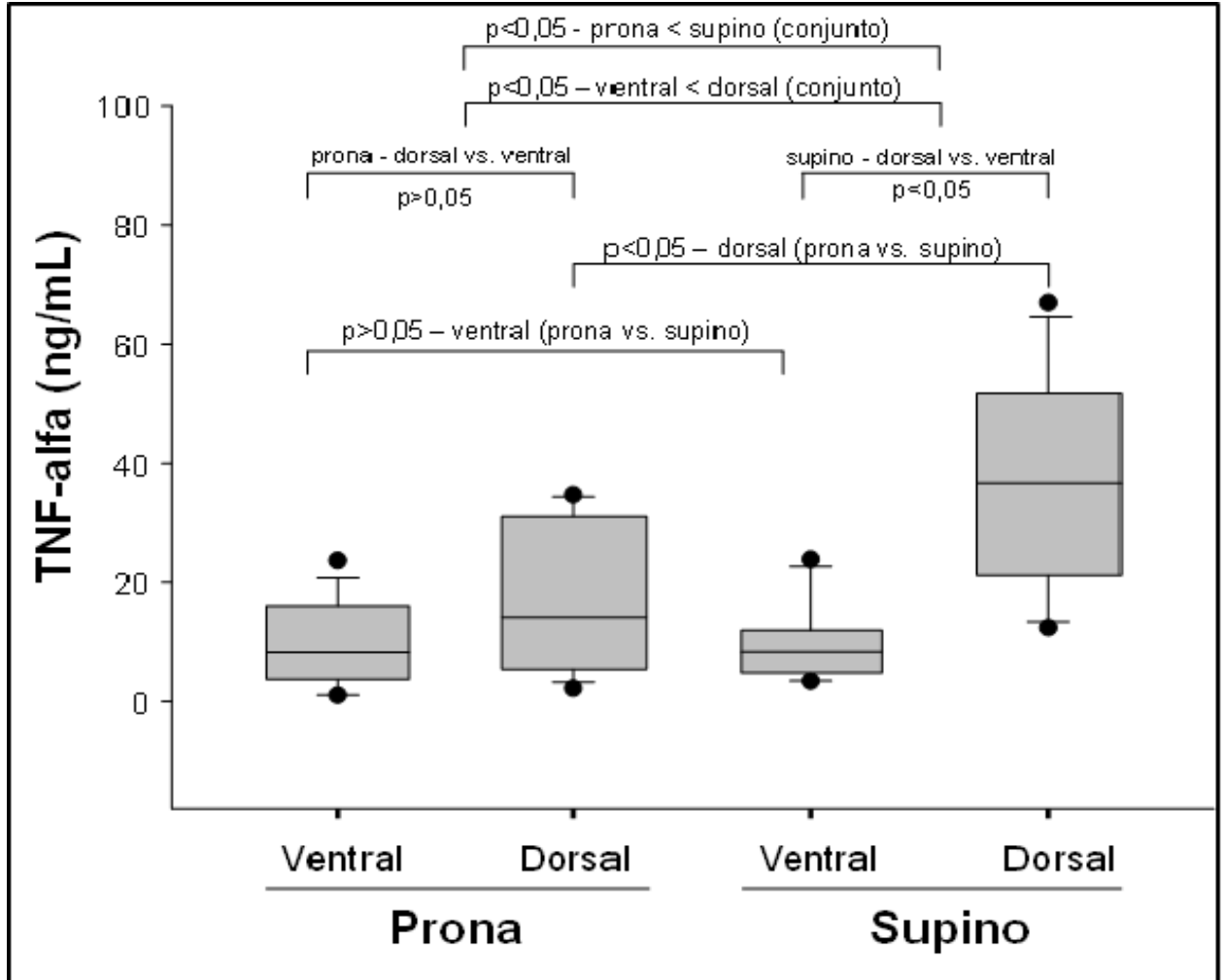
Figura 7 – Valores de TNF-alfa (ng/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos prona e supino



*: $p < 0,05$ comparado grupo prona com grupo supino; Teste *t*.

Igualmente, os valores de TNF-alfa no tecido pulmonar (figura 8) foram significativamente mais baixos no GP que no GS ($p < 0,05$). Esta diferença ficou ainda mais evidente quando se comparou as regiões dorsais de cada grupo [dorsal - GP: 14,1 (5,5-30,3) < GS: 36,6 (22,0-51,7) ng/ml, $p < 0,05$]. No entanto, para a região ventral, não foi observada diferença estatística significativa [ventral - GS: 8,4 (5,1-11,5) = GP: 8,3 (3,9-15,2) ng/ml, $p > 0,05$]. Quanto à comparação entre as posições ventral e dorsal em conjunto, houve diferença significativa entre as medidas do marcador avaliado independentemente da posição, prona ou supino ($p < 0,05$), sendo a inflamação pior da região dorsal. Avaliando o grupo supino individualmente, a lesão foi pior na região dorsal [ventral – GS: 8,4 (5,1 – 11,5) < dorsal – GS: 36,6 (22 – 51,7); $p < 0,05$] e no grupo prona a lesão foi semelhante em ambas as regiões [ventral – GP: 8,3 (3,9 – 15,2) = dorsal – GP: 14,1 (5,5 – 30,3); $p > 0,05$].

