UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Rafaelle Batistella Pires

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

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientador: Prof. Titular Dr. José Roberto Fioretto

Botucatu
2018

Rafaelle Batistella Pires

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

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientador: Prof. Titular Dr. José Roberto Fioretto

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pires, Rafaelle Batistella.
Comparação entre posição prona e posição supina, associadas à ventilação mecânica convencional protetora, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda / Rafaelle Batistella Pires. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: José Roberto Fioretto
Capes: 40101088

1. Pulmões - Doenças. 2. Respiração artificial. 3. Ventilação mecânica. 4. Decúbito ventral. 5. Decúbito dorsal.

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

RAFAELLE BATISTELLA PIRES

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

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientador: Prof.Titular Dr. José Roberto Fioretto

Comissão examinadora

_____
Prof. Titular Dr. José Roberto Fioretto
Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP),

_____
Prof. Dr. Mário Ferreira Carpi
Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP),

_____
Prof. Dr. Carlos Fernando Ronchi
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU),

_____
Prof. Dr. Fábio Carmona
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

_____
Prof. Dr. Marcelo Barciela Brandão
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP)

Botucatu, 20 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho:

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

*À minha filha **Angelina**, meu maior incentivo, meu amor incondicional, e que me ensina todos os dias o real sentido da vida.*

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

*A meus pais, **Antonio e Maria**, por todo amor, carinho, incentivo e toda dedicação que me permitiu hoje estar aqui.*

*A meus 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, e que contribuiu imensamente na minha formação profissional e de vida.

Aos colegas da UTI pediátrica da UNESP, por todo ensinamento e anos de companheirismo, em especial ao **Dr. Mário e Dr. Marcos,** que participaram ativamente deste trabalho.

À pós-graduanda **Suziane** pelo auxílio no andamento deste experimento.

À **Dra. Cilmery** e aos funcionários do Laboratório de Pesquisa Clínica e Experimental do Departamento de Pediatria: **Paulo, Regina, Cristina e Renata**, pela disponibilidade e dedicação, permitindo a conclusão deste experimento.

Aos secretários do departamento de Pediatria da FMB: **Fabiano, Adriana e Paulo**, por todo auxílio, disponibilidade e apoio.

À **Ana Mengue**, Secretária da Pós-graduação, por todo auxílio e atenção.

Aos colegas do HRAC, em especial ao **Enf. Armando**, por todo apoio e incentivo.

À **FAPESP** pelo auxílio financeiro.

A meus sogros **Heloísa e Cláudio**, pelo apoio, carinho e, em especial pelo suporte nos cuidados com a Angelina.

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 e ventilação mecânica convencional protetora, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) cursa com alta morbi-mortalidade apesar dos avanços no entendimento de sua fisiopatologia e tratamento. A terapia ventilatória baseia-se na proteção pulmonar, sendo a ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) uma opção de método protetor. A posição prona (PP) é terapia adjuvante que possibilita homogeneização da distribuição do volume corrente (VC) e promove recrutamento alveolar. O objetivo do estudo foi investigar o efeito da posição prona associada à VOAF e ventilação mecânica convencional (VMC) protetora sobre a oxigenação, inflamação, dano oxidativo e histologia pulmonares, comparando-a à posição supina em ambos os modos ventilatórios. Foram instrumentados 75 coelhos com traqueostomia e acessos vasculares. A lesão pulmonar aguda (LPA) foi induzida por lavagem traqueal de salina aquecida (30mL/Kg, 38°C). Os animais foram então aleatorizados em cinco grupos (n=15): 1) GC (Controle): animais sadios em VMC protetora basal; 2) GVMS: animais com LPA em VMC protetora e posição supina; 3) GVMP: animais com LPA em VMC protetora e posição prona; 4) GVAFS: animais com LPA em VOAF e posição supina; 5) GVAFP: animais com LPA em VOAF e posição prona. Após, foram submetidos a quatro horas de VMC protetora (modo pressão regulada-volume controlado, PEEP 10 cmH_2O, VC 6mL/kg, Ti 0,5s, FR 40 rpm e FiO_2 1) ou VOAF (MAP 15 mmHg, FR 10Hz, amplitude 22 e FiO_2 1). O nível de significância foi de 5%. Após a indução, os grupos apresentaram comportamentos semelhantes, com diminuição da relação PaO_2/FiO_2 e da complacência pulmonar, e aumento do índice de oxigenação (IO) e da pressão média de via aérea ($p > 0,05$). Ao final do experimento, houve aumento da PaO_2/FiO_2 nos grupos VOAF comparado aos grupos em VMC ($p < 0,05$). Houve queda do IO para os grupos em VOAF comparados ao GVMS ($p < 0,05$), porém o GVMP não diferiu deles ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística quanto à contagem de células polimorfonucleares no lavado broncoalveolar (BAL) nos grupos com LPA. Não houve diferença estatística entre os grupos com lesão para a medida de TNF-alfa no plasma e para sua expressão gênica em tecido pulmonar. Entretanto, a medida de TNF-alfa no lavado broncoalveolar (BAL) e no tecido pulmonar no grupo GVMP foi menor, assemelhando-se ao controle ($p > 0,05$). Não houve diferença no dano oxidativo avaliado no tecido pulmonar entre os grupos ($p > 0,05$) e, também, na comparação entre regiões ventral e dorsal dos pulmões. O escore de lesão histológica foi menor nos grupos em VOAF, efeito potencializado no grupo em prona quando comparado aos grupos em VMC (GC = GVAFP < GVMS = GVMP), sem diferença na regionalização pulmonar. Concluimos que, em modelo de LPA por lavagem alveolar com salina aquecida em coelhos: a VOAF melhora a oxigenação quando comparados à VMC; na VMC, a PP atenua a lesão inflamatória avaliada pela medida de TNF-alfa no BAL e tecido pulmonar; os modos ventilatórios e as posições não modificam o grau de estresse oxidativo quando avaliados pelo método de malondialdeído; a VOAF melhora o escore histopatológico de lesão pulmonar, independemente da posição, mas a associação de VOAF e PP atenua a lesão histopatológica quando comparada com a VMC protetora, seja em posição prona ou supina.

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

Fomento: FAPESP (2010/06242-8).

Abstract

PIRES RF. **Comparison between prone and supine positions, associated to high frequency oscillatory ventilation and protective conventional mechanic ventilation, in an experimental acute lung injury model.** Thesis (Doctorate Degree) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) presents with high morbidity and mortality despite advances in the understanding of its pathophysiology and treatment. Ventilatory therapy is based on the intention of injuring less, with high frequency oscillatory ventilation (HFOV) being a protective method option. Prone position (PP) is an adjuvant therapy that enables homogenization of volume tidal (V_T) distribution and promotes alveolar recruitment. The aim of this study was to investigate the effects of prone position associated with HFOV and protective conventional mechanical ventilation (CMV) on oxygenation and lung inflammation, oxidative damage and histology, comparing it with the supine position in both ventilatory modes. Seventy five rabbits were submitted to tracheostomy and vascular accesses. ALI was induced by tracheal infusion of heated saline (30mL/kg, 38° C). The subjects were then ramdomized in five groups (n=15): 1) CG (Control): healthy animals in basal protective CMV; 2) MVSG: animals with ALI in protective CMV and supine position; 3) MVPG animals with ALI in protective CMV and prone position; 4) HFSG: animals with ALI in HFOV and supine position; 5) HFPG: animals with ALI in HFOV and prone position. After that, they were submitted to four hours of protective VMC (PRV mode, PEEP 10 cmH_2O, VC 6ml/kg, Ti 0,5s, FR=40 rpm and FiO_2 1) or HFOV (MAP 15 mmHg, FR 10 Hz, amplitude 22 and FiO_2 1). The level of significance was 5%. After induction, the groups presented similar behaviors, with a decrease in the PaO_2/FiO_2 ratio and lung compliance, and an increase in oxygenation index (OI) and mean airway pressure ($p > 0.05$). At the end of experimental time, PaO_2/FiO_2 increased in the HFOV groups compared to the CMV groups ($p < 0.05$). There was a decrease in OI for HFOV groups compared to MVSG ($p < 0.05$), but MVPG did not differ from them ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference in polymorphonuclear cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) in the groups with ALI. There was no difference between ALI groups regarding the TNF-alfa dosage in plasma and its gene expression in lung tissue. However, TNF-alpha measurement in BAL and in lung tissue was smaller, resembling control ($p > 0.05$). There was no difference in the oxidative damage assessed in the lung tissue between the groups ($p > 0.05$), nor between the lung regions. The histological damage score was lower in the HFOV groups, potentiated effect in the prone group when compared to the CMV groups (CG = HFPG < MVSG = MVPG), no difference in pulmonary regionalization. We conclude that, in the model of ALI induced by alveolar lavage with heated saline in rabbits: HFOV improves oxygenation if compared to CMV; PP in CMV attenuates lung inflammation, evaluated by TNF-alfa dosage in BAL and in lung tissue; ventilatory modes and positions don't modify the oxidative stress whan evaluated by malondialdehyde method; HFOV improves histopathological lung lesion score, regardless of position, but HFOV and prone position association attenuates histopathological injury compared to protective CMV, either in the prone or supine positions.

Key words: Acute lung injury; Prone position; ARDS; High frequency oscillatory ventilation; Protective ventilation.
Support: FAPESP (2010/06242-8).

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
SUMÁRIO
1. INTRODUÇÃO 09
2. OBJETIVO 22
3. MATERIAL E MÉTODO 24
3.1. Obtenção e preparo dos animais 25
3.2. Instalação do modelo de lesão pulmonar aguda 26
3.3. Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica 27
3.4. Manipulação dos pulmões, obtenção do lavado bronco alveolar e histologia pulmonar 29
3.5. Determinação da lesão oxidativa do tecido pulmonar 30
3.6. Contagem de células polimorfonucleares no fluido de lavagem pulmonar 30
3.7. Medida da concentração de TNF-alfa no plasma, em lavado broncoalveolar e tecido pulmonar 30
3.8. Detecção da expressão de TNF-alfa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real-time) 31
3.9. Variáveis analisadas 32
3.10. *Análise estatística* 33
4. RESULTADOS 34
4.1. Hemodinâmica, mecânica pulmonar e trocas gasosas 35
4.2. Processo inflamatório alveolar 41
4.3. Dano oxidativo pulmonar (Malondialdeído) 45
4.4. *Histologia 46*
5. DISCUSSÃO 48
5.1. Escolha da espécie animal 49
5.2. Manipulação dos animais 49
5.3. Modelo de lesão pulmonar aguda 50
5.4. Trocas gasosas 51
5.5. Avaliação da lesão inflamatória 53
5.6. Avaliação do estresse oxidativo 54
5.7. *Avaliação da lesão tecidual pulmonar 55*
6. CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59
APÊNDICES 64
APÊNDICE A – modelo de protocolo utilizado 65
APÊNDICE B – Tabelas em anexo 68

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é um tipo de lesão pulmonar inflamatória difusa aguda que leva ao aumento da permeabilidade vascular, aumento do peso e perda da aeração do tecido pulmonar[1]. Suas características clínicas e laboratoriais são hipoxemia, opacidade radiográfica bilateral, associada ao aumento da mistura venosa, aumento do espaço morto e diminuição da complacência pulmonar. A característica morfológica da fase aguda é o dano alveolar difuso que se caracteriza por congestão capilar, atelectasias, hemorragia e edema intra-alveolares, seguidos pela formação de membrana hialina, hiperplasia epitelial e edema intersticial[1,2].

A resposta inicial à agressão, denominada fase exsudativa, é caracterizada por dano mediado por células imune inatas, com lesão do endotélio alveolar e barreiras epiteliais, e acúmulo de edema rico em proteína no interstício e alvéolos[3,4]. Macrófagos alveolares locais secretam citocinas anti-inflamatórias (fator de necrose tumoral, IL-6 e IL-17), levando ao recrutamento de neutrófilos e monócitos ou macrófagos, além da ativação de células epiteliais e células T efetoras, que promovem e mantém a inflamação e a lesão tecidual[4]. A ativação endotelial e a injúria microvascular também contribuem para a ruptura da barreira, e são pioradas pelo estiramento mecânico das unidades alveolares.[4] O processo de reparação durante a segunda fase da SDRA (fase proliferativa) é essencial para a sobrevivência do doente. Conforme a integridade epitelial é reestabelecida, a reabsorção do edema alveolar e a matriz provisória restauram a arquitetura e a função alveolar[5]. A fase final da SDRA, ou fase fibrótica, não ocorre em todos os pacientes, mas está relacionada à ventilação mecânica prolongada e aumento da mortalidade[3,6].

Em 2012 foi realizada uma conferência de consenso que estabeleceu a "Definição de Berlin" para SDRA[2], sendo a síndrome classificada em leve, moderada e grave. Os critérios diagnósticos estabelecidos foram: 1) tempo de início dos sintomas dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido ou novo, ou piora dos sintomas respiratórios; 2) imagem pulmonar com presença de opacidade bilateral consistente e com edema pulmonar na radiografia e/ou tomografia torácicas; 3) origem do edema não deve ser totalmente explicado por falência cardíaca ou excesso de

líquidos; 4) avaliação da oxigenação com relação $PaO_2/FiO_2 \leq 300$, sendo leve: $200 < PaO_2/FiO_2 \leq 300$mmHg com PEEP ou CPAP ≥ $5cmH_2O$; moderada: $100< PaO_2/FiO_2 \leq 200$mmHg com PEEP ≥ $5cmH_2O$; e grave: $PaO_2/FiO_2 \leq 100$mmHg com PEEP ≥ $5cmH_2O$[2].

