

Débora Avellaneda Penatti Satrapa

**COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA POSIÇÃO PRONA E DO
ÓXIDO NÍTRICO INALATÓRIO SOBRE OXIGENAÇÃO,
MECÂNICA RESPIRATÓRIA, LESÃO HISTOPATOLÓGICA E
INFLAMAÇÃO NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE**

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 José Roberto Fioretto

Botucatu – SP

2014

Dedico este trabalho

Ao meu esposo **Rafael**, que sempre me apoia irrestritamente nas minhas decisões, me auxilia nos momentos de incerteza, me revigora nos momentos de fraqueza e é cúmplice nas minhas jornadas. **Não importa se serão momentos bons ou ruins, mas se forem ao seu lado, cada segundo valerá a pena!**

À minha linda filha **Laura**, que com um simples olhar consegue de mim o que ninguém mais conseguiria em mil anos; com uma simples palavra, ainda que dita errada, consegue manter uma alegria infinita em meu coração e, com um sorriso, consegue definir a palavra felicidade!

Aos meus pais **Carlos Alberto e Nívea Mara**, aos meus irmãos **Carlos Alberto e Marco Aurélio**, às minhas cunhadas **Eliana, Gisele, Patrícia e Raquel** e ao meu sogro **Rodolpho**: Não poderemos nunca escolher a família em que vamos nascer, ou os irmãos que iremos conviver, nem ao menos escolher a família com quem vamos nos casar, mas sempre poderemos agradecer: muito obrigada a todos! “Se enxerguei mais longe, é porque me apoiei sobre ombros de gigantes.”

A um lindo casal, responsável pelo início de tudo – **meus avós Anacleto e Wanda (in memorian)** – vocês sempre foram e sempre serão um exemplo de sabedoria, simplicidade e amor! “Ah o amor... que nasce não sei onde, vem não sei como e dói não sei porque”.

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao meu orientador, **Professor Dr. José Roberto Fioretto**: exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar a resposta para a dúvida; mas, sobretudo, ensinou-me a ter paixão pelo saber nas fases de graduação, residência médica e agora durante o mestrado. Obrigada por me ensinar a aprender e por me ensinar a ensinar!

À professora Dra. **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. Especialmente a prof. Dra. **Cilmery**, muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos ao longo destes dois anos.

À minhas colegas de pós-graduação **Rafaelle** e **Suziane** e também aos **alunos de iniciação científica** que, em algum momento, fizeram parte deste trabalho. Especialmente à minha colega de pós-graduação e minha grande amiga **Rafaelle**, por me incentivar na pós-graduação e estar sempre presente nos momentos decisivos de minha vida.

A todos os colegas, médicos, docentes e funcionários do Departamento de Pediatria da FMB. Em especial aos docentes **Dr. Nilton**, **Dra. Mary** e **Dr. Cláudio** que sempre me incentivaram na busca ao conhecimento e me apoiaram nesta fase de pós-graduação, aos médicos **Renato** e **Juliana**, bons amigos e colegas de trabalho e aos funcionários **Adriana**, **Fabiano** e **Paulo** por todo auxílio, disponibilidade e apoio.

Aos meus grandes amigos **Vanessa** e **Bruno**, **Khristiani** e **Igor**, **Rafaelle** e **Rafael**, **Camila**, **Lied** e **Eduardo Razza** que estão sempre ao meu lado em minhas escolhas.

Resumo

Fundamentação/Objetivos: A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) cursa com altos índices de mortalidade apesar do melhor entendimento de sua fisiopatologia e avanços no tratamento. Existem várias terapias adjuvantes à ventilação mecânica (VM), dentre as quais se destaca a posição prona, que possibilita homogeneização da distribuição do volume corrente (VC) e promove recrutamento alveolar, e o óxido nítrico inalatório (NOi) que promove vasodilatação pulmonar seletiva direcionando o fluxo sanguíneo de áreas mal ventiladas para áreas bem ventiladas e com perfusão diminuída, otimizando a relação ventilação/perfusão e melhorando a oxigenação, com diminuição da resistência vascular pulmonar. Pela melhora da relação ventilação/perfusão, o gás pode permitir o emprego de VM menos agressiva, que, por sua vez, pode diminuir o risco de lesão pulmonar induzida pela VM e a morbidade. **Objetivo:** comparar os efeitos da posição prona com os do NOi sobre a oxigenação, mecânica respiratória, lesão histopatológica e inflamatória em modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA). **Métodos:** Cinquenta coelhos foram instrumentados com traqueostomia e acessos vasculares e ventilados mecanicamente. A LPA foi induzida por infusão traqueal de salina aquecida (30mL/Kg, 38°C). Os coelhos foram submetidos à VMC protetora e distribuídos em quatro grupos: 1) animais com LPA em VMC protetora em posição supina (GVMS; n=15); 2) animais com LPA em VMC protetora + posição prona (GVMP; n=15); 3) animais com LPA em VMC protetora + NOi em posição supina (GVNO; n=15) e 4) animais sem lesão pulmonar submetidos à VMC protetora (sadio – GS; n=5). Os desfechos foram: oxigenação, avaliada pela relação PaO_2/FiO_2 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 lesão histológica pulmonar determinada por meio de escore histológico de lesão. O nível de significância avaliado foi 5%. **Resultados:** Depois da indução, os grupos com LPA apresentaram comprometimento importante da oxigenação, com diminuição da relação PaO_2/FiO_2 e aumento do índice de oxigenação em relação ao GS ($p<0,05$). A porcentagem de PMN recuperados do BAL também apresentou diferença entre os grupos. Houve aumento estatisticamente significativo da porcentagem de neutrófilos no GVMS em relação aos demais grupos. Os níveis de TNF-alfa foram mais elevados no BAL do GVMS em relação aos outros grupos ($p<0,05$). O escore de lesão histológica para as regiões dorsais foi maior para o GVMS que para os demais grupos ($p<0,05$). **Conclusões:** Não há diferença significativa entre a posição prona e o óxido nítrico inalatório quanto a oxigenação, mecânica respiratória e redução de lesão pulmonar inflamatória e histopatológica pulmonar em modelo de LPA induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a VMC protetora. . O emprego de terapias adjuvantes trouxe benefícios em relação ao não uso destas modalidades de tratamento.

Fomento: FAPESP (2010/06242-8).

Abstract

Background/Objectives: The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is associated with high mortality rate despite better understanding of its pathophysiology and treatment advances. There are several adjuvant therapies that can be associated to mechanical ventilation (MV), among which stands out the prone position, which allows homogeneous tidal volume (VT) distribution and promotes alveolar recruitment; and inhaled nitric oxide (iNO) which promotes selective pulmonary vasodilation directing blood flow from areas poorly ventilated to well-ventilated areas and decreased perfusion, optimizing the ventilation/perfusion ratio and improving oxygenation with reduced pulmonary vascular resistance. Improved ventilation/perfusion ratio, allows the use of lesser aggressive mechanical ventilation (MV) treatment, which reduces the risk of lung injury induced by MV and morbidity. **Objective:** To compare the effects of prone position with iNO on oxygenation, respiratory mechanics, inflammatory and histological injury in an experimental model of acute lung injury (ALI). **Methods:** Fifty rabbits were instrumented with tracheotomy and vascular access and mechanically ventilated. ALI was induced by tracheal infusion of warm saline (30mL/kg, 38°C). Rabbits underwent protective conventional mechanical ventilation (CMV) were divided in four groups: 1) Animals with ALI in protective CMV + supine position (GVMS, n=15), 2) animals with ALI in protective CMV + prone position (GVMP, n=15) and 3) animals with ALI in protective CMV + iNO in supine position (GVNO, n=15). Additionally, there were five animals without lung injury submitted to protective CMV (Healthy group - GS, n=5). The outcomes were oxygenation, measured by $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio and oxygenation index (OI), lung inflammation assessed by the percentage of polymorphonuclear cells (PMN) in bronchoalveolar lavage (BAL) and TNF- α measured in BAL, and histological pulmonary injury determined by a injury score. The significance level was 5%. **Results:** After induction, ALI groups showed poor oxygenation, with decreased $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio and increased oxygenation index compared to GS ($p < .05$). The percentage of PMN cells recovered from BAL also showed difference among groups. There was a significant increase in the percentage of neutrophils in GVMS compared to the other groups. TNF α levels were higher in BAL from GVMS compared to the other groups ($p < .05$), as well as, histopathological injury score for lung dorsal areas was higher for GVMS compared to the other groups ($p < .05$). **Conclusions:** There is no significant difference comparing prone position and inhaled nitric oxide by oxygenation indexes, respiratory mechanics and reduced inflammatory and histopathological lung injury in this experimentally induced ALI model submitted to protective CMV. The use of adjuvant therapies has improved benefits regarding the non-use of these treatment modalities.