Figura 8 – Representação dos níveis de TNF-alfa (ng/ml) no tecido pulmonar das regiões ventral e dorsal dos grupos supino e prona na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey

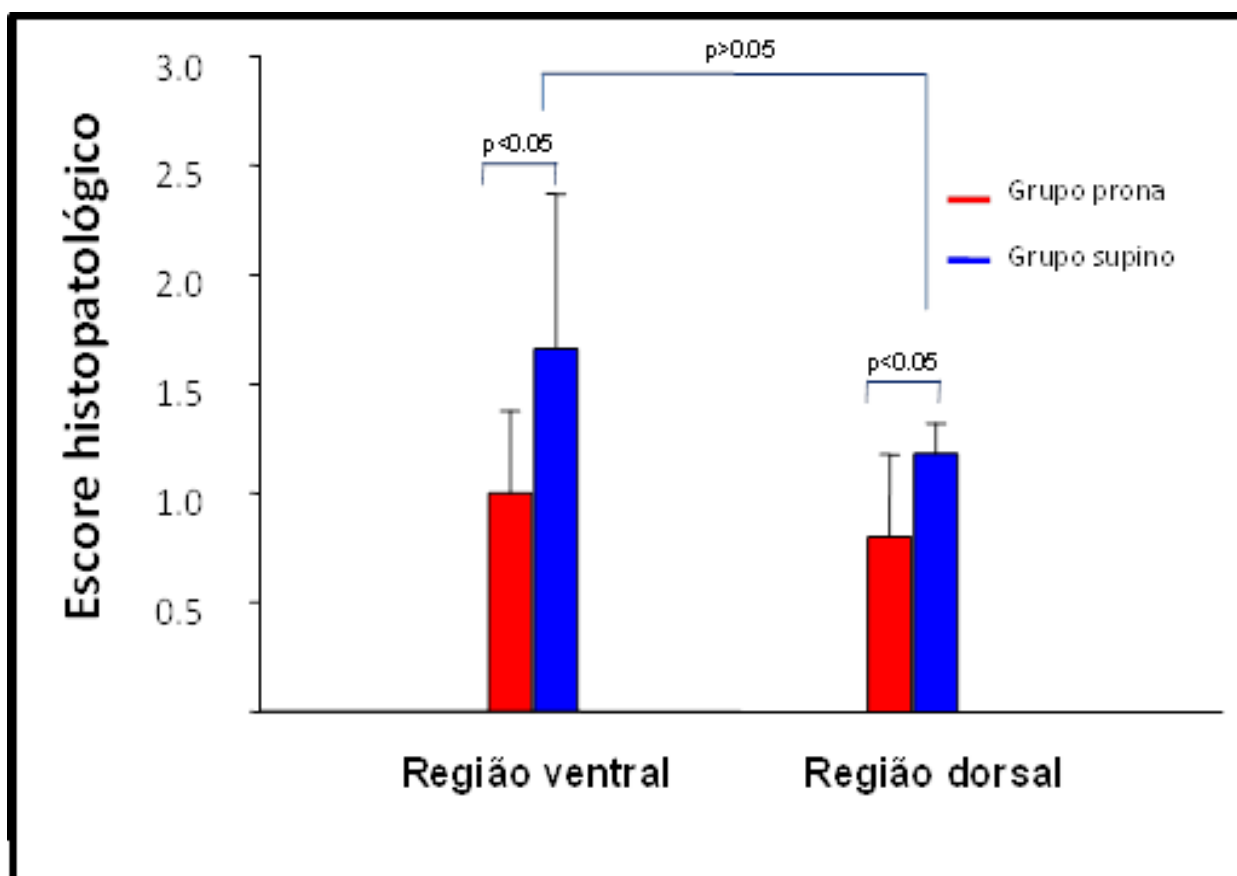


As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. As barras acima e abaixo dos retângulos indicam os percentis 90 e 10, respectivamente, e os círculos preenchidos representam os valores individuais. Os valores foram significativamente mais baixos no grupo prona em relação ao supino, quando avaliados em conjunto. Também em conjunto, os valores do TNF-alfa para a região ventral foram significativamente menores que para a região dorsal. Especificamente para o grupo prona, não houve diferença entre as regiões ventral e dorsal, enquanto que para o grupo supino, a lesão foi maior na região dorsal. Não houve diferença entre os grupos supino e prona para a região ventral, diferentemente do que ocorreu para a região dorsal cujos valores foram significativamente menores para a posição prona. (*Two Way ANOVA*).