Em 2015, foi publicada a definição para SDRA pediátrica, com as suas particularidades[7]. A criança com SDRA deve preencher os seguintes critérios: 1) exclusão de pacientes com doença pulmonar relacionada a doenças perinatais, 2) início dos sintomas dentro de sete dias após insulto clínico conhecido; 3) imagem pulmonar com presença de infiltrado novo e compatível com doença parenquimatosa aguda; 4) edema não totalmente explicado por falência cardíaca ou excesso de líquidos; 5) oxigenação: para o paciente em ventilação não-invasiva em BiPAP ou CPAP ≥ $5cmH_2O$, considerar SDRA sem estratificação da gravidade, se relação $PaO_2/ FiO_2 \leq 300$ ou relação entre saturação de O_2 e $FiO_2 \leq 264$mmHg, na ausência da primeira; se paciente em ventilação invasiva, considerar SDRA leve se $4 \leq IO < 8$ ou $5 \leq ISO < 7,5$, SDRA moderada se $8 \leq IO < 16$ ou $7,5 \leq ISO < 12,3$ e SDRA grave se $IO \geq 16$ ou $ISO \geq 12,3$, sendo IO = índice de oxigenação (FiO_2 x Pressão média de via aérea x $100/PaO_2$) e ISO = índice de saturação de O_2 (FiO_2 x Pressão média de via aérea x 100/Saturação de O_2), este último utilizado na ausência do IO[7].

Os cuidados do paciente com SDRA vêm sendo melhorados, com diminuição da mortalidade[3]. Entretanto, a SDRA continua sendo uma síndrome relativamente comum e letal ou incapacitante. Em estudo prospectivo de coorte recente[8], envolvendo 29.144 pacientes de terapia intensiva de 50 países, 10,4% (3.022) preencheram os critérios para SDRA utilizando a definição de Berlim, sendo 30% SDRA leve (28,2-31,9%, IC 95%), 46,6% SDRA moderada (44,5-48,6%, IC 95%) e 23,4% SDRA grave (21,7-25,2%, IC 95%). A mortalidade neste estudo foi de 40%, sendo que aumentou conforme o estágio da SDRA, atingindo 46,1% nos casos graves[8]. Também, os pacientes que sobrevivem à síndrome estão sob alto risco de desenvolverem declínio cognitivo, depressão, transtorno de estresse pós-traumático e fraqueza músculo esquelética persistente[9,10].

A prioridade no tratamento do paciente com SDRA é a identificação e tratamento da causa (ou causas) de base. A terapia de suporte deve limitar maiores danos ao pulmão por meio de uma combinação de ventilação pulmonar protetora e

terapia conservadora de fluidos para prevenir a formação e promover a reabsorção do edema pulmonar[3].

A ventilação mecânica (VM) constitui um dos pilares do tratamento da síndrome, sendo capaz de modificar a evolução da doença. Dentre os métodos ventilatórios de proteção pulmonar utilizados na SDRA vale destacar a VM convencional (VMC) protetora e a 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 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 $PaCO_2$, a PaO_2 e o pH, sendo a pressão inspiratória (PIP) liberada para valores tão elevados quanto 40-45 cmH_2O. 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[11]. Paralelamente, diversas publicações[12-14] 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. Devido ao volume reduzido de áreas de pulmão aerado nos pacientes com SDRA, mesmo utilizando volumes correntes considerados seguros para pulmões sadios, pode haver superdistensão alveolar (volutrauma e barotrauma), lesando e ativando ainda mais o epitélio e amplificando a inflamação. Ciclos sucessivos de abertura e fechamento de alvéolos (atelectrauma) aumentam a tensão alveolar e a inflamação local, com consequente desnaturação do surfactante[3,14-16]. Finalmente, as lesões endotelial e epitelial resultam em translocação de mediadores pró inflamatórios e produtos bacterianos, levando à piora da inflamação sistêmica, mimetizando a síndrome em áreas pulmonares sadias e aumentando o risco de evolução para síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (biotrauma)[17-22]. Assim, a ideia atual é a de que o emprego de altos volumes correntes gera altas pressões inspiratória e de platô, o que determina lesão estrutural em áreas de pulmão até então sadias, agravando a hipoxemia e piorando a evolução dos pacientes com SDRA[23].

Assim é que em 2000, o grupo *The Acute Respiratory Distress Syndrome Network* comparou o uso da ventilação mecânica tradicional com a ventilação com VC baixo (6 mL/kg) e pressão de platô limitada em 30 cmH_2O[23]. 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 (6 mL/Kg), pressão inspiratória de platô limitada em 30 cmH_2O e pressão expiratória final positiva (PEEP) otimizada, em modos limitados a pressão[18], utilizando as estratégias de hipoxemia e hipercapnia permissivas[23]. A estratégia de hipoxemia permissiva não leva diretamente a um objetivo de saturação, mas sim a um equilíbrio cuidadoso entre o alvo de saturação e a toxicidade da ventilação necessária para se atingir saturação mais elevada. Assim, atualmente, a melhor estratégia de tratamento do paciente com SDRA é manter uma oxigenação arterial “adequada” enquanto se evita LPIVM. Em geral, a estratégia de hipoxemia permissiva tem como alvo uma saturação arterial de oxigênio entre 88% e 92%[7].

Embora a VMC protetora seja efetiva para a maioria dos pacientes, há um número significante deles que apresenta insuficiência respiratória grave e nos quais ela pode não garantir a oxigenação e a ventilação adequadas. Além disso, a PEEP elevada pode causar superdistensão alveolar devido aos altos picos de pressão gerados[24]. Acrescenta-se que o emprego de VC baixo pode diminuir o volume pulmonar, levando a colapso alveolar, com agravamento da hipoxemia[25,26]. Para estes pacientes com SDRA grave em que não se consegue atingir o objetivo da saturação permissiva numa estratégia ventilatória protetora para LPIVM, a VOAF passa a ser uma alternativa atraente[27].

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 (acima de 15 por segundo), evitando as elevadas pressões e os volumes alveolares típicos da VMC[18,28]. Teoricamente, seria a técnica ventilatória ideal para minimizar LPIVM[17]. É método ventilatório único, pois a inspiração e a expiração são ativas. Nele a oxigenação é ajustada pela da pressão média de via aérea (*Mean Airway pressure* - MAP), a qual controla a insuflação pulmonar de modo semelhante à PEEP[29].

Inicialmente, a VOAF foi utilizada como estratégia de resgate quando outros modos de ventilação falhavam[30,31]. Em 1997, Fort et al.[30] descreveram o uso da VOAF em 17 adultos com SDRA e observaram melhora da relação PaO_2/FiO_2 e do IO em 13 pacientes, com 53% de mortalidade. Subsequentemente, vários outros autores publicaram sua experiência com este modo ventilatório. Em 2002, o estudo 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 PaO_2/FiO_2 quando comparada com a ventilação convencional[32]. Os autores concluíram que a VOAF é segura e efetiva para tratamento da SDRA. Mehta et al.[33] 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 2010 foi publicada metanálise incluindo estudos randomizados controlados com adultos e crianças (exceto recém-nascidos) com SDRA, comparando VMC e VOAF. Baseando-se nos estudos em que a VOAF foi utilizada até a resolução da SDRA (n=365), houve redução significativa da mortalidade na alta hospitalar e em 30 dias. Este estudo também mostrou melhora da oxigenação, sem aumento dos possíveis efeitos colaterais da VOAF (barotrauma, hipotensão e extubação acidental)[34]. Porém, em 2013, foi publicado o “OSCAR trial”, estudo controlado, randomizado, multicêntrico, que incluiu 795 pacientes com SDRA moderada ou grave, comparando VOAF com VMC, que mostrou que a VOAF melhora a oxigenação, mas sem reduzir a mortalidade[35]. Entretanto, os pacientes foram ventilados com o ventilador Novalung R100, um aparelho que ainda não havia sido usado antes em estudos clínicos e que utiliza diafragma pneumático, com relação tempo inspiratório/tempo expiratório fixa de 1:1, enquanto o ventilador clássico, Sensor Medics 3100B, é um dispositivo com diafragma eletromecânico com tempo inspiratório de 33%. Essa diferença de aparelhos poderia ter determinado estes resultados desfavoráveis, além de que a equipe de pesquisadores não tinha experiência com este método ventilatório. Outro grande estudo em 2013, “OSCILLATE” [36], foi interrompido após a inclusão de 548 pacientes devido aumento na mortalidade intra-hospitalar no grupo VOAF (47%, contra 35% no grupo controle, p=0,005). Ocorre que o grupo de pacientes ventilados em VOAF necessitou de mais suporte de aminas vasoativas e de inotrópicos em relação ao grupo controle, dificultando a análise dos

resultado[36]. Apesar das limitações científicas, esses resultados em adultos desencorajaram seu uso rotineiro[3,18].

Em pediatria, a VOAF foi inicialmente utilizada com sucesso em neonatos[27,37,38] e, apesar do aumento da utilização deste modo ventilatório em crianças com SDRA, existem poucas publicações e com número insuficiente de pacientes incluídos para permitir conclusões sobre influência na mortalidade. Ben Jaballah et al.[39] 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 na VMC. Em 2014, estudo retrospectivo, observacional, multicêntrico, com 9177 crianças de 1 mês a 18 anos, comparando o uso de VOAF (precoce e tardio) com VMC observou aumento do tempo de VM, do tempo de UTI e da mortalidade no grupo sob VOAF[40]. Porém, o grupo em VMC, inicialmente, não era comparável ao grupo VOAF, pois os pacientes desse grupo eram mais jovens e apresentavam escores de gravidade mais baixos na admissão. Para que os grupos fossem comparados utilizou-se a correspondência de similaridade que foi realizada obtendo correspondência um para um de uso precoce de VOAF *vs.* VMC, tornando os grupos comparáveis. É concebível que, apesar da correspondência cuidadosa e da similaridade destes dois escores de gravidade amplamente aceitos na admissão (PIM-2 e PRISM-3), os pacientes do grupo VOAF fossem mais graves que os do grupo em VMC[40]. Com essas considerações, o Consenso Pediátrico para SDRA[7] sugere que a VOAF seja considerada como alternativa ventilatória em crianças com insuficiência respiratória hipoxêmica refratária à VMC nas quais a pressão de platô ultrapassa 28 cmH_2O.

Nosso grupo publicou, em 2011, estudo clínico randomizado *crossover* com crianças de 1 mês a 14 anos de idade, com insuficiência respiratória hipoxêmica aguda, submetidas a VM convencional protetora ou VOAF, associadas ao uso de óxido nítrico inalatório (NOi)[41]. Ambas as técnicas aumentaram a oxigenação, mas a VOAF com NOi permitiu redução da FiO_2 e aumentou a relação PaO_2/FiO_2 mais rapidamente, quando comparada à VM convencional. Este estudo, porém, foi um estudo não-cego e com número limitado de pacientes incluídos.

Estudos em animais sugeriram que a VOAF reduz a LPIVM[42-45]. Imai et al.[42] 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 a lesão histológica de pequenas vias aéreas e alvéolos de forma mais efetiva que as outras estratégias ventilatórias. Rotta et al.[43], por sua vez, também estudaram coelhos submetidos à lavagem pulmonar com salina, comparando VOAF e VMC com PEEP alta (10 cmH_2O) e baixa (2 cmH_2O), ventilação com PEEP 2 cmH_2O 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. Resultado semelhante foi obtido por Viana et al.[44] estudando coelhos com lesão pulmonar induzida pela infusão venosa de lipopolissacarídeo de *E. coli* e por lavagem pulmonar com salina. Meyer et al. [45], 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.

Estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou, 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[46] e, também, em publicação posterior, demonstrou que este modo ventilatório atenuou o dano ao DNA pulmonar[47].

Além do suporte ventilatório, algumas terapias adjuvantes vêm sendo utilizadas para melhorar o prognóstico da SDRA. Entre elas destaca-se a posição prona (PP).

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[11]. 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[48]. Desta forma, a colocação do paciente em PP passou a integrar o arsenal de terapias adjuvantes na SDRA.

A posição prona, primeiramente descrita por Bryan[49], 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. Há melhora da relação V/Q nas regiões dorsais, onde o colapso pulmonar e a relação V/Q desigual predominam na posição supina[50,51]; 2) homogeneização da distribuição do VC associada com alterações na mecânica da parede torácica[48,50]; 3) recrutamento alveolar[50-52]; 4) redirecionamento de forças compressivas exercidas pelo peso do coração sobre os pulmões[53]; e 5) melhor remoção de secreções[50,54].