Grant: FAPESP (2010/06242-8).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração representativa do protocolo de estudo.....	21
Figura 2 – Pressão arterial média ao longo do tempo para os grupos experimentais.....	24
Figura 3 – Evolução da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ no período experimental.....	26
Figura 4 – Evolução do índice de oxigenação ($\text{MAP} \times \text{FiO}_2 \times 100/\text{PaO}_2$).....	27
Figura 5 – Representação dos níveis teciduais de TNF-alfa a partir do lavado broncoalveolar dos grupos sadio (GS), ventilação mecânica em posição prona (GVMP), em posição supina (GVMS) e com óxido nítrico (GVNO) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey.....	28
Figura 6 – Representação da porcentagem de neutrófilos medida no líquido broncoalveolar para os grupos experimentais [sadio (GS), ventilação mecânica em posição prona (GVMP), em posição supina (GVMS) e com óxido nítrico (GVNO)] na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey.....	29
Figura 7 – Escore de lesão histológica no tecido pulmonar, nas regiões dorsais dos grupos sadio (GS), ventilação mecânica em prona (GVMP), ventilação mecânica em supina (GVMS) e ventilação mecânica e óxido nítrico (GVNO).....	30

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Variáveis de comparação dos grupos ventilação mecânica em supino (GVMS), ventilação mecânica em prona (GVMP), ventilação mecânica com óxido nítrico (GVNO) e grupo sadio (GS) antes e depois da indução da lesão pulmonar.....	25
--	----

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
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
PMN	Polimorfonucleares
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
PAM	Pressão arterial média
Ti	Tempo inspiratório
<i>et al.</i>	Colaboradores
bpm	Batimentos por minuto
cmH ₂ O	Centrímetros de água
Hz	Hertz
Kg	Kilo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mg	Miligrama
ng	Nanograma
µm	Micrograma
H	Hora
min	Minuto
°C	Graus Celsius
SD	Desvio Padrão
NNMU	N-nitroso-N-metiluretano

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

1- Introdução..... 10

2- Materiais e Métodos 17

2.1 Obtenção, preparo e aleatorização dos animais17

2.2 Instalação de modelo de lesão pulmonar aguda.....19

2.3 Administração de óxido nítrico inalatório.....19

2.4 Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica20

2.5 Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar21

2.6 Medida da concentração de TNF-alfa em lavado broncoalveolar.....21

2.7 Manipulação dos pulmões e histologia pulmonar.....22

2.8 Variáveis analisadas23

2.9 Análise estatística23

3- Resultados 24

3.1 Hemodinâmica, mecânica pulmonar e trocas gasosas 24

3.2 Processo Inflamatório Alveolar 28

3.3 Histopatologia 30

4- Discussão 31

4.1 Escolha da espécie animal 31

4.2 Manipulação dos animais31

4.3 Características gerais dos grupos.....32

4.4 Modelo de lesão pulmonar aguda32

4.5 Resposta ao óxido nítrico inalatório e à posição prona.....34

5- Conclusões 37

6- Referências Bibliográficas 38

7- Modelos de Protocolos Utilizados (ANEXOS 1 e 2) 46

1. Introdução

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é doença grave e potencialmente fatal¹. 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 oxigênio². 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 SDRA, sendo capaz de modificar a evolução da doença. Baseado no conceito de comprometimento homogêneo do parênquima pulmonar que prevalecia até 1980, o suporte ventilatório na SDRA era fornecido utilizando-se volume corrente (VC) elevado, 10 a 15 mL/Kg, bem acima daquele empregado em pacientes sem doença pulmonar. Tais valores de VC eram utilizados 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 a observação, por meio de estudo tomográfico dos pulmões, de que o comprometimento do parênquima pulmonar na SDRA não é homogêneo, existindo áreas de pulmão normal⁶. 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 inspiratória, até então empregados rotineiramente. A LPIVM pode ser definida como a lesão que ocorre em áreas de pulmão normal de pacientes submetidos à VM e que simula a LPA. Superdistensão repetitiva dos pulmões 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. A mudança cíclica no volume pulmonar parece ser causa importante de LPIVM, sugerindo que uma estratégia ventilatória que evite grandes variações no volume pulmonar possa ser benéfica^{10,11}. Assim, a ideia que predomina atualmente é a de que o emprego de VC alto, com geração de 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 sadias¹²⁻¹⁶ 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 volume corrente baixo (6 mL/kg) e pressão de platô limitada em 30 cmH₂O. O trabalho teve que ser interrompido com 861 pacientes, pois a mortalidade foi significativamente menor no grupo ventilado com volume corrente baixo. Surgiu, então, o conceito de ventilação mecânica convencional protetora (VMC).

A recomendação atual para a VMC protetora na SDRA é a utilização de VC baixo (6-8 mL/Kg), pressão de platô limitada em 30 cmH₂O e pressão expiratória final positiva (PEEP) elevada, em modos limitados a pressão¹⁷, 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 VMC protetora pode não garantir a oxigenação e a ventilação. Nestes casos, tanto em adultos como em crianças, estratégias terapêuticas adicionais à ventilação mecânica vêm sendo desenvolvidas, destacando-se entre elas a posição prona¹⁹.

Os estudos tomográficos de pulmões com SDRA descritos anteriormente, além de demonstrarem que o comprometimento pulmonar era heterogêneo, evidenciaram 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, quando o paciente está em posição supina²⁰. 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 elevadas²¹. Desta forma, a colocação do paciente em posição prona passou a integrar o arsenal de possibilidades terapêuticas adjuvantes na SDRA.

A posição prona, primeiramente descrita por Bryan²², 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 perfundidas²³. Há

melhora da relação V/Q nas regiões dorsais, onde o colapso pulmonar e a relação V/Q desigual predominam na posição supina²⁴; 2) homogeneização da distribuição do VC associada com alterações na mecânica da parede torácica²⁵; 3) recrutamento alveolar²⁶; 4) redirecionamento de forças compressivas exercidas pelo peso do coração sobre os pulmões²⁷; 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 baixas que na posição supina e o efeito da posição prona sobre a oxigenação é mantido após voltar a posição supina²⁴. Foi demonstrado, em cães, que a posição prona promove LPIVM de menor gravidade e mais homogênea que a posição supina²⁸. Estes resultados foram, posteriormente, confirmados por Valenza et al²⁹, 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 VC 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 al³⁰ realizaram estudo multicêntrico, controlado e randomizado com 791 pacientes adultos com insuficiência respiratória hipoxêmica aguda ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$) em VM. Não houve diferença na mortalidade de 28 dias entre os grupos prona e supina e também 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 al³¹ avaliaram 10 adultos com SDRA grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$) sob FiO_2 de $0,79 \pm 0,07$, PEEP de $9,4 \pm 1,3 \text{ cmH}_2\text{O}$ e VC de $9,0 \pm 0,9 \text{ ml/Kg}$ ajustados para manter a pressão de platô pulmonar abaixo de $30 \text{ cmH}_2\text{O}$. 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 al³², em 2009, estudaram 15 adultos com SDRA grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$) submetidos a posição prona por maior tempo, 48 horas ou mais, até conseguir índice de oxigenação (IO) menor do que 10. Os autores demonstraram melhora

significativa da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 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 (2003)³³, mantiveram 40 crianças, de 1 mês a 18 anos de idade, continuamente em prona e observaram diminuição do IO, aumento da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, 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 (2002)³⁴ utilizaram a posição prona em 23 crianças com SDRA, mudando de prona para supina a cada oito horas. Observaram que três em cada quatro crianças responderam à posição prona com melhora da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, 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 e bem tolerado e que melhora a oxigenação na maioria das crianças com SDRA.

Em 2005 foi publicado estudo³⁵ controlado e randomizado com 102 crianças de duas semanas a 18 anos de idade com o diagnóstico de lesão pulmonar aguda. O estudo mostrou 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 saturação³⁶.

Em revisão publicada em 2006, Guérin³⁷ 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)³⁶ ou com SDRA (5 estudos com 1.316 pacientes)³⁸. 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)³⁹. 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 graves³⁹. Em 2010, Sud et al⁴⁰ 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 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$).

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

Outra terapia adjuvante que vem ganhando destaque na prática clínica é o óxido nítrico inalatório (NOi)⁴¹⁻⁴³. Levando-se em consideração a presença de hipertensão pulmonar na fisiopatologia da SDRA e as possíveis complicações da VM protetora, entende-se que a administração de medicações vasodilatadoras seria útil para o tratamento. No entanto, os vasodilatadores intravenosos disponíveis não apresentam especificidade para o leito vascular pulmonar e podem reduzir a pressão arterial sistêmica, agravando ainda mais o *shunt* intrapulmonar por vasodilatação não seletiva de artérias que perfundem áreas pulmonares mal ventiladas, com piora da relação ventilação/perfusão nestas áreas e diminuição da PaO_2 ⁴⁴. Por esta razão a atenção voltou-se para um vasodilatador específico da circulação pulmonar.

No final de 1980, o óxido nítrico (NO) foi identificado como fator de relaxamento derivado do endotélio⁴⁵. O NO é uma combinação 1:1 de dois dos mais abundantes gases da atmosfera, sendo sintetizado a partir da L-arginina pela ação da NO sintase e liberado após ativação química e mecânica. Quando produzido nas células vasculares endoteliais, o gás difunde-se para as células musculares lisas adjacentes e ativa a guanil-ciclase que determina aumento da produção do GMP cíclico (guanosine 3,5'-monophosphate). O aumento do GMP cíclico diminui a concentração de cálcio intracelular com relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação⁴⁶. Destaca-se que, devido à alta afinidade pela hemoglobina, o NO, quando administrado por via inalatória,

é inativado rápida e especificamente no sangue, não promovendo vasodilatação da circulação sistêmica. O gás exibe efeitos macro e microseletivos sobre a vasculatura pulmonar. O efeito macroseletivo é obtido por meio de vasodilatação direta das artérias pulmonares e o microseletivo deve-se à sua ação limitada às regiões pulmonares bem ventiladas. Esta vasodilatação seletiva direciona o fluxo sanguíneo de áreas mal ventiladas para áreas bem ventiladas e com perfusão diminuída, otimizando a relação ventilação/perfusão e melhorando a oxigenação, com diminuição da resistência vascular pulmonar e da pós-carga do ventrículo direito. Pela otimização da relação ventilação/perfusão, o gás pode permitir o emprego de VM menos agressiva, que, por sua vez, pode diminuir o risco de lesão pulmonar induzida pela VM e a morbidade. Além disso, há relatos de que o NOi pode regular a resposta inflamatória e imune, diminuir a pressão capilar pulmonar, a formação de edema pulmonar e reduzir o seqüestro pulmonar de neutrófilos⁴⁷.