4.4. Histopatologia

O escore de lesão histológica pulmonar (figura 9) foi maior para o grupo supino que para o grupo prona ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatística significativa entre as regiões ventral e dorsal dentro de cada grupo (GP ventral: $0,40 \pm 0,18$ = GP dorsal: $0,8 \pm 0,4$ < GS ventral: $1,66 \pm 0,75$ = GS dorsal: $1,18 \pm 0,15$; $p < 0,05$). Não houve interação entre região e posição para o escore ($p > 0,05$).

Figura 9 – Escore de lesão histológica no tecido pulmonar, nas regiões ventral e dorsal dos grupos prona e supino



Houve menor lesão histológica no grupo prona em comparação ao grupo supino ($p < 0,05$). Não houve, porém, diferença entre as regiões de cada grupo ($p > 0,05$). Não houve interação entre posição e região ($p > 0,05$). (*Two Way Anova*)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Enquanto vários estudos avaliaram os efeitos da VMC protetora sobre oxigenação, inflamação e lesão histopatológica pulmonar em modelos experimentais de LPA, poucos avaliaram estes efeitos com a VOAF associados à posição prona.⁶⁴ Até onde pudemos constatar, não existem estudos que tenham avaliado a regionalização da lesão pulmonar quando VOAF e posição prona foram associadas, em relação à histologia, inflamação e estresse oxidativo pulmonar.

5.1. Escolha da espécie animal

Como há mais de uma alternativa de modelo animal para estudar LPA, na escolha do animal a ser utilizado é preciso levar em consideração aspectos práticos tais como facilidade de obtenção, grau de dificuldade técnica na manipulação, experiência descrita na literatura e custo. Estudamos as características do coelho em literatura especializada^{35,36,69} e por estas razões o coelho foi escolhido.

5.2. Manipulação dos animais

Para que a equipe dominasse as técnicas de dissecação dos vasos sanguíneos, traqueotomia, lavagem pulmonar e ventilação mecânica em coelhos, vários experimentos-piloto foram realizados, ocupando sete animais e cerca de seis meses. A realização rápida destes procedimentos é decisiva para o sucesso do experimento, pois se houver demora, sangramento ou hipóxia os animais podem apresentar instabilidade hemodinâmica irreversível. A propósito, a instabilidade hemodinâmica é característica deste modelo em coelhos e por esta razão a administração de drogas vasoativas e inotrópicas para manter a pressão arterial sistêmica dentro do limite estabelecido pelo protocolo é regra, como relatado por outros autores.^{35,36} Outro fator a ser controlado rigorosamente é a temperatura corporal, pois a hipotermia também determina deterioração dos animais do ponto de

vista metabólico e cardiovascular.⁶⁹ A monitoração contínua da temperatura retal e a utilização de bolsas térmicas foram importantes para garantir a estabilidade dos nossos animais.

Tem sido descrito que a mortalidade de coelhos submetidos a este tipo de procedimento é de aproximadamente 10%,⁶⁹ em acordo com nossos achados.

Em nosso experimento, ambos os grupos permaneceram hemodinamicamente estáveis por todo o período experimental, não havendo diferença na avaliação da pressão arterial média entre os grupos.

5.3. Modelo de Lesão Pulmonar Aguda

Neste modelo, a lesão pulmonar manifesta-se por distúrbio da relação ventilação-perfusão (V/Q), tanto pelo efeito *shunt*, quanto pelo aumento do espaço morto. A mecânica ventilatória também se encontra prejudicada pelo comprometimento da complacência e aumento da resistência pulmonar. O aumento da permeabilidade capilar provoca edema alveolar, agravando ainda mais o processo.⁷⁰

O modelo de lavagem pulmonar com salina aquecida foi desenvolvido por Lachmann et al.⁷¹, em 1980, baseado na observação de que a LPA associa-se à depleção de surfactante nos espaços alveolares e diminuição da concentração de proteínas associadas ao surfactante no BAL. Neste modelo, solução isotônica de salina aquecida é infundida nos pulmões e imediatamente removida, em lavagens sucessivas. Os ciclos de lavagem reduzem a concentração do lípide surfactante na superfície alveolar alterando a tensão da superfície alveolar. A substância surfactante é uma complexa mistura de proteínas e fosfolípídeos com várias funções fundamentais para os pulmões.⁷² O surfactante diminui a tensão superficial e previne o colapso alveolar, quando o volume pulmonar encontra-se reduzido. As proteínas do surfactante estabilizam o próprio surfactante e modulam a resposta do hospedeiro no alvéolo.⁷³ A lavagem com salina induz ao dano alveolar por dois mecanismos básicos: 1) aumento do colapso alveolar, magnificando a LPIVM e 2)

comprometendo a resposta de defesa alveolar. Muitos estudos combinaram este modelo com VM, criando, muitas vezes, um fator de confusão, quando se analisa qual elemento é responsável pela lesão alveolar, a lavagem ou a VM.⁷⁴ A adoção da VMC protetora durante a indução da lesão em nosso estudo pode ter minimizado este viés.