Estudos em cães[55] mostraram que a PP 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 prona. Também, a manutenção do efeito destas manobras pode ser consequido com o uso de PEEP mais baixas que na posição supina[44]. Foi demonstrado que a PP diminui a gravidade e homogeneíza a LPIVM comparada à posição supina[55]. Estes resultados foram posteriormente confirmados por Valenza et al. [56], que demostraram em ratos com pulmão normal que a posição prona retarda a evolução da LPIVM, além de permitir ventilação mais homogênea. De fato, o VC tensiona preferencialmente as regiões pulmonares não dependentes na posição supina, enquanto que na PP o deslocamento do diafragma para baixo é mais relevante.

Em 2004, Guérin et al.[57], realizaram estudo multicêntrico, controlado e randomizado com 791 adultos com insuficiência respiratória hipoxêmica aguda (PaO_2/FiO_2<300) em VM. Não houve diferença na mortalidade em 28 dias ou quanto ao sucesso de extubação entre os grupos prona e supina. No entanto, a oxigenação foi melhor no grupo prona e a incidência de pneumonia associada a VM (PAV) foi

significantemente menor neste grupo. No ano seguinte, Mentzelopoulos et al.[58] avaliaram 10 adultos com SDRA grave (PaO_2/FiO_2 < 100) sob FiO_2 de 0,79 ± 0,07, PEEP de 9,4 ± 1,3 cmH_2O e VC de 9,0 ± 0,9 mL/Kg ajustados para manter a pressão de platô pulmonar abaixo de 30 cmH_2O. Os pacientes foram estudados em posição supina a 60º, depois foram colocados em prona e, por fim, novamente em decúbito a 60º. Os autores observaram redução de indicadores de estresse pulmonar parenquimatoso total e de tensão pulmonar na PP. Este foi o primeiro estudo realizado em humanos que trouxe a possibilidade de redução de LPIVM quando a PP foi adotada. Romero et al. [59], em 2009, estudaram 15 adultos com SDRA grave (PaO_2/FiO_2 < 100) submetidos a PP 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 do sistema respiratório. Em revisão publicada em 2006, Guérin[60] concluiu que a PP melhorou a oxigenação sem induzir e até mesmo prevenir a superdistensão pulmonar e a hiperinsuflação.

Os efeitos da PP foram objeto de três metanálises entre 2008 e 2009 que a compararam com a posição supina. Duas delas ocuparam-se apenas de trabalhos controlados e randomizados em adultos com insuficiência respiratória hipoxêmica (4 estudos com 1.271 pacientes)[61] ou com SDRA (5 estudos com 1.316 pacientes)[62]. A terceira avaliou adultos e crianças com insuficiência respiratória aguda (lesão pulmonar aguda ou SDRA) em estudos controlados e randomizados (13 estudos com 1.559 pacientes)[63]. As três metanálises concluíram que, apesar de melhorar a oxigenação e diminuir o risco de pneumonia associada a VM, a PP não diminuiu a mortalidade, com efeito benéfico nos pacientes mais graves[61-63]. Porém, em 2010, Sud at al.[64] conduziram nova metanálise que avaliou estudos clínicos com adultos e crianças fora do período neonatal e concluíram que a PP reduziu significantemente a mortalidade em pacientes com insuficiência respiratória hipoxêmica grave (PaO_2/FiO_2 < 100).

Em 2013 foi publicado o estudo PROSEVA, conduzido por Guérin[65]. Este foi um estudo multicêntrico, controlado, prospectivo e randomizado com 466 pacientes com SDRA grave. Os pacientes foram distribuídos em um grupo que utilizou apenas a posição supina e outro submetido a sessões de PP por pelo menos 16 horas. A mortalidade em 28 dias foi de 16% no grupo prona e 32,8% no grupo supino (p<0,001),

sendo que a razão de risco de morte foi 0,39 (0,25 a 0,63, IC 95%). A mortalidade em 90 dias não ajustada foi de 23,6% no grupo prona e 41% no grupo supino (p<0,001), com razão de risco de óbito de 0,44 (0,29 a 0,67, IC 95%)[65]. Após este estudo, nova metanálise[66] foi realizada, incluindo o PROSEVA. Esta última metanálise concluiu, com alta qualidade de evidência, que a PP reduz significantemente a mortalidade em pacientes com SDRA moderada a grave, desde que utilizada por períodos maiores que 16 horas por dia.

Considerando-se exclusivamente crianças com SDRA, a PP vem sendo avaliada em estudos clínicos de formas variadas. Relvas et al.[67] 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 6-10 horas e melhora ainda mais acentuada da oxigenação em 18-24 horas, sem mudança significativa na pressão média de vias aéreas. Concluíram que a PP 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.[68] utilizaram a PP 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 PP 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 PP, 33% não responderam na primeira vez. Os autores concluíram que a PP é um procedimento simples, praticamente sem complicações, bem tolerado e que melhora a oxigenação na maioria das crianças com SDRA. Curley at al.[69] publicaram estudo controlado e randomizado com 102 crianças, de duas semanas a 18 anos de idade, com o diagnóstico de lesão pulmonar aguda. O estudo demonstrou melhora da oxigenação na maioria dos pacientes randomizados para prona (20 horas/dia), caracterizando 90% deles como respondedores por melhora da oxigenação. Não houve, porém, diferença significante entre os grupos quanto aos dias livres de VM, mortalidade, tempo de recuperação da lesão pulmonar e dias livres de falência orgânica. Em 2008, revisão sistemática da Biblioteca *Cochrane*[70] demonstrou que a PP melhora saturação de oxigênio, PaO_2, IO, sincronia tóraco-abdominal e ocasiona menos episódios de queda da saturação em crianças com SDRA.

Assim, a PP faz parte da estratégia terapêutica de proteção pulmonar, sendo fisiologicamente apropriada para ser utilizada em pacientes com SDRA grave[2].

Considerando-se os efeitos benéficos da VOAF e da PP, é possível que a associação delas determine melhora mais acentuada da oxigenação além de reduzir a intensidade da lesão pulmonar induzida pela VM em casos de SDRA grave.

Poucos foram os estudos que avaliaram a associação de VOAF com a PP. Estudo clínico prospectivo e randomizado[71] em 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 pela relação PaO_2/FiO_2 e IO, e a inflamação pulmonar pela dosagem das citocinas séricas, no lavado broncoalveolar (BAL) e pela citologia do BAL. Concluíram que a PP 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 PP em VMC reduziu os níveis séricos de IL-8 e o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (BAL) quando comparada com a posição supina associada a VOAF, indicando diminuição da inflamação pulmonar. Demory et al.[72], em outro estudo prospectivo e randomizado, estudaram 43 pacientes com SDRA ($PaO_2/FiO_2 < 150$ em PEEP > $5cmH_2O$) que foram divididos em 3 grupos: 1) VMC com 12 horas em PP e após 12 horas em posição supina; 2) VMC com 12 horas em PP 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 PP melhorou a oxigenação a partir da primeira hora, o que não aconteceu no grupo ventilado inicialmente em posição supina. A melhora só foi mantida no grupo posteriormente ventilado com VOAF. Não houve nenhum momento de aumento da oxigenação no grupo que permaneceu apenas em posição supina, independentemente do modo ventilatório. Os autores sugeriram que a VOAF é capaz de manter o recrutamento alveolar induzido pela PP e seu uso após a prona permite reduzir a FiO_2 para níveis potencialmente menos tóxicos.

Estudo experimental em porcos[73], nos quais a SDRA foi induzida por lavagem com salina aquecida, demonstrou que a VOAF associada à prona melhora a

oxigenação, além de determinar redução significativa da fração de *shunt* pulmonar e normalizar o débito cardíaco, com menores pressões médias de vias aéreas que a VOAF associada à posição supina. Novo estudo em porcos em 2014[74], também utilizando lavagem pulmonar com solução salina, demonstrou que a associação VOAF e prona melhora a oxigenação e a eliminação de CO_2.

Assim, considerando a capacidade de redistribuição da ventilação para áreas pulmonares melhor perfundidas e o potencial de recrutamento da PP, nossa hipótese é que esta posição promova melhora mais acentuada da oxigenação, determine lesão histopatológica mais homogênea e de menor intensidade e atenue a lesão pulmonar oxidativa e inflamatória quando comparada com posição supina. Também, há a possibilidade de que a melhora induzida pela PP possa ser intensificada quando houver associação com a VOAF, em comparação com a VMC protetora.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da PP associada à VOAF e à VMC protetora sobre oxigenação, inflamação, histologia e dano oxidativo pulmonar, comparando-a com a posição supina, nas mesmas modalidades de ventilação, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida em coelhos.

Os desfechos utilizados foram índices fisiopatológicos de lesão pulmonar aguda: oxigenação; inflamação avaliada no plasma, em lavado broncoalveolar e em tecido pulmonar por região (ventral e dorsal); dano oxidativo tecidual pulmonar e análise histológica de acordo com a região dos pulmões.

MATERIAIS E MÉTODO

3. MATERIAIS 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 nº796. Foram utilizados coelhos jovens brancos fornecidos pelo Biotério da UNESP – Campus de Botucatu, com peso corporal variando de 2,0 a 3,5 Kg.

Após pesagem, os animais foram anestesiados e sedados com solução de cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg) administrada por via intramuscular. Posteriormente, os animais foram colocados em goteira cirúrgica, receberam oxigênio a 100% por meio de cateter nasal e, então, foram submetidos a tricotomia cervical e torácica para colocação de eletrodos de monitoração da frequência cardíaca (FC). Se a FC diminuísse para valores abaixo de 180 bpm, administrava-se 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, dissecção da artéria carótida e veia jugular interna. Após a traqueostomia, foi realizada a introdução do tubo traqueal de maior calibre possível (diâmetro interno de 3,0 a 3,5 mm, *Portex, Hythe, UK*), que foi mantido em posição por meio de fita cirúrgica. É importante ressaltar nenhum animal foi submetido a sofrimento em nenhum momento. Imediatamente foi iniciada a ventilação mecânica com o aparelho *Inter 7* (*Care Fusion, São Paulo*). Utilizou-se, inicialmente, os seguintes parâmetros ventilatórios: modo pressão-regulada volume controlado (AC/PRV), com VC alvo de 6mL/Kg; frequência respiratória (FR) de 40 ciclos por minuto, ajustada de acordo com a $PaCO_2$; tempo inspiratório (Ti) de 0,5 segundo; Pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cmH_2O; e fração inspirada de O_2 (FiO_2) de 1,0. Estes parâmetros foram utilizados após a traqueostomia, no período de estabilização de 10 minutos após os procedimentos, durante a indução da lesão

o e depois dela, no período de estabilização por mais 10 minutos, e em todo experimento no grupo controle.

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^{TM} - B-Braun, Melsungen, Germany*) e na veia um cateter de duplo lúmen (*5^{Fr} - Arrow International Inc., Reading, Philadephia-USA*) que foi 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 cetamina a 10 mg/Kg/h, 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 a infusão intravenosa contínua de noradrenalina em dose inicial de 0,5 µg/Kg/min, titulada 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 40ºC 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[46,75]. Resumidamente, através da cânula traqueal, foram realizadas lavagens sucessivas do pulmão com soro fisiológico aquecido a 37-38ºC em alíquotas de 30 mL/Kg, a uma pressão máxima de 30 cmH_2O. Cada

procedimento de lavagem durava aproximadamente 60 segundos, sendo 20 segundos reservados para infusão e o tempo restante para retirada, a qual foi feita por gravidade, movimentos externos de compressão torácica e gentil sucção. Completada a retirada, o procedimento foi repetido seis vezes a cada 3-5 minutos. Após 10 minutos de estabilização, foi colhida uma gasometria. Se a relação PaO_2/FiO_2 atingissem valores menores do que 100 mmHg a lesão foi considerada induzida. Em caso contrário, foram realizadas mais duas lavagens na sequência e, depois de 10 minutos, nova gasometria foi obtida, e assim sucessivamente, até que se obtivesse uma relação PaO_2/FiO_2 abaixo de 100. Atingindo o critério, os animais foram divididos para compor os grupos experimentais conforme aleatorização.

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[76].

3.3. *Formação dos grupos experimentais e ventilação mecânica*

De acordo com o comportamento das variáveis analisadas em outros estudos que utilizaram metodologia semelhante, foram estudados 15 coelhos por grupo[42-46]. A aleatorização foi realizada por meio software apropriado para randomização.

Os animais foram aleatorizados para compor cinco grupos experimentais com 15 animais em cada um deles:

- Animais sadios submetidos à VMC protetora (controle – GC; n=15);
- Animais com LPA submetidos à VMC protetora em posição supina (GVMS; n=15);
- Animais com LPA submetidos à VMC protetora em posição prona (GVMP; n=15);
- Animais com LPA submetidos à VOAF em posição supina (GVAFS; n=15);
- Animais com LPA submetidos à VOAF em posição prona (GVAFP; n=15).

Além destes grupos, cinco animais sadios não instrumentados e não ventilados foram utilizados para a avaliação do *PCR real time* e do estresse oxidativo no tecido pulmonar.

Os animais do GC 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 cmH_2O; FiO_2 de 1,0. Nos animais com lesão, randomizados para receber VMC (GVMS e GVMP), a PEEP foi aumentada para 10 cmH_20, permanecendo assim até o final do experimento. Para os animais dos grupos randomizados para VOAF (GVAFS e GVAFP), a mesma foi fornecida pelo oscilador SensorMedics 3100A (*Viasys Healthcare, Yorba Linda, USA*) com pressão média de via aérea de 15 cmH_2O, Ti de 33%, FR de 10Hz e amplitude 22, sendo a FR e amplitude ajustadas para manter $PaCO_2$ em níveis fisiológicos. A FiO_2 foi mantida em 1,0 para os animais de todos os grupos.