No começo de 1990, os efeitos benéficos do NOi sobre a oxigenação, hipertensão pulmonar e índice cardíaco foram descritos em adultos⁴⁸ e crianças⁴⁹ com SDRA. Rossaint et al.⁴⁸ publicaram em 1993 os primeiros relatos de efeitos do NOi na SDRA em adultos, demonstrando diminuição do shunt intrapulmonar e melhora da oxigenação arterial. Abman et al.⁴⁹, no ano seguinte, descreveram efeitos benéficos do gás sobre a oxigenação, hipertensão pulmonar e índice cardíaco em crianças com a síndrome. Posteriormente, vários trabalhos, enquanto confirmaram os efeitos imediatos, não demonstraram resposta sustentada da terapia com NOi em adultos^{50,51} ou crianças^{52,53}. No entanto, Dobyns et al.⁵⁴, em estudo randomizado e controlado, observaram resposta sustentada ao NOi versus terapia com placebo em subgrupos de crianças (aquelas com índice de oxigenação ≥ 25 e as imunodeprimidas). Os autores admitiram que o tratamento com NOi não sustentou a melhora da oxigenação em todos os pacientes pois os mesmos foram incluídos em estágios tardios da doença (depois de três a cinco dias do diagnóstico).

Seguindo a ideia dos efeitos benéficos da administração precoce, foi publicado, em 2001, protocolo de administração precoce de NOi em crianças com SDRA. Demonstrou-se melhora imediata e sustentada da oxigenação utilizando o NOi tão precocemente quanto 12 horas depois do diagnóstico da doença, suportando a hipótese de que o tratamento precoce com o gás pode ser mais efetivo⁵⁵.

Em 2003, *The Cochrane Library* publicou revisão sistemática sobre os efeitos do NOi em falência respiratória hipoxêmica aguda de adultos e crianças, com atualização em 2006⁵⁶. Cinco estudos randomizados e controlados foram analisados, avaliando 535 pacientes. A revisão concluiu que o NOi é útil apenas como terapia de salvamento, nas primeiras 24 horas de doença. Vale ressaltar que dos cinco estudos analisados, apenas o de Dobyns et al.⁵⁴ foi realizado em crianças e que a conclusão final indicou que o potencial efeito da terapia com NOi em pacientes com SDRA está para ser definido, principalmente em crianças.

Em 2004, nosso grupo publicou os efeitos da administração precoce de NOi na SDRA comparando um grupo composto de crianças seguidas prospectivamente e que recebeu NOi associado à terapia convencional (GNOi) com um grupo histórico de pacientes que utilizou apenas terapia convencional (GTC). A terapia com NOi foi introduzida tão cedo quanto 1,5 horas depois do diagnóstico de SDRA, em pacientes otimamente ventilados com níveis apropriados de PEEP ($\geq 10\text{cmH}_2\text{O}$). Demonstrou-se melhora imediata da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e do índice de oxigenação. Da mesma forma, o tratamento prolongado associou-se com melhora da oxigenação, tanto que a FiO_2 e a PIP puderam ser rápida e significativamente reduzidas. Concluiu-se que o tratamento precoce com NOi causa melhora imediata e sustentada da oxigenação, com redução mais precoce de parâmetros ventilatórios associados com alto risco de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica e toxicidade pelo oxigênio (PIP e FiO_2). Especulou-se que o emprego do NOi tenha permitido redução da agressividade da VM e atenuado o processo inflamatório, com diminuição da mortalidade⁵⁷.

Estes resultados podem ser explicados, em parte, pois o NOi e os produtos de sua oxidação apresentam efeitos antiinflamatórios (diminuição da ativação de linfócitos e da adesão leucocitária) e interferem com o metabolismo oxidativo^{58,59}. Sustentando a hipótese de que a administração precoce de NOi pode ser benéfica na SDRA, Razavi et al.⁶⁰, publicaram estudo sobre os efeitos do NOi em lesão pulmonar induzida por sepse, em modelo experimental de ratos. Os autores concluíram que a exposição precoce ao NOi no curso da lesão pulmonar aguda induzida por sepse associa-se à redução da infiltração leucocitária e menor lesão oxidativa.

Apesar dos possíveis efeitos benéficos do NOi, vários estudos não têm atribuído valor ao gás devido a falta de impacto sobre a mortalidade^{54,61,62}. Assim, seu uso tem se

restringido a terapia de curta duração no suporte cardiorrespiratório de pacientes com hipoxemia aguda ameaçadora da vida ou hipertensão pulmonar⁶³. Confirmando estes resultados, recente metanálise mostrou que o NOi melhorou a oxigenação sem melhorar os desfechos clínicos em crianças e adultos com LPA/SDRA⁶⁴.

Considerando os potenciais efeitos benéficos da posição prona, principalmente os relacionados à melhora do recrutamento alveolar, nossa hipótese é que a posição prona determina melhora mais acentuada da oxigenação, mecânica respiratória, com lesão pulmonar histopatológica, inflamatória de menor intensidade quando comparada com o NOi.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da posição prona com os do NOi sobre a oxigenação, mecânica respiratória, lesão histopatológica e inflamatória em modelo experimental de LPA.

Os desfechos analisados foram índices fisiopatológicos de lesão pulmonar aguda: oxigenação e trocas gasosas; histologia; nível de TNF-alfa e contagem de polimorfonucleares no fluido do lavado broncoalveolar.

2. Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental (protocolo número 795) da instituição e foi realizado no Laboratório Experimental do Centro de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

2.1. Obtenção, Preparo e Distribuição dos Animais

Trata-se de estudo prospectivo, controlado, *in vivo* e em animais de laboratório. 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 para traqueotomia, dissecação da artéria carótida e veia jugular interna. Traqueotomia foi realizada, sendo 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 Inter 7 plus (*Intermed, São Paulo, Brasil*). Os parâmetros iniciais colocados: modo pressão-regulada volume controlado (AC/PRV), com VC alvo de 6 mL/Kg; frequência respiratória (FR) de 40 ciclos por minuto, ajustada de acordo com a PaCO_2 ; tempo inspiratório (T_i) de 0,5 segundo; PEEP de 5 cmH_2O ; fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 1,0. Estes parâmetros foram mantidos por período de estabilização de 15 minutos até o momento da indução da lesão pulmonar. Em seguida, o único parâmetro do ventilador modificado até o final do experimento foi a PEEP.

Depois da traqueotomia, a artéria carótida e a veia jugular interna foram dissecadas. Na artéria, introduzido um cateter de lúmen único (22 Gauge *Jelco, Introcan® SafetyTM - B-Braun, Melsungen, Germany*) e na veia, um cateter de duplo lúmen (5^{Fr.} - *Arrow International Inc., Reading, Philadelphia-USA*). O cateter arterial foi utilizado para obtenção de gasometrias e para monitorização 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. Caso a PAM atingisse valores inferiores a 50 mmHg, em qualquer momento dos experimentos, era

iniciada infusão intravenosa contínua de noradrenalina em dose inicial de 0,5 $\mu\text{g/Kg/min}$ e, em não havendo resposta, a dose era aumentada até 2 $\mu\text{g/Kg/min}$. Se ainda assim não houvesse resposta, era adicionada adrenalina na dose de 0,1 a 0,3 $\mu\text{g/Kg/min}$.

Durante o experimento, a temperatura corporal foi monitorada com o auxílio de um termômetro digital por via retal, sendo mantida entre 38°C 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.

2.2. *Instalação do modelo de LPA*

A lesão pulmonar aguda foi induzida conforme técnica previamente descrita⁶⁵⁻⁶⁷. Resumidamente, através da cânula traqueal foram realizadas seis lavagens sucessivas do pulmão com soro fisiológico aquecido entre 37°C e 38°C em alíquotas de 30 mL/Kg, a uma pressão máxima de 30 cmH₂O. Cada procedimento de lavagem teve duração de 60 segundos, sendo 20 segundos reservados para infusão e o tempo restante para retirada, a qual foi realizada por gravidade, movimentos externos de compressão torácica e gentil sucção. Completada a retirada, o procedimento foi repetido a cada 3-5 minutos até atingir relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mmHg, confirmada após 10 minutos de estabilização. Se o critério não fosse atingido, eram realizadas duas lavagens na sequência e, depois de 10 minutos, nova gasometria era obtida e assim sucessivamente até atingir relação $\text{PaO}_2/\text{FO}_2 < 100$ mmHg. Atingindo o critério, os animais foram aleatorizados para compor os grupos experimentais utilizando-se uma sequência randômica gerada por computador (www.randomizer.org).

2.3. *Administração de óxido nítrico inalatório*

A administração do NOi seguiu as normas anteriormente descritas pelo grupo^{42,43,68}, sendo a dose de 5 ppm mantida ao longo do experimento. Resumidamente, o gás misturado com nitrogênio foi obtido a partir de tanques de 20L, conectados a um regulador de pressão (AGA Medical S.A., São Paulo, Brasil). A concentração nos tanques foi certificada pelo fornecedor como sendo 300 partes por milhão (ppm) de

óxido nítrico em nitrogênio. A fração de NOi foi continuamente liberada para os pacientes, via fluxômetro, diretamente dentro do ramo inspiratório do circuito do aparelho de ventilação mecânica, distalmente ao umidificador, há 30 cm do tudo endotraqueal. As concentrações de NOi e de dióxido de nitrogênio foram medidas por meio de sensor eletroquímico (J P Moryia Ind & Com Ltda., São Paulo, Brasil) a partir de amostras de gás obtidas o mais próximo possível do tudo endotraqueal. O alarme audiovisual foi mantido em uma dose de 1 ppm acima da dose de NOi ditada pelo protocolo e a um nível máximo de NO₂ de 3 ppm. O sensor eletroquímico foi calibrado diariamente.

2.4. *Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica*

Cinquenta animais foram escolhidos ao acaso para compor quatro grupos experimentais, a saber:

- Animais com LPA em VMC protetora em posição supina (GVMS; n=15);
- Animais com LPA em VMC protetora + posição prona (GVMP; n=15);
- Animais com LPA em VMC protetora + NOi em posição supina (GVNO; n=15)
- Animais sadios submetidos à VMC protetora (sadio – GS; n=5).