Vários outros modelos foram descritos para a indução de LPA em animais,⁷⁴ incluindo, entre outros, a lesão hiperóxica, a administração intratraqueal de ácido oleico, o uso subcutâneo de N-nitroso-N-metiluretano (NNNMU), a instilação traqueal de ácido clorídrico e a injeção de polissacaríde de *E. coli*. A lesão hiperóxica tem efeitos muito variáveis dependendo da concentração de oxigênio. Além disso, os animais precisam ser mantidos em ambiente fechado com altas concentrações de oxigênio por tempo prolongado, tornando o procedimento tecnicamente difícil. A injeção de ácido oleico produz edema e hemorragia pulmonar aguda e grave, sendo de reprodutibilidade difícil pela dificuldade de manutenção dos animais por tempo superior a duas horas. A utilização de NNNMU, por sua vez, exige preparação do laboratório experimental, pois sua inalação induz lesão pulmonar grave nos técnicos e pesquisadores; estas dificuldades somadas ao alto custo desta técnica fazem com ela seja cada vez menos utilizada. A instilação de ácido clorídrico não foi utilizada pela escassez de estudos de sua aplicação em coelhos. Por outro lado, a injeção de *E. coli* vem sendo muito utilizada, mas é uma técnica de custo muito mais elevado quando comparada à técnica de lavagem pulmonar com solução salina aquecida.

Assim, a lavagem pulmonar com salina aquecida foi o modelo por nós escolhido pela larga experiência da literatura com a técnica, facilidade de reprodução e na manipulação dos animais, segurança dos pesquisadores, baixo custo e a própria experiência da equipe, que já utilizou esta técnica em outros trabalhos experimentais de estudo de métodos ventilatórios e terapias adjuvantes.

Cabe a ressalva, no entanto, de que nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características da SDRA/LPA em humanos.^{75,76} Modelos de LPA em coelhos, por exemplo, associam-se com o dobro da produção de óxido nítrico comparado a SDRA em humanos.⁷⁴ O modelo de lavagem pulmonar causa lesão pulmonar muito parecida com a SDRA em humanos no que se refere aos seus efeitos sobre a oxigenação, complacência pulmonar, formação de atelectasia e

edema perivascular e peribrônquico. Entretanto, induz a menor infiltração macrofágica e neutrofílica, a menos que outra agressão seja adicionada, por exemplo, a ventilação mecânica.^{74,75} Em adição, a remoção do surfactante interfere com a resposta imune e com o metabolismo oxidativo, uma vez que o surfactante pode inibir a ativação de neutrófilos respiratórios e tem efeito antioxidante sobre os macrófagos alveolares.⁷⁶

A característica deste modelo é promover hipoxemia quase imediata com aumento do *shunt* intrapulmonar e conseqüente diminuição da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, como observado em nosso experimento, lembrando que a FiO_2 foi mantida em 1,0 em todos animais, de forma a tornar a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ igual a PaO_2 . O índice de oxigenação ($\text{IO} = \text{FiO}_2 \times \text{pressão média vias aéreas} \times 100/\text{PaO}_2$), indicador da oxigenação e da agressividade da ventilação mecânica, aumentou e permaneceu elevado tanto por diminuição da oxigenação quanto por aumento da pressão média das vias aéreas. No presente estudo, a hipoxemia verificada após a indução da lesão foi de igual magnitude nos animais de ambos os grupos tratados, sem diferença significativa entre o número de lavagens. Estes achados garantem a comparação entre os grupos. A propósito, o número de lavagens necessárias para se chegar a instalação do modelo em nossos animais foi comparável ao de outros estudos.^{34,35,38, 65,71}

Para definir que a lesão pulmonar tinha efetivamente ocorrido, escolhemos o nível de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mmHg, pois conforme alguns estudos clínicos demonstram, os resultados de melhora de oxigenação^{50,51,58} e até mesmo de mortalidade⁶⁰ com a posição prona são vistos apenas naqueles pacientes mais graves, com relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ semelhantes à avaliada neste estudo. Além disso, alguns estudos experimentais que também utilizaram este método de indução de lesão pulmonar também utilizaram estes níveis de relação para definir a lesão.^{35,36} Em outros estudos do nosso grupo, em que o mesmo modelo foi utilizado, mas que se avaliou outros tratamentos que não a posição prona, a escolha foi de atingir uma relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ que apenas definisse a síndrome (< 200)^{38,64} Em estudo de desenho semelhante ao nosso, realizado em porcos submetidos à lavagem pulmonar com solução salina, os animais foram lavados até atingirem relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ de 40 a 60 mmHg e o protocolo experimental somente se iniciava após uma hora de estabilização, depois de atingir estes níveis.⁶⁴

No presente estudo, os dois grupos apresentaram hipoxemia importante, comprovada pela avaliação da $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e IO antes e depois da LPA. Também apresentaram, após a indução, diminuição significativa da complacência pulmonar estática, aumento da MAP durante a ventilação convencional e piora da acidose (demonstrada pela queda significativa do pH em ambos os grupos). Tal fato é importante para demonstrar a efetividade da lesão pulmonar induzida neste protocolo.