Após 10 minutos do início da ventilação específica de cada grupo (VMC ou VOAF), nova gasometria foi obtida, sendo este momento denominado tempo zero (T0). Neste momento o animal foi colocado em prona ou mantido em supino de acordo com a randomização. A partir deste momento os animais foram ventilados por quatro horas, sendo obtidas gasometrias arteriais nos seguintes momentos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos (figura 1).

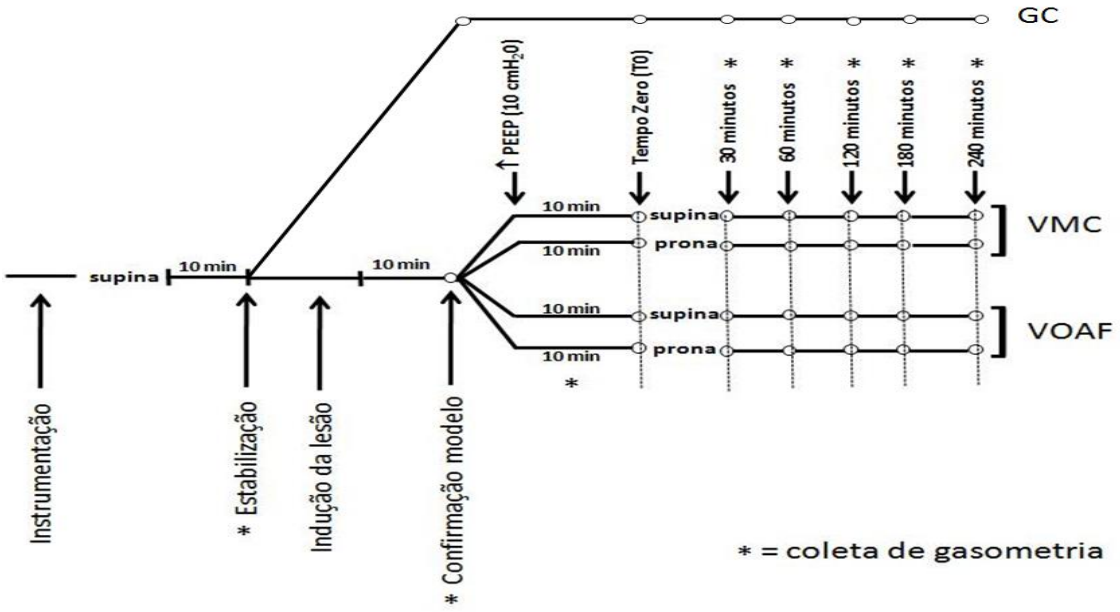


Figura 1 – Ilustração representativa do protocolo de estudo
VMC: ventilação mecânica convencional; VOAF: ventilação oscilatória de alta frequência, GC: Grupo controle.

3.4. *Manipulação dos pulmões, obtenção do lavado broncoalveolar e histologia pulmonar*

Antes do término do experimento, os animais receberam 1 mL de heparina e foram submetidos a eutanásia por administração intravenosa rápida de cetamina. Após a eutanásia, 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 BAL. Nos animais nos quais foi realizado o lavado broncoalveolar (n=7 para cada grupo), 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 BAL. 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 com formol em seu conteúdo, 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, os 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[46,75]. 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[76,77].

3.5. *Determinação da lesão oxidativa no tecido pulmonar*

O estresse oxidativo foi avaliado pela medida de 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 homogeinato foi centrifugado e o sobrenadante usado no ensaio.

3.6. *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 foi medido e centrifugado. As células obtidas por centrifugação foram 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.

3.7. *Medida da concentração de TNF-alfa no plasma, lavado broncoalveolar e tecido pulmonar*

As dosagens de TNF-alfa no plasma, BAL e tecido pulmonar foram realizadas utilizando o método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), conforme Imai et al.[42] e protocolo fornecido pelo fabricante (PharMingen®). O método de ELISA utiliza 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.

3.8. *Detecção da expressão de TNF-alfa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real-time)*

Extração de RNA total: Fragmentos do lobo médio do pulmão esquerdo das áreas dependentes e não dependentes foram armazenados em microtubos *DNAse e RNAse free* de 1,5 mL contendo *RNA later*™ e submetidos à extração de RNA total. As amostras foram processadas utilizando o sistema SV de extração de RNA total da Promega®. Os fragmentos de tecido pulmonar de 60 mg foram homogeneizados em homogeinizador Tekmar Tissuemizer e 1 mL de tampão de lise para RNA adicionado de BME conforme a recomendação do fabricante. Todo o processo foi feito o mais breve possível em gelo para uma boa recuperação do RNA total. Um volume de 175 µL de lisado de tecido foi transferido para tubos Eppendorfes de 1,5 mL e adicionado 350 µl de *RNA dilution buffer.* Após a fragmentação do tecido e obtenção do sobrenadante, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 70ºC em termociclador. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000-14.000 *g* e a purificação/extração do RNA total das amostras foram realizadas por meio de coluna de fase sólida livre de *RNAse*.

Purificação do RNA por centrifugação: Após centrifugação, um volume de 500 µL dos sobrenadantes dos homogenatos de células foi transferido para outro microtubo de 1,5mL e adicionados 200µL de etanol 95%. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados por 1 minuto a 12.000 – 14.000 *g*. Os sobrenadantes dos tubos foram depositados na cesta contendo a coluna de separação e centrifugados. A coluna foi lavada com mais 600 µL de tampão de lavagem e 63% de etanol (95%). Após este passo, as amostras de RNA extraídas e contidas nas colunas foram tratados com *DNAse I* por 15 minutos a 20ºC-25ºC, seguindo o da enzima. Após tratamento, o RNA total da coluna foi lavado com tampão e diluído com água livre de RNAse e DNAse e estocado a -70ºC até o momento da transcrição reversa.

Para a eliminação do DNA genômico após a extração de RNA total as amostras de RNA total foram novamente tratadas com DNAse (Sigma) conforme protocolo do fabricante. A confirmação da eliminação do DNA genômico foi realizada por PCR em tempo real, utilizando diretamente o RNA extraído e tratado com DNAse na reação de PCR em tempo real. Todas as amostras foram quantificadas no Nano

Drop 2000/2000c (Thermo Scientific) e a pureza verificada através da relação 260/280. Amostras com relação entre 1,9 a 2,00 foram usadas para confecção do cDNA e usadas na reação de PCR. As amostras com relações inferiores e presença de DNA genômico foram desprezadas ou novamente tratadas.

Obtenção do cDNA e PCR em tempo real: O RNA total extraído foi submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA utilizando a enzima Improm (Promega ™*)* e seguindo as instruções e condições de reação do fabricante. O cDNA foi estocado a -70ºC para quantificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

O mRNA para TNF-alfa foi quantificado PCR em tempo real.[78] A reação de PCR em tempo real foi realizada em aparelho 7300 Applied Biosystems e enzima GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). O TNF-alfa foi normatizado com o gene GAPDH. O volume de amostras utilizado foi de 4 mL de cDNA em um volume de 20 ml de reação contendo enzimas, nucleotídeos e *primers* específicos para o TNF-alfa. O número de ciclos utilizados foi de 40 ciclos com ativação inicial de 95ºC por 1 minuto, desnaturação de 95ºC por 15 segundos, anelamento e extensão a 60ºC por 1 minuto. A curva de *melting* foi analisada para eliminar a presença de amplificação inespecífica ou formação de *primer-dimers*.

3.9. Variáveis analisadas

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

a) Variável hemodinâmica: pressão arterial média;
b) Gasometria arterial: PaO_2;
c) Parâmetros ventilatórios e Índices derivados para avaliar trocas gasosas: relação PaO_2/FiO_2, índice de oxigenação (FiO_2 x pressão média vias aéreas x $100/PaO_2$);
d) Mecânica pulmonar: complacência pulmonar, Pressão inspiratória positiva (PIP) e MAP (pressão média em vias aéreas) na VMC (antes e após indução);
e) Dano oxidativo pulmonar: medida de peroxidação lipídica (malondialdeído) no tecido pulmonar;

f) Processo inflamatório alveolar: nível de TNF-alfa no plasma, no fluido do lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar, contagem de polimorfonucleares no fluido broncoalveolar e detecção da expressão gênica de TNF-alfa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time) no tecido pulmonar;
g) Histologia: escore de dano histopatológico (descrito no item 3.4. *Manipulação dos pulmões, obtenção do lavado broncoalveolar e histologia pulmonar).*

3.10. *Análise estatística*

Os dados foram analisados por meio do programa *SigmaStat for Windows* ® versão 11.0.

Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre os diversos grupos experimentais por meio de análise de variância (ANOVA), com subsequentes 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 subsequentes 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. Para a comparação dos momentos inicial e após indução foi utilizado o teste t em caso de distribuição normal, e o método de Mann-Whitney Rank Sum Test, em caso contrário.

A análise dos níveis de TNF-alfa no tecido pulmonar, detecção desta citocina pelo *PCR real time*, dosagem e malondialdeído e do escore de lesão pulmonar, comparando os grupos e as regiões pulmonares ventral e dorsal, foi realizada pela ANOVA Two Way, com comparação entre pares pelo método de Bonferroni t-test.

Foi utilizado nível de significância de 5%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. *Hemodinâmica, mecânica pulmonar e trocas gasosas*

A pressão arterial média (PAM) foi mantida acima de 50 mmHg por meio de suporte vasoativo. Nenhum grupo apresentou diferença estatística entre os momentos do experimento em relação à PAM. Porém, quando se comparou os grupos em cada momento, houve diferença estatística apenas em um momento do experimento (T30), sendo o GVAFP maior do que o GC; p=0,009. Esta diferença não se manteve em outros momentos do experimento e, apesar da diferença, a PAM desses dois grupos foi maior que 50mmHg (59,5 ± 5 mmHg para GC e 76,06 ± 14,5mmHg para GVAFP) (Figura 2).

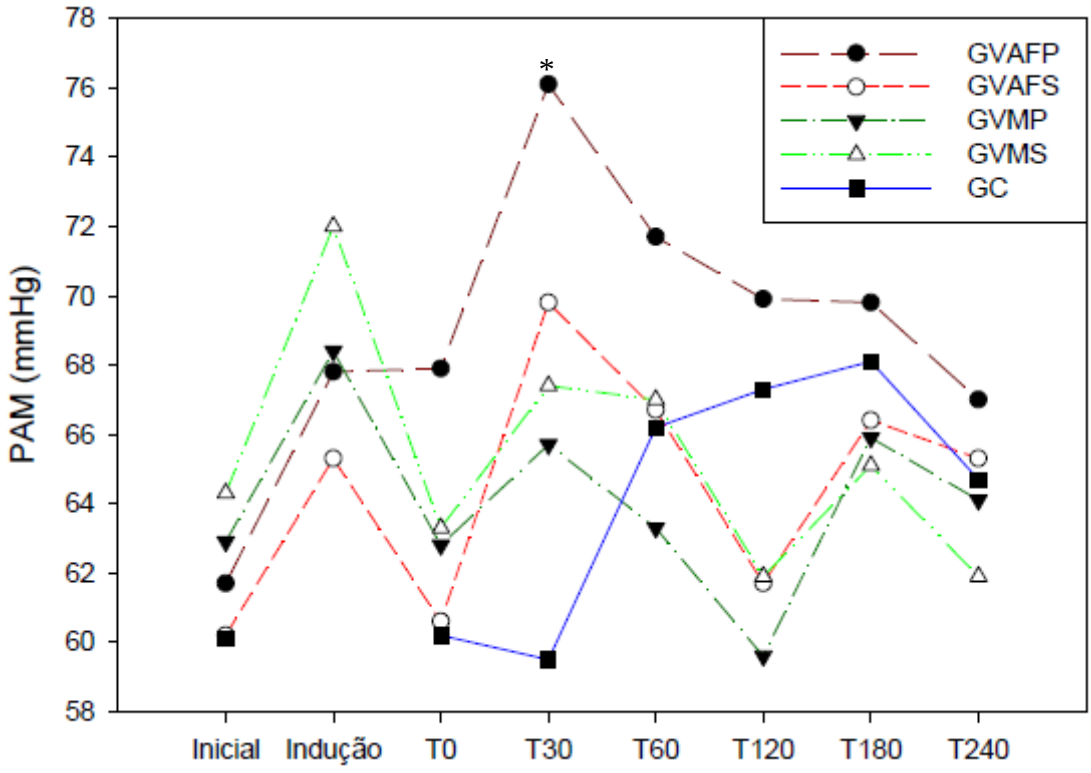


Figura 2 – Pressão arterial média (PAM) ao longo do tempo para os grupos experimentais.

Dados expressos em média.
Testes: ANOVA de Medidas Repetidas/ ANOVA, comparação entre pares pelo teste de Bonferroni.
** p < 0,05 comparando com o GVAFP com o GC no mesmo momento.*
Não houve diferença estatística entre os momentos experimentais de cada grupo (p > 0,05).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: grupos em ventilação convencional e posição supina.