Os animais submetidos à LPA foram ventilados conforme descrito anteriormente, isto é, modo pressão-regulada volume controlado, com VC alvo de 6 mL/Kg, FR de 40 ciclos por minuto, Ti de 0,5 segundo, PEEP de 5 cmH₂O e FiO₂ de 1,0. A PEEP foi aumentada até 10 cmH₂O no final da primeira hora do experimento e assim mantida até o final de quatro horas.

Após confirmação da LPA o coelho foi colocado em posição prona ou mantido em supina com uso de óxido nítrico inalatório ou somente mantido em supino sem qualquer das terapias adjuvantes, sendo este momento denominado tempo zero (T0). Posteriormente, os animais foram ventilados por quatro horas, sendo colhidas gasometrias arteriais nos seguintes momentos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, conforme demonstra Figura 1. O tempo de quatro horas foi escolhido levando-se em conta a viabilidade de coelhos neste tipo de experimento, por nós já atestada, e em razão

dos estudos citados anteriormente que demonstraram efeitos agudos, clínicos e experimentais, da posição prona e do óxido nítrico.

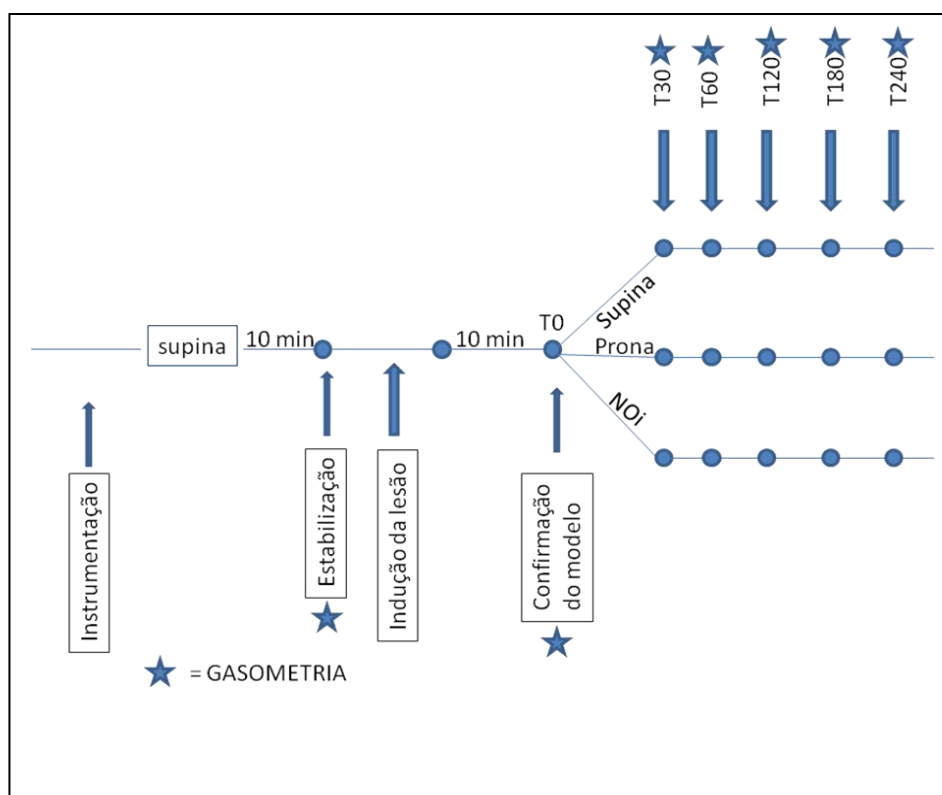


Figura 1: Ilustração representativa do protocolo de estudo.

2.5. 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 foi medido e centrifugado. As células obtidas por centrifugação foram ressuspensas 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.

2.6. Medida da concentração de TNF-alfa no fluido de lavagem pulmonar

A dosagem de TNF-alfa do BAL foi realizada utilizando o método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), conforme Imai et al.⁶⁵ e protocolo fornecido

pelo fabricante (PharMingen®). O método de ELISA utilizou anticorpo policlonal de cabra anti-TNF-alfa como anticorpo de captura na concentração de 4 µg/mL e um anticorpo de cabra policlonal anti TNF-alfa biotinizado como anticorpo de revelação.

2.7. 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 foi 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 nos quais foi realizado o lavado broncoalveolar, o brônquio fonte direito foi 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 foi coletado para análise do lavado broncoalveolar. Nos animais submetidos à análise histológica, o bloco traqueia/pulmão/coração foi removido, os pulmões e a traqueia separados do coração e o pulmão esquerdo preenchido com solução de formol a 10%. O preenchimento foi 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 contém formol e na outra a traqueia do animal. A partir desse sistema o formol gotejou por gravidade, lentamente, de forma a preencher os espaços alveolares, preservando sua arquitetura. Após período mínimo de fixação de 24 horas, fragmentos foram 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. Para o estudo histológico os cortes foram examinados sob microscopia óptica. 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, totalizando 50 análises para cada animal. 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^{69,70}.

2.8. Variáveis analisadas:

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

- a) Variáveis hemodinâmicas: frequência cardíaca e pressão arterial média;
- b) Gasometria arterial: pH, PaO₂, PaCO₂, HCO₃⁻, BE e SaO₂;
- c) Parâmetros ventilatórios: fração inspirada de oxigênio, tempo inspiratório, frequência respiratória e pressão média das vias aéreas;
- d) Mecânica pulmonar: complacência pulmonar estática.
- e) Índices derivados para avaliar trocas gasosas: relação PaO₂/FiO₂, índice de oxigenação (FiO₂ × pressão média vias aéreas × 100/PaO₂).
- f) Processo inflamatório alveolar: nível de TNF-alfa e contagem de polimorfonucleares no fluido do lavado alveolar e TNF-alfa no homogeinato de tecido pulmonar.
- g) Histologia: descrito no item Manipulação dos pulmões e Histologia Pulmonar.

2.9. Análise Estatística

Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre os diversos grupos experimentais por meio de análise de variância (ANOVA), com subseqüentes comparações múltiplas entre pares por meio do teste de Bonferroni. Variáveis de distribuição não normal foram comparadas entre os diversos grupos por meio de ANOVA de Kruskal-Wallis, com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn. A análise do comportamento de uma variável ao longo do tempo, em caso de distribuição normal, foi avaliada por meio de ANOVA de medidas repetidas com comparação entre pares com o teste de Bonferroni e em caso de distribuição não normal foi utilizado o teste de medidas repetidas de Friedman, com comparações posteriores pelo método de Dunn. O teste *t* foi utilizado para comparar o número de lavagens pulmonares entre os grupos tratados. Foi utilizado nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Hemodinâmica, Mecânica Pulmonar e Trocas Gasosas

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

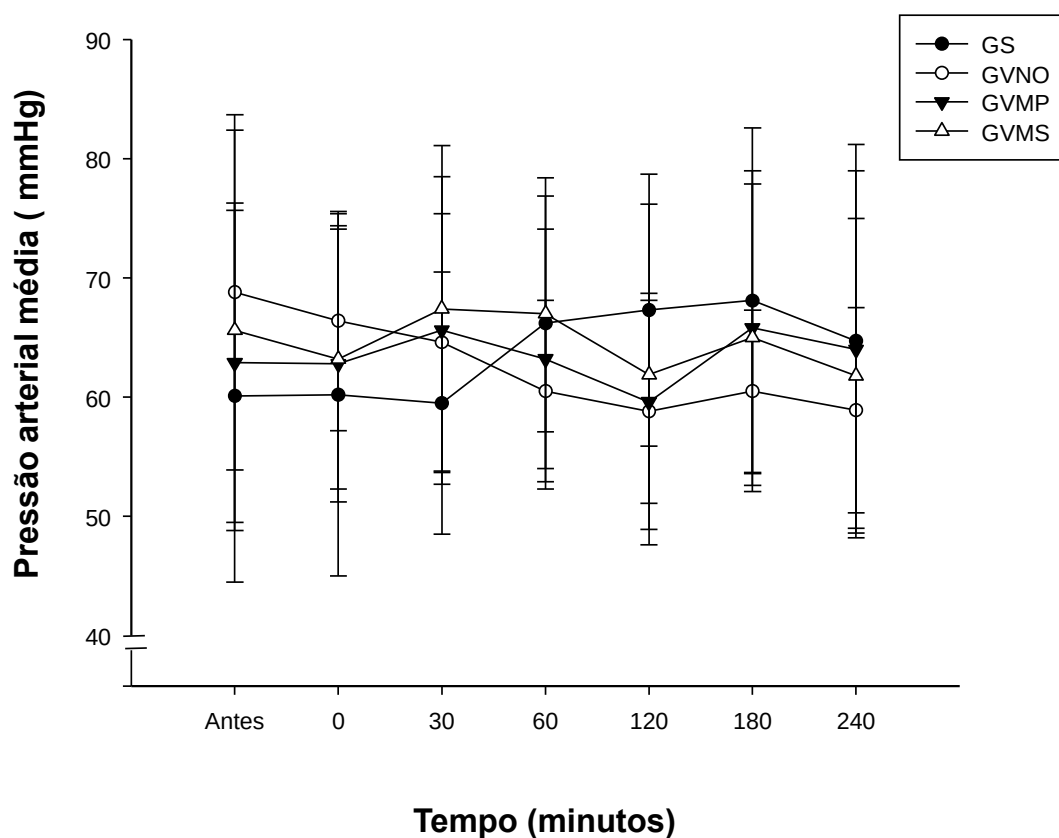


Figura 2: Pressão arterial média ao longo do tempo para os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. Não houve diferença estatística significativa entre os momentos experimentais de cada grupo e na comparação entre os grupos ($p > 0,05$). Testes: ANOVA de Medidas Repetidas 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 pulmonar ($p>0,05$). Houve diferença entre os grupos para a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, IO, complacência estática e pressão média de via aérea (MAP), comparando os momentos antes e depois da indução da lesão pulmonar (Tabela 1). O grupo controle não sofreu lesão pulmonar.