5.4. Características gerais dos grupos

Os animais dos dois grupos não diferiram quanto ao peso e variáveis de oxigenação ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e IO), complacência pulmonar estática e MAP até a indução da lesão. Após a indução da LPA, os grupos permaneceram semelhantes em relação a todas estas variáveis. Tal fato é importante para garantir que os grupos pudessem ser comparados.

5.5. Resposta à posição prona em VOAF

Em nosso estudo, não houve diferença estatística entre a evolução da oxigenação entre os grupos, avaliada pela relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e índice de oxigenação. O índice de oxigenação apresentou melhora, a níveis semelhantes ao pulmão sem lesão, um pouco mais rapidamente no grupo prona (90 minutos) em relação ao grupo supino (120 minutos), mas no final do experimento, o IO dos dois grupos não diferiu estatisticamente. Apesar da tendência do IO ser mais baixo no GP, esta diferença não foi significativa. Estudo semelhante ao nosso que avaliou porcos com LPA induzida por salina aquecida em VOAF nas posições supina e prona mostrou melhora do IO mais rápida no grupo prona, mas no final do experimento os grupos também não apresentaram diferença estatística para este índice.⁶⁴ Estudo anterior do nosso grupo, também realizado em coelhos com LPA induzida pela infusão de salina aquecida, mostrou melhora significativa da

oxigenação dos animais ventilados com VOAF em relação ao grupo em VMC protetora.³⁸ Possivelmente, a melhora da oxigenação que observamos foi mais relacionada com a utilização da VOAF do que influenciada pela posição utilizada (prona ou supino), visto que, ao contrário da VOAF, os efeitos da posição prona sobre a oxigenação podem ocorrer depois de algum tempo (até quatro horas). Isto pode ser confirmado pelos resultados de um estudo realizado em cães com LPA induzida por ácido oleico, em que se comparou a resposta de animais em ventilação convencional submetidos a manobras de recrutamento pulmonar nas posições prona e supino.⁴³ Os autores demonstraram que a melhora da oxigenação em resposta às manobras, foi maior no grupo prona. Ressalta-se que nesse estudo não foi utilizada a VOAF.

Durante o protocolo experimental, a MAP foi diminuída gradativamente a cada 30 minutos. Apesar disso, a relação PaO_2/FiO_2 e o índice de oxigenação (que avalia a oxigenação em relação à agressividade pulmonar) mantiveram seu padrão de melhora. Este resultado reafirma as características de recrutamento pulmonar da VOAF. Mesmo após recolocar os coelhos do grupo prona em supino (últimos 30 minutos do experimento) e ventilá-los assim por mais 30 minutos, os valores se mantiveram, mostrando que o recrutamento ainda assim foi mantido por provável influência da VOAF.

O estresse oxidativo pulmonar já foi avaliado por outros autores em modelos semelhantes ao que utilizamos. O método escolhido foi a dosagem de Malondialdeído (MDA), biomarcador da peroxidação lipídica dosado no homogenato de tecido pulmonar.⁷⁷ Rotta et al.³⁵ também utilizaram este método e obtiveram no grupo com LPA ventilado com VOAF valores semelhantes ao grupo controle (sem lesão pulmonar) e significativamente menores aos grupos com LPA e ventilação convencional. No presente estudo, avaliamos o MDA nos grupos prona e supino medidos no homogenato das regiões dorsal e ventral de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos ou entre as áreas pulmonares (ventrais ou dorsais). Acreditamos que não tenha sido possível detectar diferença estatística entre as posições prona e supina, pois a VOAF, *per se*, leva a acentuada melhora do estresse oxidativo, sendo difícil demonstrar o efeito de uma ou outra posição corporal.^{38,65}

O modelo de lavagem com salina aquecida causa reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular e ativação de PMN no BAL.⁷⁸ Em estudo que também utilizou coelhos com lesão pulmonar induzida por salina aquecida, comparando apenas animais em ventilação convencional com animais em VOAF, foi demonstrada redução significativa no número de neutrófilos no BAL dos animais em VOAF, se assemelhando aos níveis medidos em animais sem lesão pulmonar.³⁸ Em estudo clínico Papazian et al.⁶² avaliaram pacientes adultos com SDRA ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 150$ mmHg) em ventilação convencional protetora e posição prona por 12 horas ou em VOAF em posição prona ou supino, também por 12 horas e observaram maior porcentagem de neutrófilos do BAL no grupo supino em ventilação de alta frequência em relação ao grupo prona em ventilação convencional, mostrando maior atividade inflamatória nos animais em supino. Em nosso trabalho observamos que os valores da porcentagem de neutrófilos encontrados no BAL não foram estatisticamente diferente na comparação dos grupos de estudo, apesar de haver tendência a menores valores para a posição prona. Acreditamos que a diferença entre os grupos, encontrada em nosso trabalho, não tenha alcançado significância estatística devido ao tempo de ventilação (150 minutos) e que, se os animais fossem ventilados por mais tempo, esta diferença poderia ser demonstrada.