Não houve diferença significante entre os grupos quanto ao número de lavagens pulmonares necessárias para induzir a lesão (p=0,086), sendo, também, semelhante a porcentagem de líquido recuperado dos pulmões dos animais destes grupos (p=0,925). A porcentagem média de recuperação da salina infundida variou de 91% a 92**%.** O peso dos animais dos diferentes grupos não diferiu estatisticamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação do peso, número de lavagens e porcentagem de volume recuperado para os grupos experimentais

Variável	GC	GVAFP	GVAFS	GVMP	GVMS	Nível descritivo
Peso (Kg)	2,56 ± 0,34	2,92 ± 0,36	2,96 ± 0,40	2,81 ± 0,46	2,59 ± 0,21	p = 0,078
N° de lavagens	-	9 ± 3	10 ± 2	11 ± 3	13 ± 5	p = 0,086
% Volume recuperado (ml)	**-**	**93 (90 - 94)**	**92 (90 - 93)**	**92 (91 - 95)**	**92 (90 - 94)**	**p = 0,925**

Valores expressos em média ± DP ou mediana (P25 - P75).
Testes: ANOVA/ ANOVA de Kruskall-Wallis.
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: grupos em ventilação convencional e posição supina.

Os grupos foram estatisticamente semelhantes no início do experimento do ponto de vista da oxigenação (relação PaO_2/FiO_2 e IO), complacência pulmonar, MAP e PIP utilizadas (Tabela 2). Após a indução da lesão houve hipoxemia e deterioração da mecânica pulmonar, comparando-se o período inicial e o período após indução (Tabela 3). Este comportamento indica que os grupos foram semelhantes e que indução da lesão foi efetiva e de igual intensidade nos quatro grupos, sendo estes, portanto, comparáveis.

Tabela 2 – Variáveis de comparação dos grupos nos momentos inicial e após indução da lesão pulmonar

Variáveis		Grupos					
		GC	**GVAFP**	**GVAFS**	**GVMP**	**GVMS**	**Nível descritivo**
Relação PaO_2/FiO_2	**Inicial**	444 ± 59	447 ± 51	422 ± 79	458 ± 48	448 ± 62	p = 0,721
	Após a lesão		69 ± 21	72 ± 15	68 ± 12	74 ± 16	p = 0,775
IO (cmH_2O/ mmHg)	**Inicial**	2,0 (1,6 - 2,2)	2,0 (1,8 - 2,1)	2,0 (1,9 -2,5)	1,9 (1,7 -2,1)	2,1 (1,7 - 2,6)	p = 0,205
	Após a lesão		17,6 (12,1 - 21,1)	16,8 (12,3 - 19,7)	13,8 (12,9 - 16,5)	15,7 (13,1 - 18,7)	p = 0,331
CP (cmH_2O)	**Inicial**	1,7 (1,4-1,8)	1,9 (1,7 - 2,3)	1,8 (1,5 – 2,2)	1,7 (1,5 - 2,2)	1,7 (1,5 - 2,3)	p = 0,509
	Após a lesão		0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	p = 0,102
MAP (cmH_2O)	**Inicial**	8 (8 - 9)	9 (8 - 9)	9 (8 - 9)	8 (8 - 9)	9 (9 - 10)	p = 0,718
	Após a lesão		11 (11 - 12)	12 (10 - 12)	10 (9 - 12)	12 (10 - 12)	p = 0,084
PIP (cmH_2O)	**Inicial**	16 (14 – 16)	16 (14 – 17)	15 (14 – 16)	19 (16 – 20)	17 (16 – 19)	p = 0,132
	Após a lesão		**23 ± 4**	**23 ± 4**	**25 ± 2**	**24 ± 3**	**p = 0,361**

Valores expressos em média ± DP ou mediana (P25 – P75).
Comparação de Grupos: ANOVA e ANOVA de Kruskal-Wallis.
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: grupos em ventilação convencional e posição supina, IO: Índice de Oxigenação, CP: Complacência pulmonar estática, MAP: Pressão aérea média, PIP: Pressão Inspiratória Positiva

Tabela 3: Variáveis de comparação dos momentos inicial e após indução para cada grupo

Variáveis	Grupos	Momentos de avaliação		Nível descritivo
		Antes da lesão	Após a lesão	
Relação PaO_2/FiO_2	**GVAFP**	447 ± 51	69 ± 21	p < 0,001
	GVAFS	422 ± 79	72 ± 15	p < 0,001
	GVMP	458 ± 48	68 ± 11	p < 0,001
	GVMS	448 ± 62	74 ± 16	p < 0,001
IO (cmH_2O/mmHg)	**GVAFP**	2,0 (1,8 – 2,1)	17,6 (12,1 – 21,1)	p < 0,001
	GVAFS	2,1 (1,7 – 2,6)	16,8 (12,3 – 19,7)	p < 0,001
	GVMP	1,9 (1,7 – 2,2)	13,8 (12,9 – 16,5)	p < 0,001
	GVMS	3,2,1 (1,7 – 2,6)	15,7 (13,1 – 18,7)	p < 0,001
CP (cmH_2O)	**GVAFP**	1,9 (1,7 – 2,3)	0,8 (0,7 – 0,9)	p < 0,001
	GVAFS	1,8 (1,5 – 2,2)	0,9 (0,7-1,1)	p < 0,001
	GVMP	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2	p < 0,001
	GVMS	1,7 (1,5 – 2,3)	0,7 (0,5 – 0,8)	p < 0,001
MAP (cmH_2O)	**GVAFP**	9 ± 1	11 ± 1	p < 0,001
	GVAFS	9 (8 – 9)	12 (10 – 12)	p < 0,001
	GVMP	8 (8 – 9)	10 (9 – 12)	p = 0,004
	GVMS	9 ± 1	11 ± 1	p < 0,001
PIP (cmH_2O)	**GVAFP**	16 ± 2	23 ± 4	p < 0,001
	GVAFS	16 ± 2	23 ± 4	p < 0,001
	GVMP	18 ± 3	25 ± 2	p < 0,001
	GVMS	17 ± 2	24 ± 3	p < 0,001

Valores expressos em média ±DP ou mediana (P25 - P75).
Comparação dos momentos antes e depois: Teste t ou Mann-Whitney Rank Sum test.
Sendo: GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: grupos em ventilação convencional e posição supina, IO: Índice de Oxigenação, CP: Complacência pulmonar estática, MAP: Pressão aérea média, PIP: Pressão Inspiratória Positiva.

Durante o período experimental, a relação PaO_2/FiO_2 (Figura 3) melhorou nos grupos com lesão em relação ao valor após a indução. Apenas o GVAFP apresentou valores semelhantes ao GC, sendo que isso ocorreu desde os 60 minutos até o final do experimento. Além disso, a partir dos 180 minutos, o GVAFP apresentou valores maiores que os grupos em VMC. O GVAFS, apesar de manter valores próximos ao GVAFP, durante todo o experimento, em nenhum momento apresentou valores sem diferença estatística do controle, mas também apresentou valores maiores que os grupos em VMC, ao final do experimento. Os grupos em VMC (GVMP e GVMS) não se diferenciaram em nenhum momento. Além disso, apenas o GVAFP apresentou ao final do experimento, valores sem diferença estatística dos níveis antes da lesão.

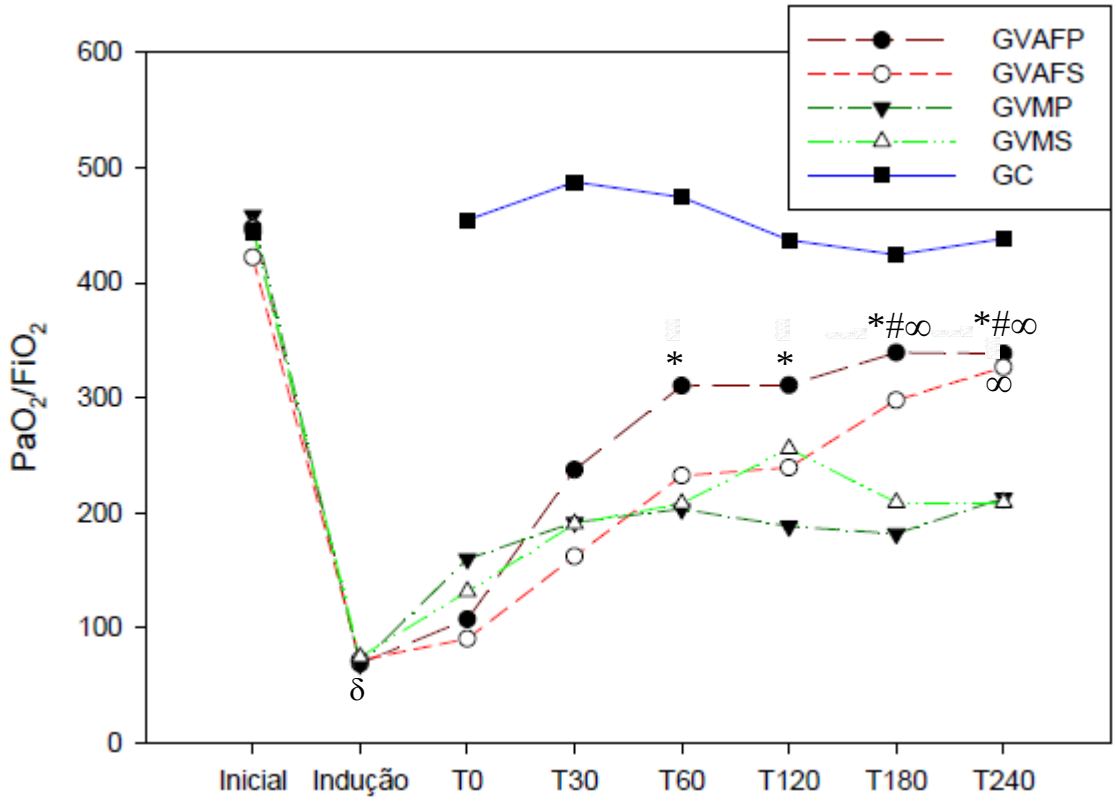


Figura 3 – Relação PO_2/FiO_2 ao longo do tempo para os grupos experimentais

Dados expressos em média.
Testes: ANOVA de Medidas Repetidas (momentos), ANOVA (grupos) e Test t (antes e após indução).
** p > 0,05 comparando GVAFP ao GC no mesmo momento; ∞ p < 0,05 comparando GVAFP e GVAFS aos grupos GVMP e GVMS no mesmo momento; # p > 0,05 comparado aos valores iniciais do mesmo grupo; δ p < 0,05 comparado com momento inicial em todos os grupos submetidos à lesão.*
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina.

Quanto ao índice de oxigenação (Figura 4), todos os grupos obtiveram valores significantemente maiores que o controle durante todo o período após lesão. Na comparação entre os grupos com lesão, aqueles ventilados em VOAF obtiveram valores significantemente menores de IO ao final do experimento, comparados ao GVMS. O GVMP assemelhou-se ao GVAFS em T180 e a ambos os grupos em VOAF no T240. Fazendo a comparação de momentos, apenas os grupos em VOAF apresentaram valores sem diferença estatística dos iniciais no final do experimento.

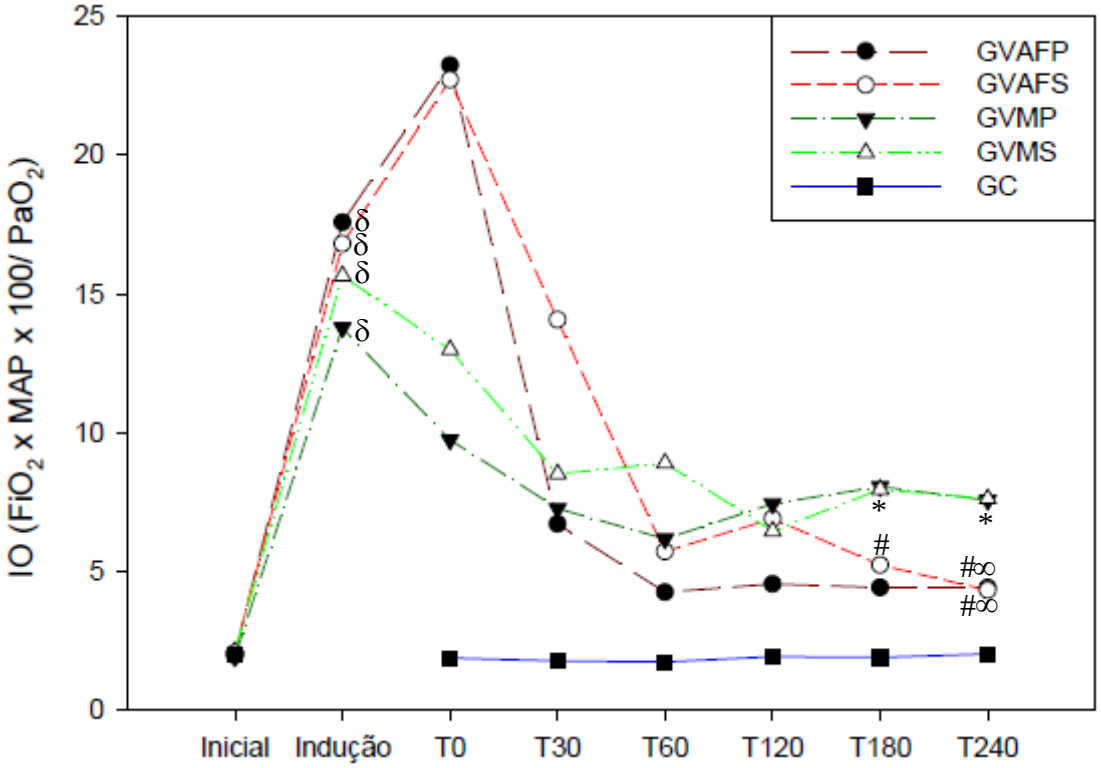


Figura 4 – Índice de oxigenação (IO) ao longo do tempo para os grupos experimentais

Dados expressos em mediana.
Testes: Friedman (momentos) e Kruskall-Wallis (grupos), com comparação entre pares pelo método de Dunn, e Mann-Whitney Rank Sum test (antes e após indução).
** p < 0,05 GVMS comparado ao GVAFP e GVAFS no mesmo momento; # p > 0,05 GVAFS e GVAFP comparados a GVMP no mesmo momento; ∞ p > 0,05 comparado ao momento inicial do mesmo grupo; δ p < 0,05 comparado ao momento inicial em todos os grupos submetidos a lesão.*
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

4.2. Processo inflamatório alveolar

4.2.1. Avaliação de polimorfonucleares no lavado broncoalveolar.

A avaliação da porcentagem de neutrófilos no BAL (Figura 5) não mostrou diferença estatística significante entre os grupos com lesão, mas todos eles diferiram estatisticamente do grupo controle (GC < GVMP = GVMS = GVAFP = GVAFS).