Tabela 1: Variáveis de comparação dos grupos ventilação mecânica em supino (GVMS), ventilação mecânica em prona (GVMP), ventilação mecânica com óxido nítrico (GVNO) e grupo sadio (GS) antes e depois da indução da lesão pulmonar.

Variáveis		Grupos			
		GVMS (n=15)	GVMP (n=15)	GVNO	GS
Peso (Kg)		2,5± 0,2	2,7 ± 0,4	2,5±0,2	2,5±0,3
Número de lavagens		10,2 ± 8,6	10,0±2,2	7,7±2,8	-
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	Antes da indução da lesão	447,7±61,5	458,3 ± 47,6	445,8±73,7	444,2±59,4
	Após a indução da lesão	74,5 ± 15,5*	69,8 ± 10,6*	80,7±23,7*	-
Índice de oxigenação (cm H₂O/mm Hg)	Antes da indução da lesão	3,7±5,7	1,9 ± 0,4	1,7±0,3	1,9±0,3
	Após a indução da lesão	15,4±4,4*	14,9±3,5*	14,0±5,1*	-
Complacência pulmonar estática (cmH₂O)	Antes da indução da lesão	1,8±0,5	1,7±0,3	3,2±0,4	1,7±0,6
	Após a indução da lesão	0,6±0,2 *	0,7±0,2 *	1,2±0,2*	-
Pressão média de via aérea (cmH₂O)	Antes da indução da lesão	8,9±1,3	8,9±1,3	7,4±0,6	8,5±0,8
	Após a indução da lesão	11,3±1,4*	10,2±1,4 *	10,3±0,9 *	-

P > 0,05 comparando peso e número de lavagens entre os grupos.

* p < 0,001 comparando as medidas de cada grupo após indução da lesão.

Comparação dos grupos: análise de variância; Teste t.

Após 240 minutos sob ventilação mecânica protetora, os três grupos de estudo apresentaram relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ estatisticamente menores quando comparada com o GS (Figura 3). Não houve diferença estatística entre os grupos submetidos à lesão pulmonar quanto a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ao final do experimento.

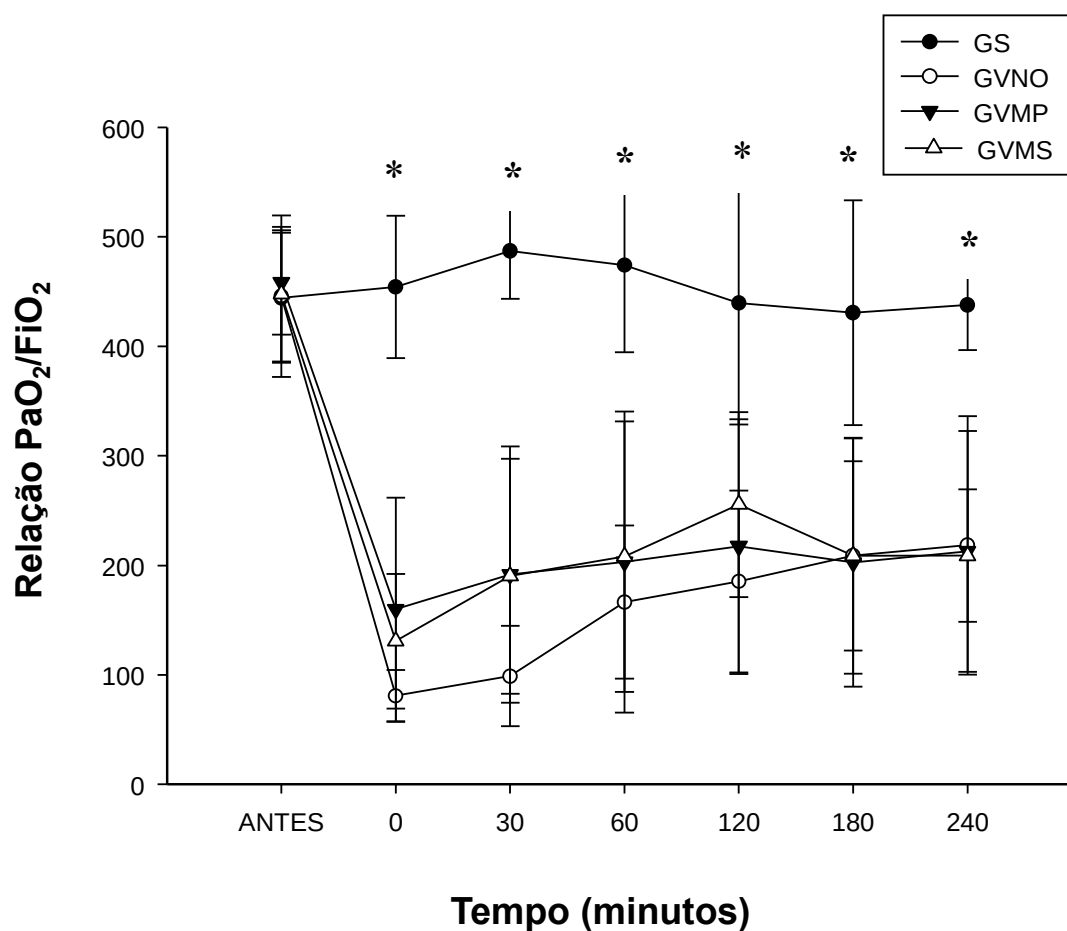


Figura 3: Evolução da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ no período experimental. Os grupos não diferiram estatisticamente entre si antes da lesão pulmonar ($p > 0,05$). Após a indução (T0), os três grupos lesados evoluíram com hipoxemia significativa em relação ao GS.

* $p < 0,05$ em relação ao GS.

Testes estatísticos: ANOVA de Medidas Repetidas para comparar os momentos.

Em acordo com os resultados obtidos para a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, os grupos ventilação mecânica com óxido nítrico, ventilação mecânica em supino e ventilação mecânica em prona apresentaram índice de oxigenação significativamente pior quando comparados ao GS (figura 4). Não houve diferença estatística significativa quando foram comparados os grupos com lesão pulmonar entre si.

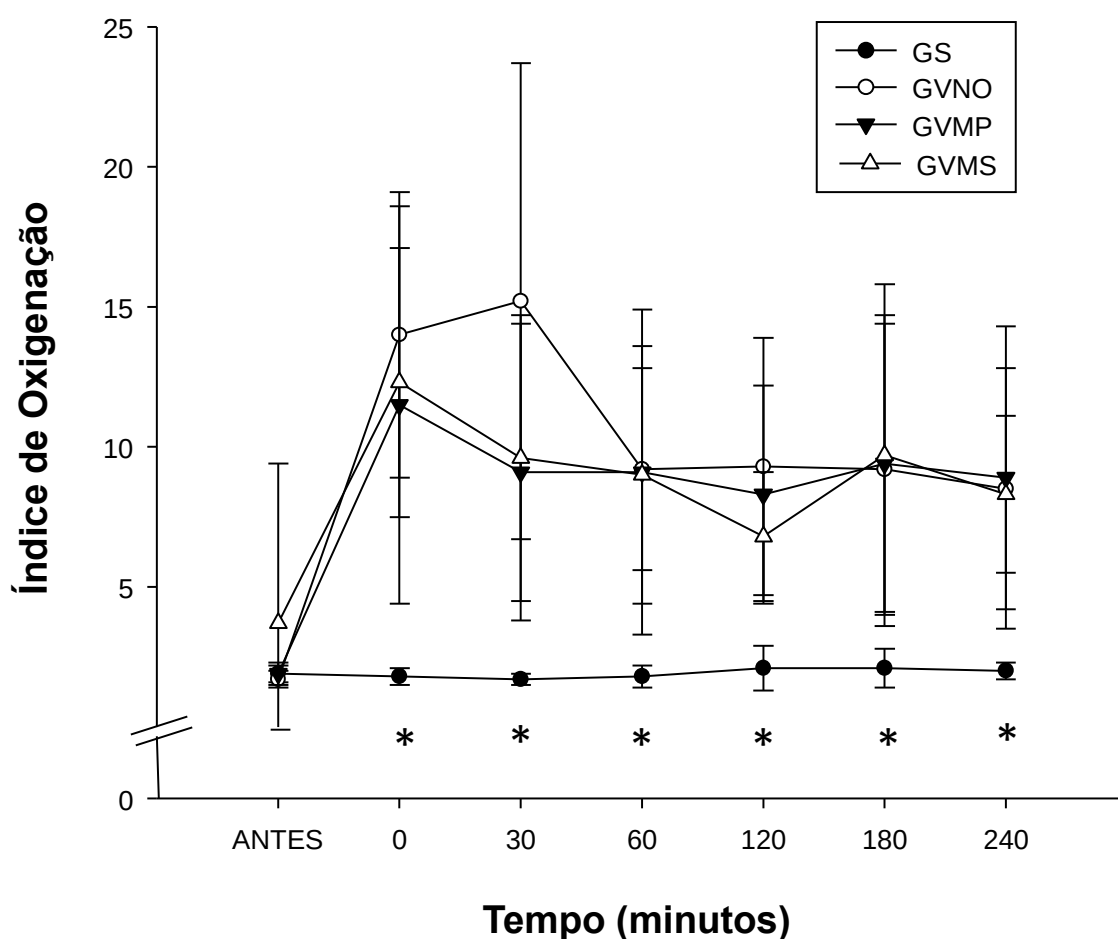


Figura 4: Evolução do índice de oxigenação ($\text{pressão aérea média} \times \text{FiO}_2 \times 100 / \text{PaO}_2$). Testes estatísticos: ANOVA de Medidas Repetidas para comparar os momentos.