Ainda em relação à avaliação da inflamação pulmonar, obtivemos valores menores do TNF-alfa no BAL dos animais em posição prona, demonstrando menor lesão inflamatória neste grupo. Este resultado foi reafirmado pela dosagem do homogenato de tecido pulmonar nas regiões ventral e dorsal de cada grupo. Obtivemos valores semelhantemente baixos na região ventral de ambos os grupos e valores altos de TNF-alfa medidos na região dorsal do grupo supino quando comparados aos da posição prona, a qual obteve valores semelhantes aos encontrados nas regiões ventrais. Sabidamente nas regiões dorsais de pacientes ventilados em posição supina predominam o colapso pulmonar, menor relação V/Q e também há menor distribuição do VC para estas áreas, alterações que podem ser melhoradas pela posição prona.^{43,44} Acompanhando estas alterações, mostramos melhora da inflamação pulmonar nas áreas dorsais pulmonares causada pelo posicionamento em prona, quando avaliados animais em VOAF. Não encontramos

outros estudos experimentais que avaliaram a lesão inflamatória pulmonar para animais ventilados em posição prona e supino de forma regional como o nosso.

Quanto à lesão histológica, encontramos maior lesão no grupo supino, não havendo diferença significativa entre as regiões dorsal e ventral dentro de cada grupo. Demonstramos com estes resultados que, apesar de convencionalmente haver maior lesão pulmonar nas regiões dorsais, a posição prona leva a melhora da lesão histopatológica pulmonar como um todo em pacientes em VOAF. Broccard et al. também avaliaram o escore de lesão pulmonar das regiões dependentes e não dependentes em animais ventilados em posição prona em comparação a posição supina em dois estudos, ambos em ventilação convencional, o primeiro (1997) em cães com lesão induzida por ventilação com alto volume corrente e modelo do ácido oleico,⁷⁹ e o segundo (2000) em cães com lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica não protetora.⁴⁷ Em ambos os estudos a posição prona mostrou melhora dos escores de lesão pulmonar semelhantes ao demonstrado pelo nosso estudo, confirmando que a posição prona leva à lesão menos grave e de distribuição mais homogênea quando comparada à posição prona.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a posição prona reduz a lesão pulmonar inflamatória e histopatológica do tecido pulmonar em modelo de LPA induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a VOAF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:43-9.
2. Redding GJ. Current concepts in adult respiratory distress syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2001;13:261-266.
3. Ferrari GF, Richetti SMQ, Moreira FL, Bonatto RC, Carpi MF, Fioretto JR. Síndrome do desconforto respiratório agudo em crianças: incidência, mortalidade e trocas gasosas. *RBTI* 2001; 13(2):58-62.
4. Dahlem P, van Aalderen WMC, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Paediatric Respiratory Reviews* 2007; 8:348-362.
5. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 2004; 141:460-70.
6. Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M, Baglioni S, Rivolta M, Rossi F, et al. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988; 69:824-32.
7. Kolobow T, Moretti MP, Fumagalli R, Mascheroni D, Prato P, Chen V, et al. Severe impairment of lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135(2):312-5.
8. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1990; 16:372-7.
9. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Mechanical ventilation-induced pulmonary edema: interaction with previous lung alterations. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;151:1568-75.
10. Imai Y, Slutsky AS. High-frequency oscillatory ventilation and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2005; 33(3 Suppl.):S129-34.
11. Malarkkan N, Snook NJ, Lumb AB. New aspects of ventilation in acute lung injury. *Anaesthesia* 2003; 58(7):647-67.
12. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000; 284:43-4
13. Tsuno K, Miura K, Takeya M, Kolobow T, Morioka T. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1115-20.
14. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilator strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; 99:944-52.
15. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993; 21:131-43.
16. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:880-4.
17. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342:1301-1308.
18. Chan KPW, Stewart TE. Clinical use of high-frequency oscillatory ventilation in adult patient with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005; 33(3 Suppl.):S170-4.