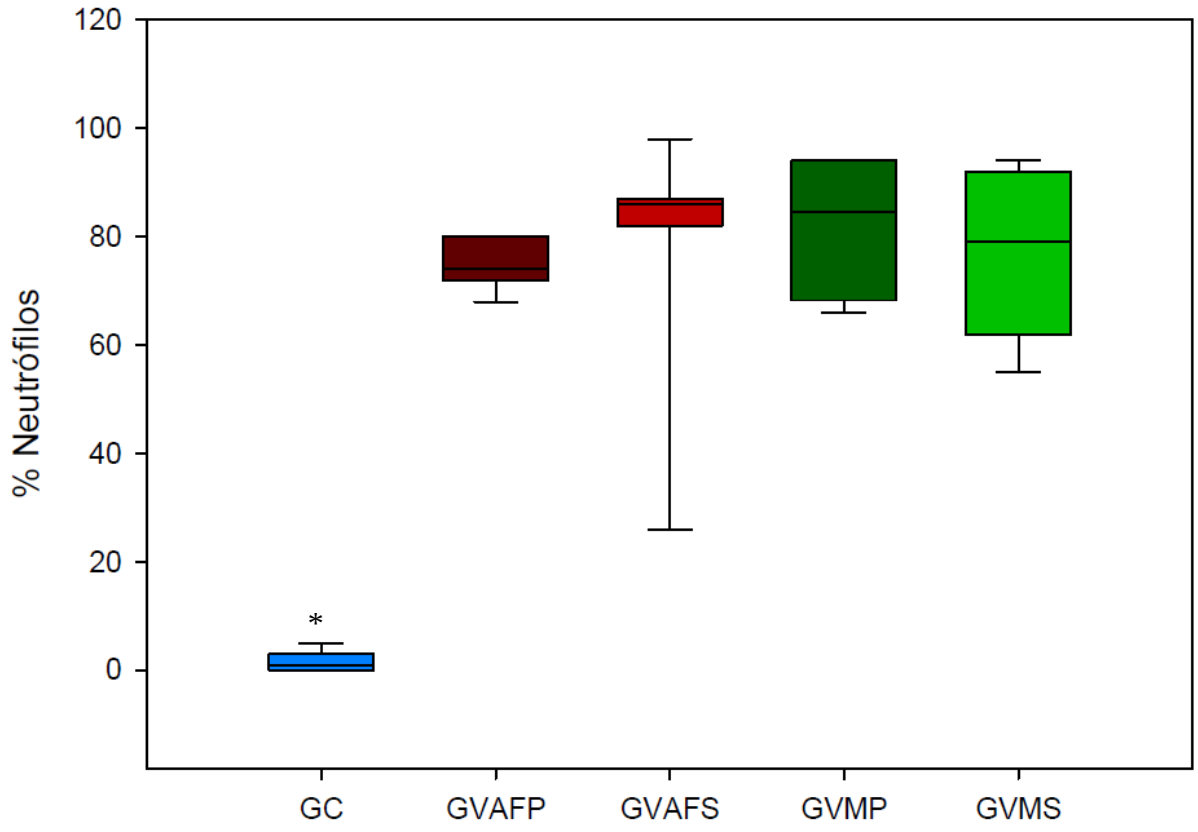


Figura 5 – Porcentagem de neutrófilos avaliada no lavado broncoalveolar dos animais dos grupos experimentais.

Variáveis expressas em mediana (P25-P75, max-min).
Teste: Anova de Kruskall-Wallis (Dunn)
** p < 0,05 comparando GC com os demais grupos.*
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

4.2.2. Avaliação do TNF-alfa no plasma, lavado broncoalveolar e tecido pulmonar por regionalidade

Não houve diferença estatística entre os grupos na medida do TNF-alfa no plasma dos animais (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis de TNF-alfa no plasma em cada grupo (n=7)

	GC	GVAFP	GVAFS	GVMP	GVMS	Nível descritivo
TNF-alfa (ng/ml)	**0,39 (0,02-0,62)**	**0 (0-0,19)**	**0 (0-0,28)**	**0,02 (0-0,57)**	**0 (0-0,1)**	**p>0,05**

Valores em mediana (P25-75).
Teste: Anova de Kruskall-Wallis (Dunn).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

A medida de TNF-alfa no BAL (Figura 6) foi significantemente maior nos grupos GVAFP, GVAFS e GVMS, quando comparados ao controle, sem diferença estatística entre GC e GVMP. Não houve, porém, diferença estatística entre os quatro grupos com lesão.

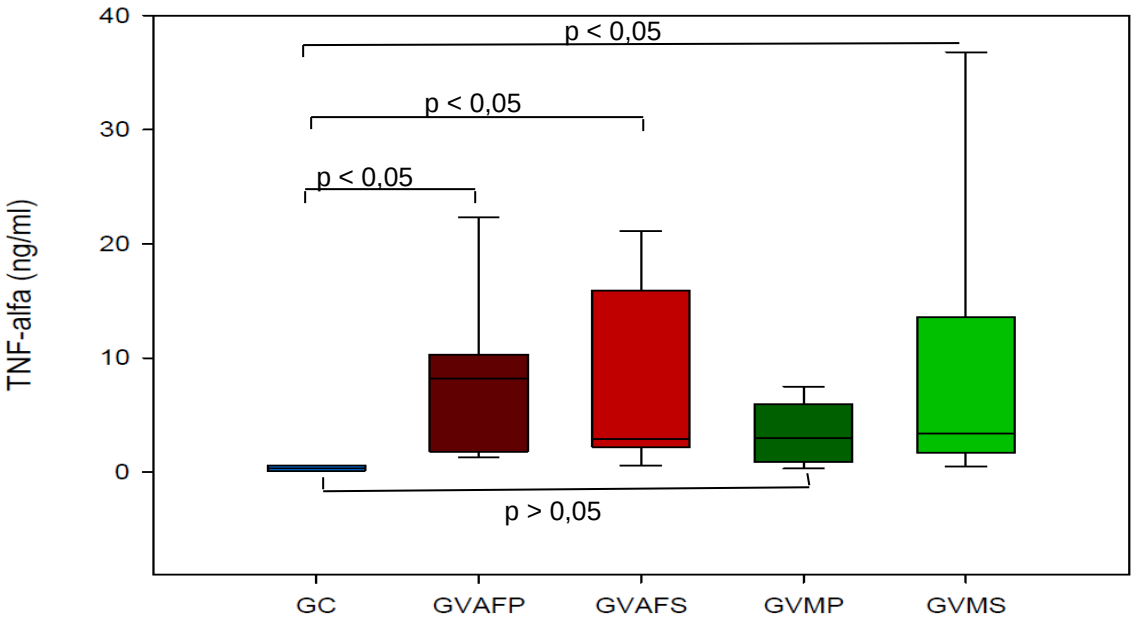


Figura 6 – Dosagem de TNF-alfa (ng/ml) no BAL de cada grupo experimental

Variáveis expressas em mediana (P25 - P75, max - min).
Teste: Anova de Kruskall-Wallis (Dunn)
Sem diferença estatística entre os grupos com lesão, p>0,05.
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

A medida de TNF-alfa em homogeinato de tecido pulmonar (Figura 7) foi avaliada nas diferentes regiões pulmonares: ventral e dorsal, porém não houve diferença estatística entre elas (p=0,525). Os valores para GVAFP, GVAFS e GVMS foram significantemente maiores que o GC e este não diferiu estatisticamente do GVMP, para ambas as regiões pulmonares. Não houve, porém, diferença estatística entre os quatro grupos com lesão, mesmo padrão encontrado no BAL.

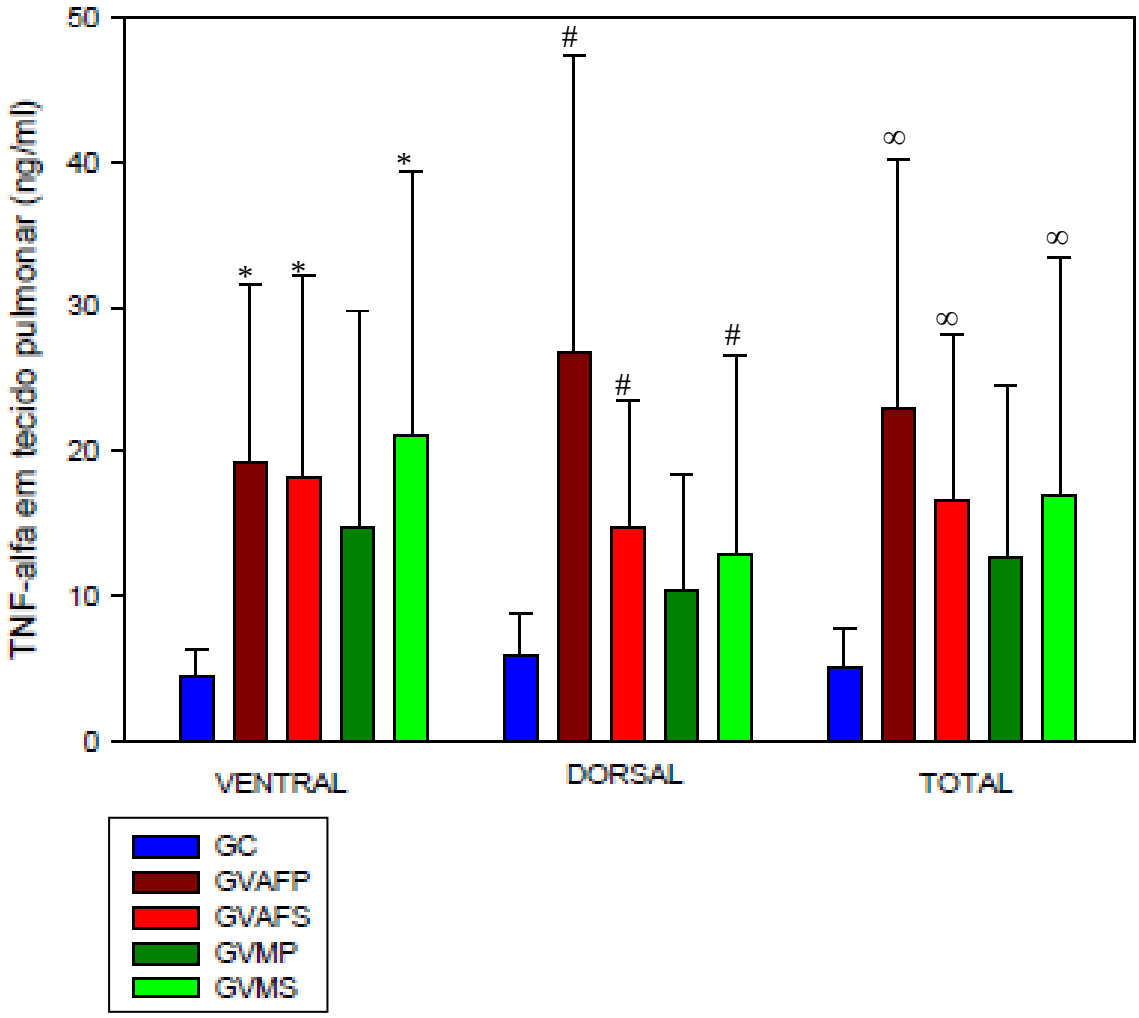


Figura 7 – Dosagem de TNF-alfa (ng/ml) em tecido pulmonar avaliado por região ventral e dorsal do pulmão.