3.2. Processo Inflamatório Alveolar

Os níveis de TNF-alfa no BAL foram significativamente maiores no GVMS quando comparado com os outros grupos (figura 5). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos com ventilação mecânica protetora em posição prona e com óxido nítrico inalatório.

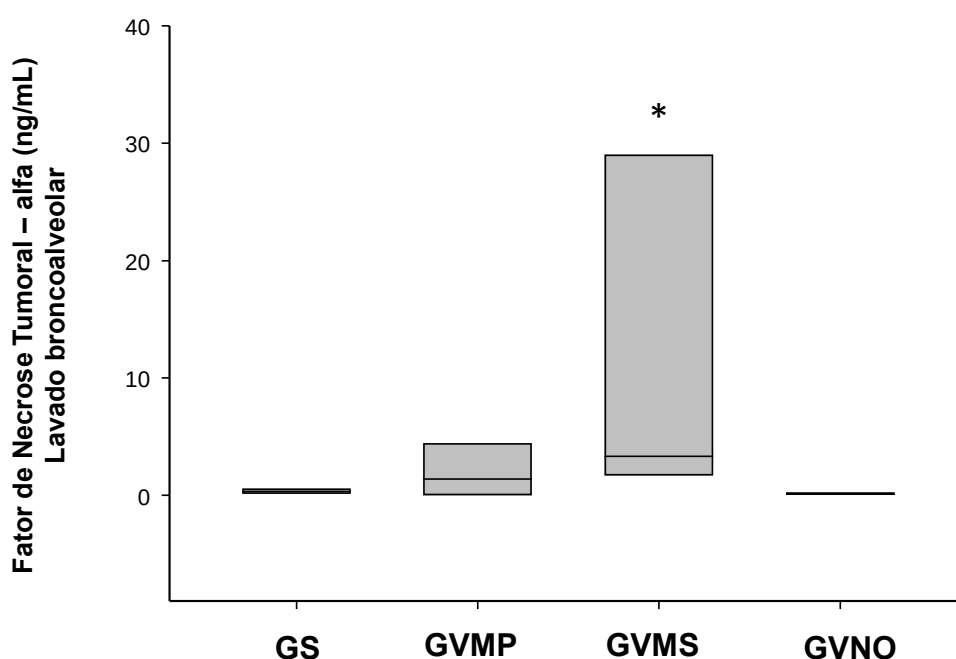


Figura 5: Representação dos níveis teciduais de TNF-alfa a partir do lavado broncoalveolar dos grupos sadio (GS), ventilação mecânica em posição prona (GVMP), em posição supina (GVMS) e com óxido nítrico (GVNO) na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. *: $p < 0,05$ comparando GVMS com GS, GVMP e GVNO. Teste: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

Os níveis de neutrófilos no BAL não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos com lesão pulmonar (Figura 6).

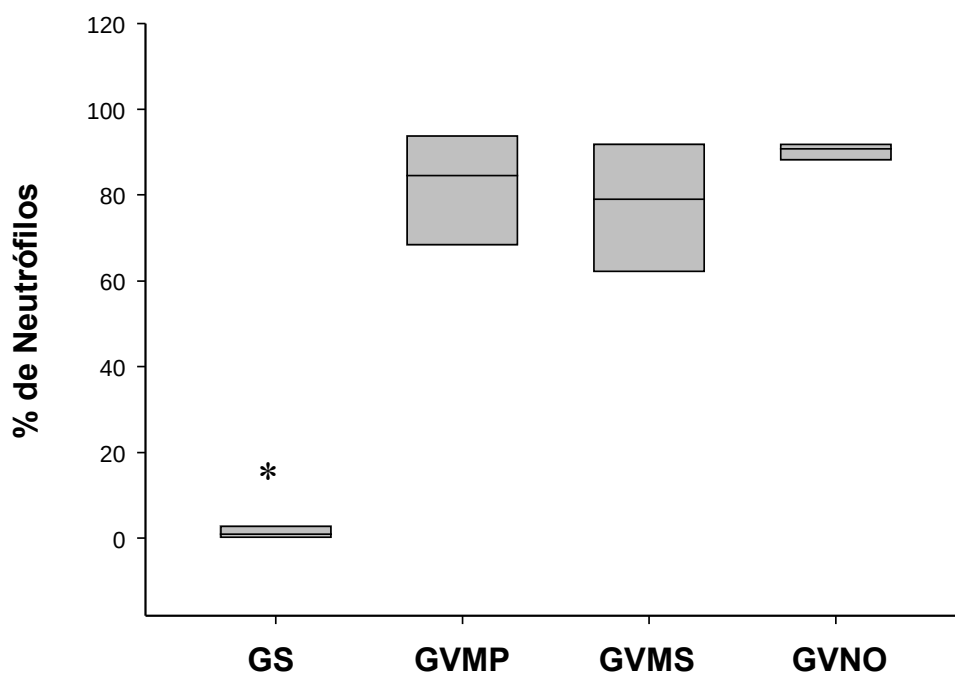


Figura 6: Representação da porcentagem de neutrófilos medida no líquido broncoalveolar para os grupos experimentais [sadio (GS), ventilação mecânica em posição prona (GVMP), em posição supina (GVMS) e com óxido nítrico (GVNO)] na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey. As bordas inferiores dos retângulos indicam os percentis 25, as linhas horizontais dentro dos retângulos marcam as medianas e as porções superiores indicam os percentis 75. *: $p < 0,001$ comparando GS com os demais. Teste: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

3.3 Histopatologia

O Escore de lesão histológica pulmonar (Figura 7) foi maior para o grupo supino em relação ao grupo sadio ($p<0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre os demais grupos [GS: 0,6 (0,8-0,6); GVNO: 1,8 (2,4-1,1); GVMP: 2,0 (3,1-1,5); GVMS: 2,1 (2,3-1,9)].

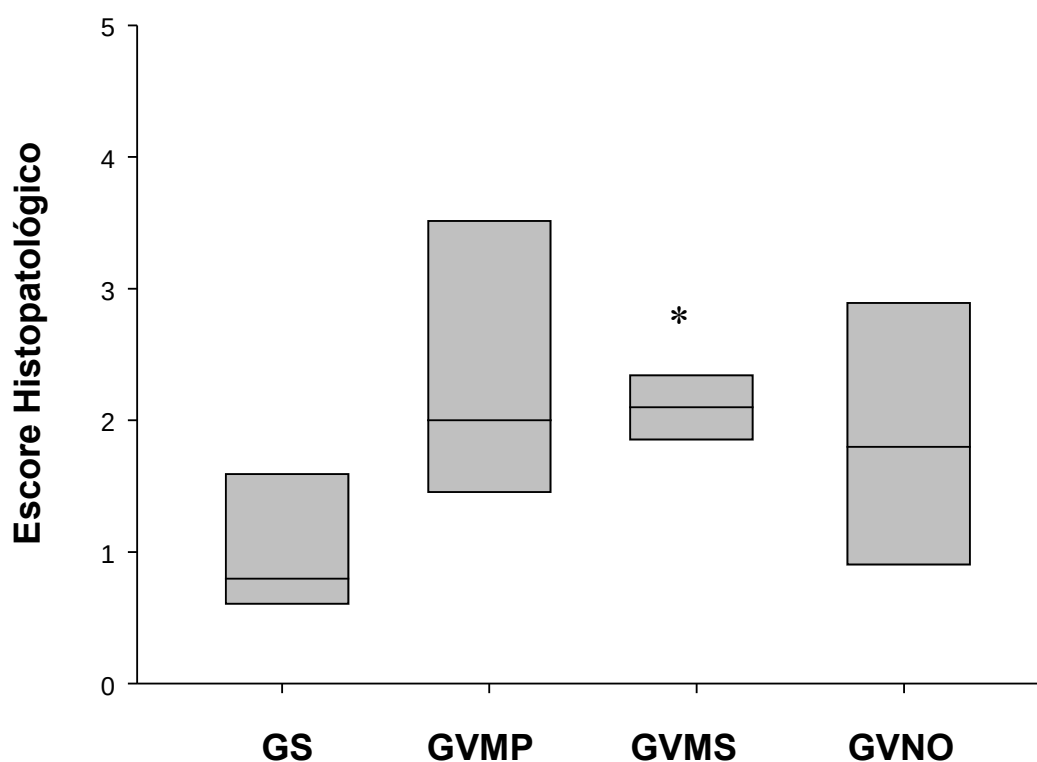


Figura 7: Escore de lesão histológica no tecido pulmonar, nas regiões dorsais dos grupos sadio (GS), ventilação mecânica em prona (GVMP), ventilação mecânica em supina (GVMS) e ventilação mecânica e óxido nítrico (GVNO). *: lesão histológica significativamente maior no GVMS comparado com o GS ($p<0,05$). Teste: Kruskal-Wallis one Way Analysis of Variance on ranks.

4. Discussão

Enquanto vários estudos avaliaram os efeitos da VMC protetora sobre oxigenação, mecânica respiratória e inflamação em modelos experimentais de LPA, esse é um estudo comparando os efeitos isolados de duas das principais terapias adjuvantes (posição prona e óxido nítrico inalatório) nesta modalidade de ventilação. Até onde pudemos constatar, não existem estudos que tenham avaliado histologicamente a lesão pulmonar quando óxido nítrico e posição prona são usados separadamente, utilizando como controle tanto um grupo sadio quanto um grupo com LPA sem o uso de terapias adjuvantes.

4.1. *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^{66,70,71} e por estas razões o coelho foi escolhido.

4.2. *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^{66,70}. 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. 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%⁷², em acordo com os dados apresentados.