19. Mehta S, MacDonald R, Hallett DC, Lapinsky SE, Aubin M, Stewart TE. Acute oxygenation response to inhaled nitric oxide when combined with high-frequency oscillatory ventilation in adults with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31(2):383-9.
20. Crotti S, Mascheroni D, Caironi P, Pelosi P, Ronzoni G, Mondino M, et al. Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: a clinical study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(1):131-40.
21. Richard JC, Maggiore SM, Jonson B, Mancebo J, Lemaire F, Brochard L. Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7): 1609-13.
22. Arnold JH, Hanson JH, Toro-Figuero LO, Gutiérrez J, Berens RJ, Anglin DL. Prospective, randomized comparison of high-frequency oscillatory ventilation and conventional ventilation in pediatric respiratory failure. *Crit Care Med* 1994; 22(10):1530-9.
23. Froese AB, McCulloch PR, Sugiura M, Vaclavik S, Possmayer F, Moller F. Optimizing alveolar expansion prolongs the effectiveness of exogenous surfactant therapy in the adult rabbit. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148(3):569-577.
24. Hemmila MR, Napolitano LM. Severe respiratory failure: advanced treatment options. *Crit Care Med* 2006; 34(9 Suppl):S278-90.
25. Fort P, Farmer C, Westerman J, Johannigman J, Beninati W, Dolan S, et al. High-frequency oscillatory ventilation for adult respiratory distress syndrome: a pilot study. *Crit Care Med* 1997; 25(6):937-47.
26. Mehta S, Lapinsky SE, Hallett DC, Merker D, Groll RJ, Cooper AB, et al. Prospective trial of high-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1360-9.
27. Derdak S, Mehta S, Stewart TE, Smith T, Rogers M, Buchman TG, et al. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(6):801-8.
28. Mehta S, Granton J, MacDonald RJ, Bowman D, Matte-Martyn A, Bachman T, et al. High-frequency oscillatory ventilation in adults: the Toronto experience. *Chest* 2004; 126(2):518-27.
29. Gerstmann DR, Minton SD, Stoddard RA, Meredith KS, Monaco F, Bertrand JM, et al. The Provo multicenter early high-frequency oscillatory ventilation trial: improved pulmonary and clinical outcome in respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1996; 98 (6 pt 1):1044-57.
30. Plavka R, Kopecky P, Sebron V, Svihovec P, Zlatohlávková B, Janus V. A prospective randomized comparison of conventional mechanical ventilation and very early high frequency oscillatory ventilation in extremely premature newborns with respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999; 25(1):68-75.
31. Ben Jaballah N, Khaldi A, Mnif K, Bouziri A, Belhadj S, Hamdi A, Kchaou W. High-frequency oscillatory ventilation in pediatric patients with acute respiratory failure. *Pediatr Crit Care Med* 2006; 7(4):362-7.
32. Rosenberg RB, Broner CW, Peters KJ, Anglin DL. High-frequency ventilation for acute pediatric respiratory failure. *Chest* 1993; 104(4):1216-21.
33. Ben Jaballah N, Mnif K, Bouziri A, Kazdaghli K, Belhadj S, Zouari B. High-frequency oscillatory ventilation in paediatric patients with acute respiratory distress syndrome – early rescue use. *Eur J Pediatr* 2005; 164(1):17-21.
34. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, Kawano T, Slutsky AS, Misaka K. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001; 91(4):1836-44.

35. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, Hernan LJ, Steinhorn DM. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; 29(11):2176-84.
36. Viana ME, Sargentelli GA, Arruda AL, Wiryawan B, Rotta AT. The impact of mechanical ventilation strategies that minimize atelectrauma in an experimental model of acute lung injury. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80(3):189-96.
37. Meyer J, Cox PN, McKerlie C, Bienzle D. Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res* 2006; 60(4):401-6.
38. Ronchi CF, Ferreira ALA, Copos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, et al. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Experimental Biology and Medicine* 2011; 236: 1188-96.
39. Casado-Flores J, Azagra AM, Ruiz-López MJ, Ruiz M, Serrano A. Pediatric ARDS: effect of supine-prone postural changes on oxygenation. *Intensive Care Med* 2002; 28:1792-96.
40. Gattinoni L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, D'Andrea L, MAScheroni D. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1991; 74(1):15-23.
41. Bryan AC. Comments of a devil's advocate. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110:143-4.
42. Richard JC, Janier M, Lavenne F, Berthier V, Lebars D, Annat G, et al. Effect of position, nitric oxide, and almitrine on lung perfusion in a porcine model of acute lung injury. *J Appl Physiol* 2002; 93(6):2181-91.
43. Cakar N, der Kloot TV, Youngblood M, Nahum A. Oxygenation Response to a Recruitment Manouver during supine and prone positions in a oleic acid-induced lung injury model. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161:1949:56.
44. Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, et al: Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:387-93.
45. Guerin C, Badet M, Rosselli S, Heyer L, Sab JM, Langevin B, et al. Effects of prone position on alveolar recruitment and oxygenation in acute lung injury. *Intensive Care Med* 1999; 25(11):1222-30.
46. Albert R, Hubmayr R. The prone position eliminates compression of the lungs by the heart. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1660-5.
47. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ. Prone Position attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med* 2000; 28(2):295-303.
48. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, Tedesco C, Maccagni P, Fossali T, et al. Prone position delays the progression of the ventilator-induced laung injury in rats: Does lung strain distribution play a role? *Crit Care Med* 2005; 33(2):361-7.
49. Guerin C, Gaillard S, Lemasson S, Ayzac L, Girard R, Beuret P, et al. Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292(19): 2379-87.
50. Mentezepoulos SD, Roussos C, Zakynthinos E. Prone position reduces lung stress and strain in severe acute respiratory distress syndrome. *Eur Resp Journal* 2005; 25:1046-56.
51. Romero CM, Cornejo RA, Gálvez R, Llanos OP, Tobar EA, Berasaín MA, et al. Extended prone position ventilation in severe acute respiratory distress syndrome: a pilot feasibility study. *J Crit Care* 2009; 24:81-8.
52. Relvas MS, Silver PC, Sagy M. Prone positioning of pediatric patients with ARDS results in improvement in oxygenation IF maintained > 12 h daily. *CHEST* 2003; 124:269-274.
53. Casado-Flores J, Azagra AM, Ruiz-Lopez MJ, Ruiz M, Serrano A. Pediatric ARDS: effect of supine-prone postural changes on oxygenation. *Intensive Care Med* 2002; 28(12):1792-6.