Variáveis expressas em médias. Teste: Two way Anova (Bonferroni)
** p < 0,05 GVAFP, GVAFS e GVMS comparados ao GC, para região ventral; # p < 0,05 GVAFP, GVAFS e GVMS comparados ao GC, para região dorsal; ∞ p< 0,05 GVAFP, GVAFS e GVMS comparados ao GC, para ambas as regiões.*
Sem diferença estatística entre os grupos com lesão (GVAFP = GVAFS = GVMP = GVMS).
Não houve diferença entre a avaliação das diferentes regiões pulmonares (p=0,525).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

4.2.3. Expressão de TNF-alfa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real-time) em tecido pulmonar por regionalidade

Na avaliação da expressão gênica do TNF-alfa pela *PCR real-time* em homogeinato de tecido pulmonar, nas regiões ventral e dorsal pulmonar (Figura 8), não foi observada diferença estatística entre os grupos e também não houve diferença entre a avaliação dos grupos nas diferentes regiões pulmonares.

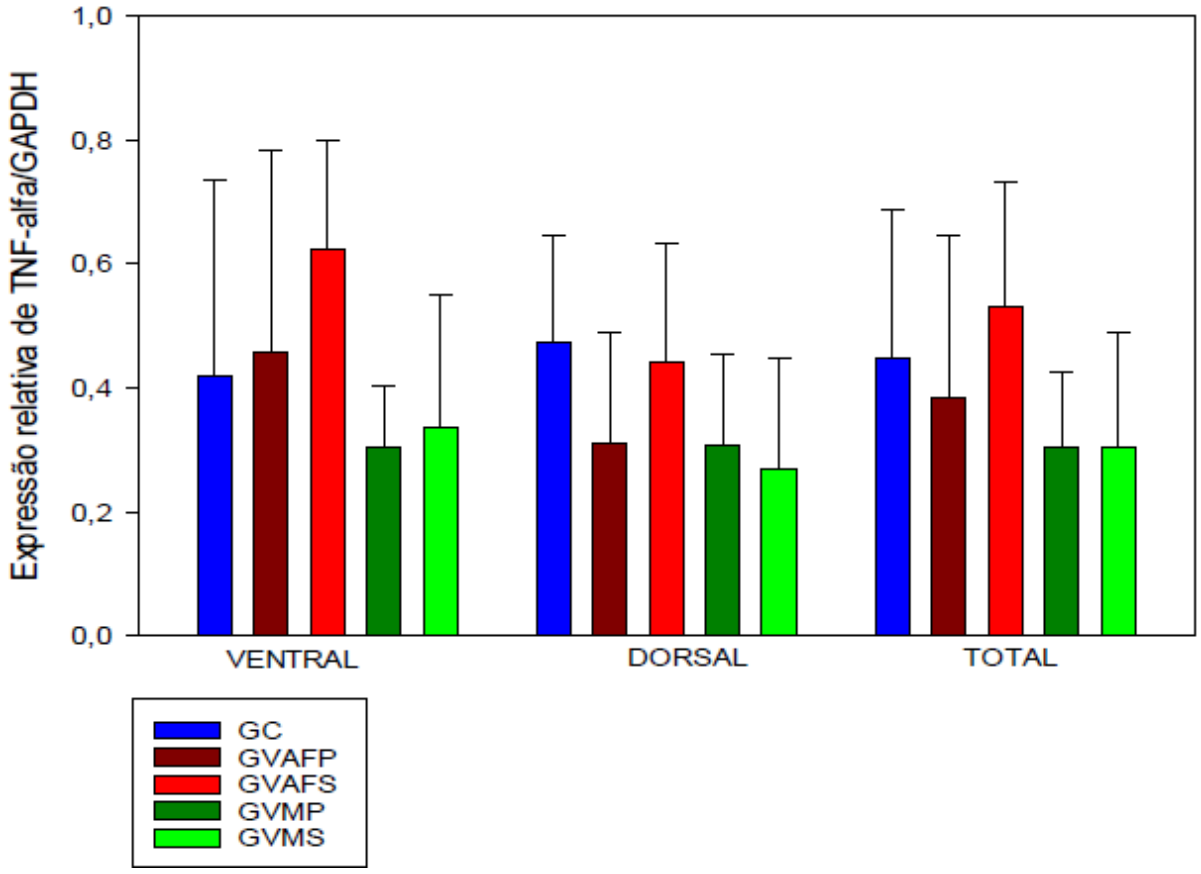


Figura 8 – Expressão gênica do TNF-alfa pela PCR real-time, avaliada nas regiões ventral e dorsal dos pulmonares

Variáveis expressas em médias.
Teste: Two way Anova.
Não houve diferença estatística entre os grupos e/ou regionalidade pulmonar (p > 0,05)
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina.

4.3. *Dano oxidativo pulmonar (Malondialdeído)*

A medida do malondialdeído no tecido pulmonar (Figura 9) não mostrou diferença estatística entre os grupos para ambas as regiões pulmonares.

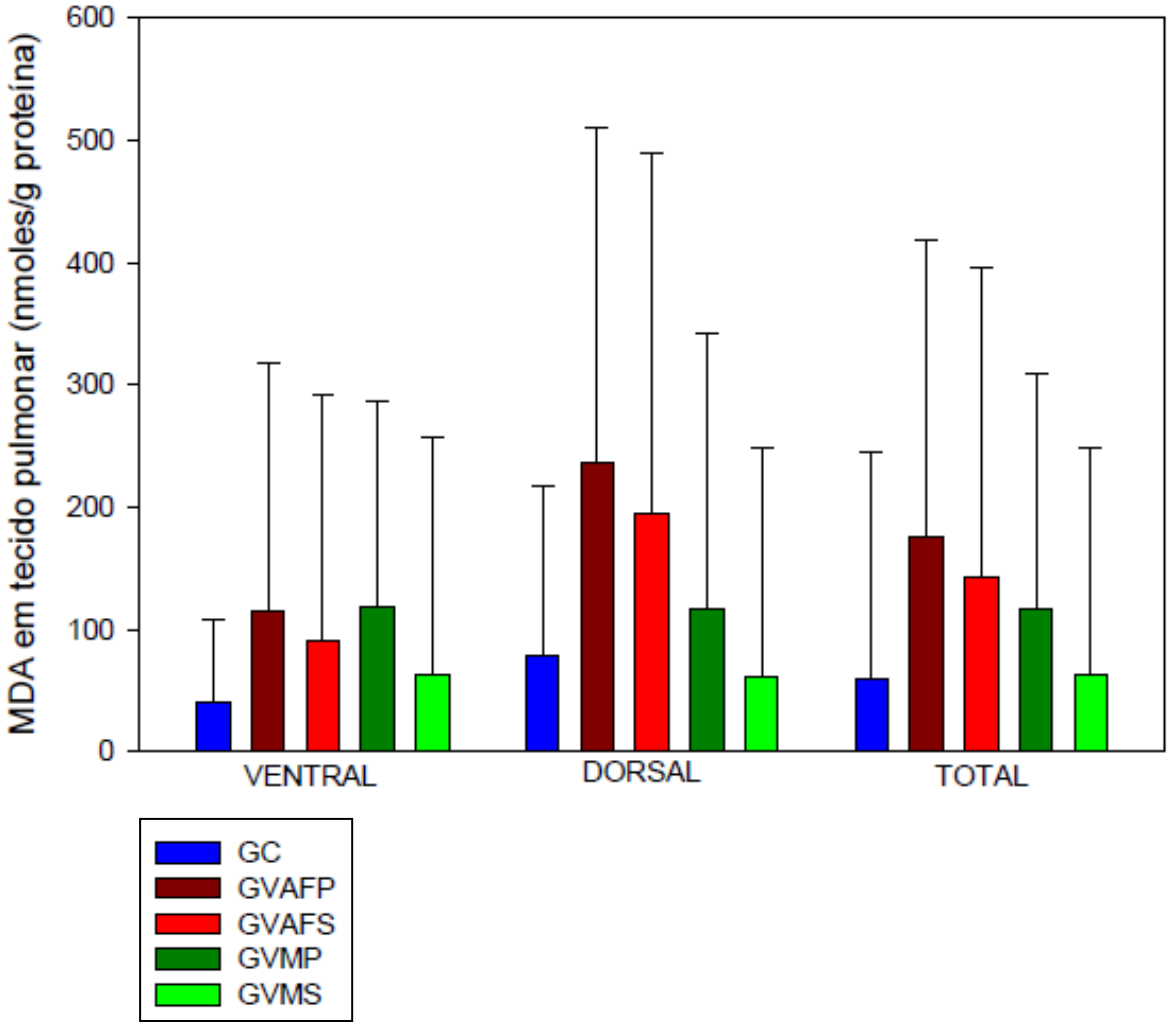


Figura 9 – Estresse oxidativo em tecido pulmonar pela dosagem de Malondialdeído (MDA) nas regiões ventral e dorsal pulmonares nos diferentes grupos experimentais.

Variáveis expressas em médias.
Teste: Two way Anova.
Não houve diferença estatística entre os grupos e/ou regionalidade pulmonar (p > 0,05).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina

4.4. *Histologia*

O escore de lesão histopatológica foi maior nos grupos com lesão em ventilação convencional em relação aos grupos ventilados em VOAF, não havendo diferença entre o escore comparando-se as posições prona e supina. No entanto, somente o grupo VOAF em posição prona obteve menor escore de lesão quando comparado aos grupos em VMC (GVAFP < GVMP = GVMS). Não houve diferença histológica quando se avaliou as diferentes regiões pulmonares (figuras 10 e 11).

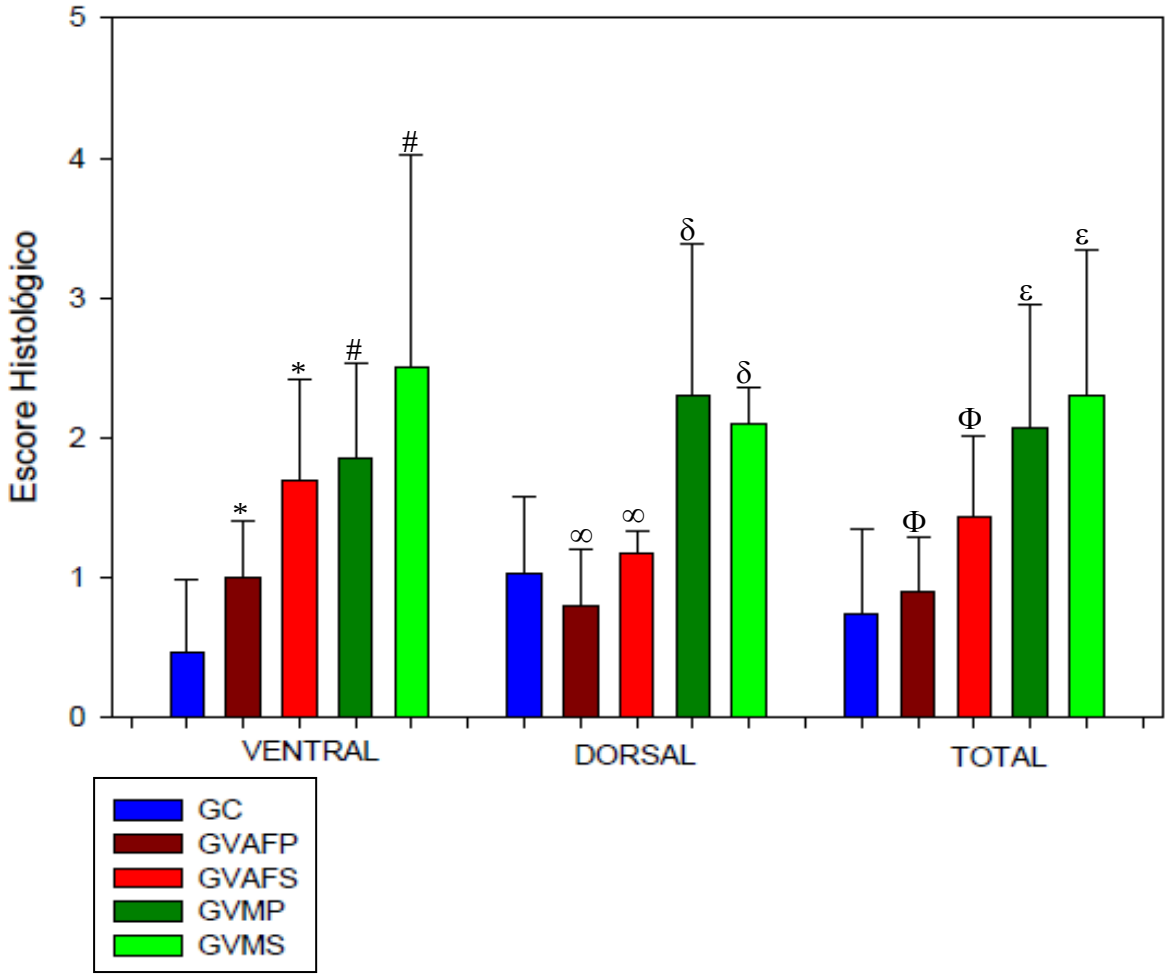


Figura 10- Escore histopatológico avaliado nas regiões pulmonares dorsal e ventral nos grupos experimentais.