4.3. Características gerais dos grupos

Os animais dos quatro grupos não diferiram quanto ao peso, variáveis de oxigenação e ventilação, variáveis metabólicas e hemodinâmicas antes de serem submetidos à indução da lesão pulmonar. Tal fato é importante para garantir homogeneidade dos grupos para que os mesmos pudessem ser comparados. A figura 1 e a tabela 1 demonstram claramente que não houve diferença estatisticamente significativa entre PAM, peso e número de lavagens entre os grupos, antes da lesão pulmonar.

4.4 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 processo⁷³.

O modelo de lavagem pulmonar com salina aquecida foi desenvolvido por Lachmann et al., em 1980⁷⁴, 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 BAL⁷⁵. Neste modelo, solução isotônica de salina aquecida é infundida nos pulmões e imediatamente removida, em lavagens sucessivas. Os ciclos de lavagem reduzem a concentração de lipídeos do surfactante na superfície alveolar alterando a tensão da superfície alveolar. A substância surfactante é uma complexa mistura de proteínas e fosfolípidos com várias funções fundamentais para os pulmões⁷⁵. 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 alvéolo⁷⁶. 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 VM⁷⁷. A formação de um grupo submetido à VMC protetora sem lesão (GS) em

nosso estudo objetivou eliminar esse fator de viés. A esse respeito, a Figura 2 mostra que a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ manteve-se estável durante todo o experimento no GS, indicando que a ventilação mecânica não produziu dano alveolar significativo. Entretanto, nos demais grupos, após a indução da lesão com salina aquecida, houve hipoxemia grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$).

Vários outros modelos foram descritos para a indução de LPA em animais⁷⁷, 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 escolhido neste trabalho 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 adjuvantes⁷⁸⁻⁸⁰.

Cabe a ressalva, no entanto, de que nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características da SDRA/LPA em humanos^{77,81}. Modelos de LPA em coelhos, por exemplo, associam-se com o dobro da produção de óxido nítrico comparado a SDRA em humanos⁷⁷. 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^{77,81}. 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 alveolares⁸².

A característica deste modelo é promover hipoxemia quase imediata com aumento do *shunt* intrapulmonar e consequente diminuição da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, como observado no presente 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 do GVNO, GVMP e GVMS, sem diferença significativa entre o número de lavagens, como apresentado na Tabela 1. Da mesma forma, o IO nos três grupos com lesão pulmonar apresentou o mesmo comportamento: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com lesão, mas houve diferença estatisticamente significativa entre estes grupos e o GS. 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^{65,70,78, 80,74}.

Para definir que a lesão pulmonar tinha efetivamente ocorrido, escolhemos o nível de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100 \text{ mmHg}$, pois alguns estudos experimentais que também utilizaram este método de indução de lesão pulmonar utilizaram estes níveis de relação para definir a lesão^{35,68} da mesma forma que este nível de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ é o utilizado na prática corrente para indicar doença grave⁸³.

4.5. Resposta ao óxido nítrico inalatório e à posição prona.

O emprego do NOi já está bem estabelecido sob duas condições, ou seja, início precoce e adequado nível de abertura dos alvéolos⁸⁴⁻⁸⁶. A responsividade ao gás pode ser significativamente influenciada pela aplicação de PEEP adequada. De acordo com recentes recomendações, a utilização do NOi em SDRA deve ser limitada a pacientes

otimamente ventilados com níveis apropriados de pressão expiratória, uma vez que esta técnica permite a abertura de alvéolos adicionais para a troca gasosa^{86,87}. O aumento da PEEP melhora a oxigenação, sugerindo que as anormalidades nas trocas gasosas na SDRA refletem colapso alveolar, sem comprometimento da integridade da unidade de troca gasosa^{65,88}. Em nosso experimento, os animais submetidos à LPA apresentaram melhora da oxigenação, indicando resposta dos mesmos à aplicação da VMC protetora com PEEP otimizada, porém os animais não conseguiram atingir os valores de PaO_2 apresentados pelos animais do GS, até o final do experimento. Esse achado pode ser explicado por vários fatores, pois a LPA/SDRA é uma síndrome complexa com inúmeras vias interligadas⁸⁹, como segue: 1) Tem sido descrito que a lavagem com salina aquecida é útil para indução da SDRA, porém, não existe modelo experimental capaz de reproduzir todas as alterações encontradas na SDRA de seres humanos, como descrito anteriormente⁸⁹. Assim é que a descrição de modelos respondedores e não respondedores ao gás já foi estudada por vários autores^{73,90}. Gust et al.⁹⁰ verificaram que a adição de baixas doses de endotoxina bacteriana ao modelo de SDRA provocado por ácido oleico transformou este modelo de não respondedor em respondedor ao NO_i ; 2) diminuição da produção endógena de NO, pois estímulos provocados por citocinas, endotoxinas e hipóxia estimulariam a NO sintase contrapondo o reflexo vasoconstrictor hipóxico e diminuindo a ação do gás^{91,92}; 3) O efeito do NO_i torna-se máximo a partir de quatro horas⁸⁶, dificultando a demonstração de seus efeitos sobre a oxigenação em modelos de animais que tem período limitado de viabilidade de experimentação, como os coelhos.

Além da oxigenação, o modelo de lavagem com salina aquecida causa reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular e ativação de PMN no BAL⁹³. O NO_i , entretanto, pode modificar a liberação de citocinas bem como a de outros mediadores inflamatórios⁹². O gás tem efeito inibitório sobre a ativação de moléculas de adesão que refletem o número de neutrófilos PMN na área de lesão pulmonar⁹⁴. Observamos que não houve significativo decréscimo do número de PMN para os animais do GVNO comparado aos grupos GVMP e GVMS, indicando que o gás não influenciou a migração destas células, provavelmente pelo curto espaço de tempo ocupado pelo experimento e pela razão desta avaliação ser menos sensível que outros índices de inflamação pulmonar.

Quanto aos achados histopatológicos típicos da SDRA/LPA foi possível demonstrar efeito protetor do NOi e da posição prona já que o escore de lesão histológica foi maior no GVMS comparado com os grupos com LPA em uso de óxido nítrico e posição prona. Vale a ressalva de que as análises histológicas foram efetuadas por dois patologistas experientes e que não sabiam a que grupos pertenciam os animais. Nosso grupo publicou recentemente um estudo⁸⁰ com semelhantes resultados histopatológicos, reafirmando o efeito protetor do gás sobre a arquitetura pulmonar. Broccard et al⁹⁵ avaliaram o escore de lesão pulmonar das regiões dependentes e não dependentes em animais ventilados em posição prona em comparação com 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 oleico⁹⁵, e o segundo (2000) em cães com lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica não protetora²⁸. Em ambos os estudos a posição prona melhorou os escores de lesão pulmonar, como demonstrado pelo nosso estudo, confirmando que a posição prona leva à lesão menos grave e de distribuição mais homogênea quando comparada à posição supina.

Corroborando o achado de efeito protetor do NOi, obtivemos maiores valores do TNF-alfa no BAL dos animais em posição supino, sem óxido nítrico, demonstrando maior lesão inflamatória neste grupo em que não há nenhuma terapia adjuvante. Obtivemos níveis elevados de TNF-alfa nos animais do grupo supino quando comparados aos da posição prona, óxido nítrico inalatório e grupo sadio. 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^{24,25} e óxido nítrico inalatório. Até onde pudemos constatar, não há estudos experimentais que tenham avaliado a lesão inflamatória pulmonar para animais ventilados em posição prona e supino e que também tenham utilizado o óxido nítrico inalatório.

5. Conclusões

Não há diferença significativa entre a posição prona e o óxido nítrico inalatório quanto a oxigenação, mecânica respiratória e lesão pulmonar inflamatória e histopatológica do tecido pulmonar em modelo de lesão pulmonar induzida por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos submetidos a VMC protetora. O emprego de terapias adjuvantes trouxe benefícios em relação ao não uso destas modalidades de tratamento.

6. 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. Fioretto JR, Ferrari GF, Ricchetti SMQ, et al. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo em Crianças: Incidência, Mortalidade e Trocas Gasosas. *RBTI* 2001; 2:58-62.
4. Dahlem P, van Aalderren WMC, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Pediatr Resp Rev* 2007; 8: 348-362.
5. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 2004; 141:460-70.
6. Gattinoni L, Presenti A, Bombino M. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988;69:824-32.
7. Kolobow T, Moretti MO, Fumagelli R. Severe impairment of lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:312-5.
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;58:647-67.
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 and Stewart TE. Clinical use of high-frequency oscillatory ventilation in adult patient with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005;3(Suppl.):S170-S174.
19. Casado-Flores J, Azagra AM, Ruiz-López MJ, et al. Pediatric ARDS: effect of supine-prone postural changes on oxygenation. *Intensive Care Med* 2002; 28:1792-1796.
20. Gattinoni L, Presenti A, Bombino M. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988;69:824-32.
21. Gattinoni L, Pelosi P, Vitale G, et al. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1991;74:15-23.
22. Bryan AC. Comments of a devil's advocate. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:143 – 4.
23. Richard JC, Janier M, Lavenne F, et al: Effect of position, nitric oxide, and almitrine on lung perfusion in a porcine model of acute lung injury. *J Appl Physiol* 2002; 93:2181-2191.
24. Cakar N, der Kloot TV, Youngblood M, et al. A. Oxygenation Response to a Recruitment Manouver during supine and prone Positions in a Oleic Acid-Induced Lung Injury Model. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1949:56.