54. Curley MA, Hibberd PL, Fineman LD, Wypij D, Shih MC, Thompson JE, et al. Effect of prone positioning on clinical outcomes in children with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294(2):229-37.
55. Wells DA, Gillies D, Fitzgerald DA. Cambios de posición para el síndrome de dificultad respiratoria aguda en recién nacidos y niños hospitalizados. *La Biblioteca Cochrane Plus* 2008; 2:1-62.
56. Guérin C. Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Critical Care* 2006; 12:50-4.
57. Kopterides P, Siempos II, Amarganidis A. Prone positioning in hypoxemic respiratory failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Crit Care* 2009; 24:89-100.
58. Alsaghir AH, Martin CM. Effect of prone positioning in patients with acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2008; 36(2): 603-9.
59. Sud S, Sud M, Friedrich JO, Adhikari NK. Effect of mechanical ventilation in the prone position on clinical outcomes in patients with acute hypoxemic respiratory failure: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 2008; 178:1153-61.
60. Sud S, Friedrich JO, Taccone P, Polli F, Adhikari NK, Latini R, et al. Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2010; 36(4): 585-99.
61. The ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307(23):2526-33.
62. Papazian L, Gainnier M, Marin V, Donati S, Arnal JM, Demory D, et al. Comparison of prone positioning and high-frequency oscillatory ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005; 33(10):2162-71.
63. Demory D, Michelet P, Arnal JM, Donati S, Forel JM, Gainnier M, et al. High-frequency oscillatory ventilation following prone positioning prevents a further impairment in oxygenation. *Crit Care Med* 2007; 35(1):106-11.
64. Brederlau J, Muellenbach R, Kredel M, Greim C, Roewer N. High frequency oscillatory ventilation and prone positioning in a porcine model of lavage-induced acute lung injury. *BMC Anesthesiol* 2006 Apr 3;6:4
65. Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF, Ferreira AL, Kurokawa CS, Carpi MF, et al. Effects of inhaled nitric oxide on oxidative stress and histopathological and inflammatory lung injury in a saline-lavaged rabbit model of acute lung injury. *Respir Care* 2012; 57 (2): 273-81.
66. Mrozek JD, Smith KM, Bing DR, Meyers PA, Sinmonton SC, Connett JE, et al. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(4 Pt 1):1058-1065.
67. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopatology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 1999; 14(2):84-92.
68. Muir WW. Manual de anestesia veterinária. *Anestesia em coelhos*. 3ª Ed. São Paulo: Artmed; 1993. p312-316.
69. National Research Council of USA. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: National Academy Press; 2000. p59.
70. Maurenbrecher H, Lamy M, Deby-Dupont G, Frascarolo P, Hedenstierna G. An animal model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest* 2001; 120:573-81.
71. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24: 231-6.
72. Hawgood S, Clements JA. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 1990; 86: 1-6.

73. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77: 31–962.
74. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295:L379–L399.
75. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 2008; 40:305–316.
76. Mallory G. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:151–158.
77. Parish LC. Retinoids and carotenoids in dermatology. *JAMA* 2008; 299:1611-1612.
78. Imai T, Fujita T. Unilateral lung injury caused by ischemia without hypoxia in isolated rat lungs perfused with buffer solution. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 830-6.
79. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Ravenscraft SA, MarininJJ. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997; 25(1):16-27.

VAF + POSIÇÃO PRONA X VAF + POSIÇÃO SUPINA EM SDRA EM COELHOS

Hora						
Tempo (min.)	0 *	30	60	90	120 *	150
Posição	Supina					Supina
Amplitude						
MAP	16	16	14	12	10-11	10-11
FR						
pH						
PaCO₂						
PaO₂						
Bic						
Sat.						
BE						
IO						
PaO₂/FiO₂						
FC						
PAM						
Temperatura						
Pancurônio						
Peso do pulmão direito (g)						

$$IO = [(FiO_2 \times MAP) / PaO_2] \times 100 \quad MAP = [(Pip \times Ti) + (Peep \times Te)] / (Ti + Te)$$

$$PAO_2 = [(FiO_2 \times (PB - PH_2O)) - (PaCO_2 / 0,8)].$$

* = Momentos das viradas