25. 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; 157:387–393.
26. Guerin C, Badet M, Rosselli S, et al: Effects of prone position on alveolar recruitment and oxygenation in acute lung injury. *Intensive Care Med* 1999; 25:1222–1230.
27. Albert R, Hubmayr R: The prone position eliminates compression of the lungs by the heart. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1660–1665.
28. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, et al. Prone Position attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med* 2000; 28:295-303.
29. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, et al. Prone position delays the progression of the ventilator-induced lung injury in rats: Does lung strain distribution play a role? *Crit Care Med*. 2005; 33:361-367.
30. Guérin C, Gaillard S, Lemasson S, et al. Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292: 2379-2387.
31. Mentezepoulos SD, Roussos C, Zakynthinos E. Prone position reduces lung stress and strain in severe acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2005; 25: 1046-1056.
32. Romero CM, Cornejo RA, Gálvez R, Llanos OP, Tobar EA, et al. Extended prone position ventilation in severe acute respiratory distress syndrome: a pilot feasible study. *J Crit Care* 2009; 24: 81-88.
33. 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.
34. 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; 28:1798-1796.
35. Curley MAQ, Hibberd PL, Fineman LD, et al. Effect of prone positioning on clinical outcomes in children with acute lung injury. A randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 229-237.

36. Wells DA, Gillies D, Fitzgerald DA. Cambios de posicion para el syndrome de dificultad respiratoria aguda en recién nacidos y niños hospitalizados. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;
37. Guérin C. Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 50-54.
38. Kopterides P, Siempos II, Amarganidis A. Prone positioning in hipoxemic respiratory failure: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Critical Care* 2009; 24: 89-100.
39. Alsaghir AH, Martin CM. Effect of prone positioning in patients with acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis. *Critical Care Medicine* 2008; 36(2): 603-609.
40. Sud S, Sud M, Friedrich JO, Adhikari NKJ. Effect of mechanical ventilation in the prone position on clinical outcomes in patients with acute respiratory failure: a systematic review and meta-analysis.
41. Fioretto JR, Carpi MF, and Bonatto RC. Inhaled nitric oxide for children with acute respiratory distress syndrome. In: Esquinas A and Volsko TA, editors. *Yearbook of Respiratory care clinics and applied technologies*. Murcia, Tipografia San Francisco S.A.; 2008, p.747-751.
42. Fioretto JR, Moraes MA, Bonatto RC, Ricchetti SMQ and Carpi MF. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2004 ; 5:469-474.
43. Fioretto JR, Batista KA, Carpi MF, et al. High-Frequency Oscillatory Ventilation Associated With Inhaled Nitric Oxide Compared to Pressure-Controlled Assist/Control Ventilation and Inhaled Nitric Oxide in Children: Randomized, Non-Blinded, Crossover Study. *Pediatric Pulmonol* 2011;46:809-816.
44. Radermacher P, Santak P, Becker H, et al. Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen V/Q distribution in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1989; 70:601-609.
45. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
46. Coggins MP and Block KD. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1877-1885.

47. Fioretto JR. Inhaled nitric oxide in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)* 2003;79(Supl.2):S177-S186.
48. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, et al. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328:399-405.
49. Abman SH, Griebel JL, Parker DK, et al. Acute effects of inhaled nitric oxide in children with severe hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr* 1994; 124:881-888.
50. Lotti GA, Olivei MC, Palo A, et al. Acute effects of inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *Eu Respir J*, 1998; 12:1164-71.
51. Troncy E, Collet JP, Shapiro S, et al. Inhaled nitric oxide in acute respiratory distress syndrome. A pilot randomized controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998;157:1483-1488.
52. Okamoto K, Hamaguchi M, Kukita I, et al. Efficacy of inhaled nitric oxide in children with ARDS. *Chest* 1998; 114:827-833.
53. Ream RS, Hauver JF, Lynch RE, et al. Low-dose inhaled nitric oxide improves the oxygenation and ventilation of infants and children with acute, hypoxemic respiratory failure. *Crit Care Med* 1999; 27:989-996.
54. Dobyns EL, Cornfield DN, Anas NG, et al. Multicenter randomized controlled trial of the effects of inhaled nitric oxide therapy on gas exchange in children with acute hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr* 1999; 134:406-412.
55. Fioretto JR, Bonatto RC, Ricchetti SMQ, et al. Early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome and its effects on oxygenation and ventilator settings: prospective preliminary report of ten patients. *Croat Med J* 2001;42:527-534.
56. Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute hypoxemic respiratory failure in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(3):CD002787
57. Fioretto JR, Moraes MA, Bonatto RC, et al. Acute and sustained effects of early administration of inhaled nitric oxide to children with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2004; 5:469-474.
58. Royall JA, Kooy NW, Beckman JS. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. *New Horizons* 1995;3:113-122.
59. Bevilacqua JG and De Caterina R. Inhaled nitric oxide: more than a selective pulmonary vasodilator. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:628-635.
60. Razavi HM, Werhun R, Scott JA, et al. Effects of inhaled nitric oxide in a mouse model of sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2002; 30:868-873.

61. Day RW, Guarin M, Lynch JM, Veron DD, Michael DJ. Inhaled nitric oxide in children with severe lung disease: Results of acute and prolonged therapy with two concentrations. *Crit Care Med* 1996; 24:215-221;
62. Ream RS, Hauver JF, Lynch RE, Kountzman B, Gale GB, Mink RB. Low dose inhaled nitric oxide improves the oxygenation and ventilation of infants and children with acute, hypoxemic respiratory failure. *Crit Care Med* 1999; 27:989-996.
63. Griffiths MJD and Evan TW. Inhaled Nitric Oxide Therapy in Adults. *N Engl J Med* 2005; 353:2683-2695.
64. Adhikari NK, Burns KE, Friedrich JO, Granton JT, Cook DJ, Meade MO. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: Systematic review and metanalysis. *BMJ* 2007; 334:779.
65. Imai Y, Nakagawa S, Ito Y, et al. Comparison of lung protection strategies using convencional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001; 91:1836-1844.
66. Viana MEG, Sargentelli GA, Arruda ALM, et al. The impact of mechanical ventilation strategies that minimize atelectrauma in an experimental model of acute lung injury. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80:189-196.
67. Lachmann B, Robertson B and Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesth Scand* 1980; 24:231-236.
68. Fioretto JR. Uso do óxido nítrico em pediatria. *J Pediatr (Rio J)* 2003;79(Supl.2):S177-S186.
69. Mrozek JD, Smith KM, Bing DR, et al. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1058-1065.
70. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, et al. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopatology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care* 1999; 14:84-92.
71. Muir WW. Manual de anestesia veterinária. *Anestesia em coelhos*. 3ª Ed. São Paulo: Artmed; 1993. p312-316.
72. National Research Council of USA. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: National Academy Press; 2000. p59.

73. Maurenbrecher H, Lamy M, Deby-Dupont G et al. An animal model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest* 2001; 120:573–581.
74. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. in vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24: 231–236.
75. Hawgood S, Clements JA. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 1990; 86: 1–6.
76. 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.
77. Mallory G. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:151–158.
78. Ronchi CF, Ferreira ALA, Copos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Bonatto RC, Defaveri J, Yeum KJ, Fioretto JR. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Experimental Biology and Medicine* 2011; 236: 1188-1196.
79. Ronchi CF, Fioretto JR, Ferreira ALA, Berchieri-Ronchi CB, Correa CR, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Yeum K-J. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 112: 1184–1190, 2012.
80. Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF, Ferreira ALA, 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. *Respiratory care* 2012; 57 (2): 273-281.
81. 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.
82. Mallory G. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:151–158.
83. The ARDS Definition Task Force*. Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307:2526-2533.
84. Hsu CW, Lee DL, Lin SL et al. The initial response to inhaled nitric oxide treatment for intensive care unit patients with acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2008; 75:288-295.

85. Fioretto JR. Óxido nítrico inalatório na síndrome do desconforto respiratório agudo. *Rev Paul Ped* 2000; 18:201-204.
86. Cuthbertson BH, Dellinger P, Dyar OJ et al. UK guidelines for the use of inhaled nitric oxide therapy in adult ICUs. *Intensive Care Med* 1997; 23:1212-1218.
87. Fioretto JR, Carpi MF, and Bonatto RC. In: Inhaled nitric oxide for children with acute respiratory distress syndrome. Esquinas A and Volsko TA (Eds). Murcia, Tipografia San Francisco S.A., 2008, pp.747-751.
88. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP, et al. Comparison of lung protective ventilation strategies in a rabbit model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; 29:2176-2184.
89. Bastarache J.A. Blackwell T.S. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech* 2009; 2, 218-223.
90. Gust R, McCarthy TJ, Kozlowski J, et al. Response to inhaled nitric oxide in acute lung injury depends on distribution of pulmonary blood flow prior to its administration. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:563–570.
91. Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ et al. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8:515–522.
92. Weimann J, Bloch KD, Takata M et al. Congenital NOS2 deficiency protects mice from LPS-induced hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide. *Anesthesiology* 1999; 91:1744–1753.
93. 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: 830–836.
94. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4651–4655.
95. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL et al. 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. *Critical Care Medicine* 1997; 25 (1): 16-27.

Anexo 1: POSIÇÃO PRONA x NOi

Hora						
Tempo (min.)	0	* 30	60	120	180	240
Posição	Prona					
Amplitude						
MAP	15	15	15	15	15	15
FR						
pH						
PaCO ₂						
PaO ₂						
Bic						
Sat.						
BE						
IO						
PaO ₂ /FiO ₂						
FC						
PAM						
Temperatura						
Pancurônio						
Peso do pulmão direito (g)						

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

$$\text{Índice de eficiência ventilatória} = IEV = 3800 / [(Pip - Peep) \times PaCO_2 \times FR_{mec}]$$

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

* = Momentos das mudanças de posição

Anexo 2: CONTROLE DURANTE A INDUÇÃO DE LPA

Data:

Animal n°:

Peso:

Volume

lavagem:

Grupo de estudo:

Hora							
Nº lavagens	Pré-indução						
VC (ml/kg)							
MAP							
P insp.							
Peep							
FR							
pH							
PaCO₂							
PaO₂							
Bic							
Sat.							
BE							
IO							
PaO₂/FiO₂							
Compl. Estática							
IEV							
FC							
PAM							
Temperatura							
Pancurônio							

CONTROLE DAS LAVAGENS

[illegible]