Variáveis expressas em médias. Teste: Two way Anova (Bonferroni).
** p > 0,05 comparados ao GC e # p < 0,05 comparados a GC e GVAFP, para região ventral; ∞ p > 0,05 comparados ao GC e p < 0,05 comparados a GC e GVAFP, para região dorsal; Φ p > 0,05 comparados ao GC e ε p < 0,05 comparados a GC e GVAFP, para região ventral.*
Não houve diferença estatística entre GVMS e GVMP e entre GVAFS e GVAFP (p>0,05).
Não houve diferença estatística entre a regionalidade pulmonar (p > 0,05)
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina.

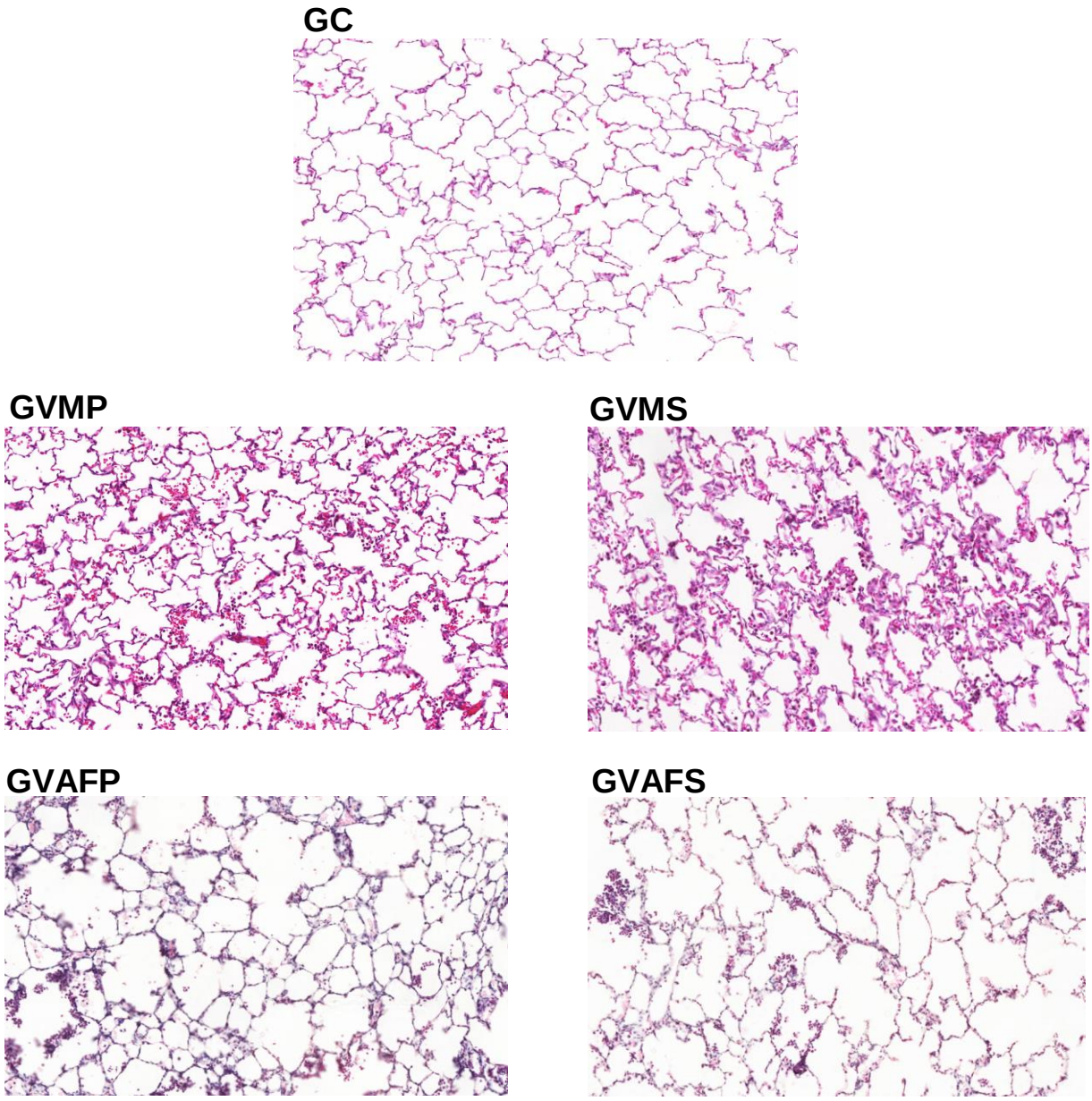


Figura 11 – Visualização de um exemplo de lâmina histopatológica (objetiva de 10x) de cada grupo de estudo.

Teste: Two way Anova (Bonferroni)
Sendo: GC < GVMP = GVMS; GC = GVAFP = GVAFS e GVAFP < GVMP = GVMS.
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina.

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 quando a VOAF foi utilizada em conjunto com a PP[73,74]. Até onde pudemos constatar, não existem estudos que tenham avaliado a lesão pulmonar experimental quando a VOAF e a PP 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[43,44,79] e, por estas razões, esse animal foi escolhido.

5.2. *Manipulação dos animais*

Para que a equipe dominasse as técnicas de dissecção dos vasos sanguíneos, traqueotomia, lavagem pulmonar e ventilação mecânica em coelhos foi realizado um projeto piloto com número menor de grupos e menor tempo de ventilação, durante um ano. 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 irrecuperável. 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[43,44]. Outro fator controlado rigorosamente foi a temperatura corporal, pois a hipotermia também determina deterioração dos animais do ponto de vista metabólico e cardiovascular[79]. A monitoração contínua da temperatura retal e a utilização de bolsas térmicas foram importantes para garantir a estabilidade dos nossos animais.

Em nosso experimento, todos os grupos permaneceram hemodinamicamente estáveis durante o período experimental (PAM > 50mmHg), com o uso de drogas vasoativas.

5.3. *Modelo de lesão pulmonar aguda*

A lavagem pulmonar com salina aquecida foi o modelo 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[46,47,75].

A maior vantagem deste método é que ele permite testar os efeitos de diferentes estratégias ventilatórias no desenvolvimento de lesão tecidual que resulta tanto da lavagem com salina per se como da depleção do surfactante e estratégia ventilatória[80].

Cabe a ressalva, no entanto, de que nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características da SDRA/LPA em humanos[81, 82]. Modelos de LPA em coelhos, por exemplo, associam-se com o dobro da produção de óxido nítrico comparado a SDRA em humanos[83]. 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 atelectasias 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[81,83]. 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[82].

Para definir que a lesão pulmonar tinha efetivamente ocorrido, escolhemos o nível de relação PaO_2/FiO_2 < 100 mmHg, valor definidor de SDRA grave na clínica[2]. Outros estudos experimentais que utilizaram este método de indução de lesão pulmonar também utilizaram estes níveis de relação para definir a lesão[43,44]. Além disso, conforme alguns estudos clínicos demonstraram, os resultados de melhora de

oxigenação[58,59] e até mesmo de mortalidade[64-66] com a PP são vistos nos pacientes mais graves, aqueles com relação PaO_2/FiO_2 semelhantes à avaliada neste estudo. Em outros estudos do nosso grupo nos quais foram utilizados outros tratamentos que não a PP, a escolha foi de atingir relação $PaO_2/FiO_2 < 200$[46,75], que define lesão de SDRA moderada a grave[2].

A característica deste modelo é promover hipoxemia quase imediata com aumento do *shunt* intrapulmonar e consequente diminuição da relação PaO_2/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 PaO_2/FiO_2 igual a PaO_2. O índice de oxigenação (IO = FiO_2 *x* pressão média vias aéreas *x* 100/ PaO_2), indicador da oxigenação e da agressividade da VM, aumentou e permaneceu elevado tanto por diminuição da oxigenação quanto por aumento da pressão média de vias aéreas. No presente estudo, a hipoxemia verificada após a indução da lesão foi de igual magnitude nos animais de ambos os grupos tratados. Estes achados garantiram a comparação entre os grupos. Houve queda da complacência pulmonar nos grupos com lesão induzida, de magnitude semelhante entre os grupos, que necessitaram de maior pressão de pico inspiratória e, consequentemente, maior pressão média de via aérea. A propósito, o número de lavagens necessárias para se chegar a instalação do modelo em nossos animais foi comparável ao de outros estudos[42,43,46,75,84].

5.4. *Trocas gasosas*

Demonstramos melhora da hipoxemia com a utilização da VOAF. Estudo anterior do nosso grupo, realizado em coelhos com LPA induzida pela infusão de salina aquecida, comparou VOAF e VMC em posição supina e demonstrou melhora significante da oxigenação nos animais ventilados com VOAF[46]. Outro estudo, realizado em ovelhas com LPA induzida por lavagem com salina, com manobra de recrutamento após a indução da lesão, analisou quatro grupos, três em VOAF (3,6 e 9Hz) e um em VMC. Houve queda significante da PCO_2 para os grupos em VOAF em relação aos em VMC, mas não houve diferença para PO_2, uma vez que a oxigenação ótima foi alcançada após manobra de recrutamento[85].

Muitos são os estudos clínicos que confirmaram melhora da oxigenação com o uso da VOAF[30-33,35,38-41], inclusive há uma metanálise que confirmou esse resultado da VOAF[34].

Em estudo realizado em cães com LPA induzida por ácido oleico[51], que comparou a resposta de animais em ventilação convencional submetidos a manobras de recrutamento pulmonar nas posições prona e supino, 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[51]. Em nosso estudo não houve diferença entre os grupos em VMC, nas posições supino e prona, porém, os animais em prona apresentaram melhora da hipoxemia, com valores semelhantes aos grupos em VOAF.

Visto que estudos clínicos têm recomendado tempo de uso de PP maior de 16 horas para determinar efeito benéfico[66,67], podemos inferir que se houvéssemos ventilado os animais por tempo maior, teríamos observado benefício mais evidente sobre a oxigenação com o emprego da PP para os animais em VMC. Entretanto, há dificuldade técnica pelo modelo experimental utilizado, já que os coelhos evoluem com instabilidade hemodinâmica e óbito em períodos experimentais mais prolongados. Também, não utilizamos manobras de recrutamento como no estudo citado anteriormente[51], fator que poderia evidenciar efeito da PP na VMC. Há que se considerar que a VOAF, por si, promove recrutamento alveolar.

Estudo que avaliou porcos ventilados em VOAF nas posições supina e prona por três horas e com LPA induzida por lavagem com salina aquecida observou melhora da oxigenação com pressões médias de vias aéreas mais baixas na PP comparada com o grupo em posição supina, sem diferença ao final do experimento, quando os dois grupos foram ventilados em VMC e supino[73]. Em outro estudo do grupo, comparando apenas grupos em VOAF nas posições prona e supina, em menor tempo de ventilação de duas horas, não houve diferença estatística entre os grupos para a relação PaO_2/FiO_2 e para o IO ao final do experimento, mas houve melhora mais rápida para o grupo em prona[86]. Neste estudo demonstramos melhora da oxigenação para o uso de VOAF, independente da posição, porém esta melhora foi mais rápida quando VOAF associada à posição prona.

Outro estudo experimental com porcos com SDRA induzida por lavagem com salina ventilados por 24 horas, compôs cinco grupos: 1 – Controle em VMC e posição supina; 2 – Grupo em VOAF e posição supina; 3 – Grupo em VOAF com 6 h de posição supina e 18 horas em posição prona; 4 – Grupo em VMC ventilado 18 horas em posição prona e 6 horas em posição supina; e 5 – Grupo ventilado em VMC inicialmente e depois em VOAF, sendo 18 horas em posição prona e 6 horas em posição supina. Os autores concluíram que associação de VOAF e PP melhorou a oxigenação[74], semelhante ao resultado do nosso estudo.

5.5. *Avaliação da lesão inflamatória*

O modelo de lavagem com salina aquecida causa reação inflamatória com aumento da permeabilidade vascular e ativação de PMN no BAL[87]. Não demonstramos diferença estatística entre os grupos com lesão pulmonar quanto a contagem de PMN no BAL. Em estudo anterior[46], no qual utilizamos o mesmo modelo de lesão pulmonar, mas com lesão menos intensa (relação PaO_2/FiO_2 < 200), comparando apenas animais em ventilação convencional com animais em VOAF, observamos diminuição do número de PMN no BAL nos animais sob VOAF em relação à VMC protetora, assemelhando-se ao grupo controle. Possivelmente, os resultados não foram reproduzidos no presente estudo, pois produzimos lesão pulmonar mais intensa com maior ativação de PMN e, talvez, por isso, os grupos com lesão foram mais sensíveis ao efeito deletério da ventilação, não sendo o tempo de utilização da VOAF suficiente para evidenciar o efeito da VOAF sobre a inflamação.

Liu et al[85] avaliaram a lesão inflamatória por meio da dosagem de Interleucina-6 e Interleucina-1 beta de acordo com regiões pulmonares, como realizado no presente estudo, comparando VOAF e VMC. Os autores demonstraram maior atividade inflamatória na região dorsal pulmonar, com menor expressão de interleucinas no grupo VOAF ventilado com 9Hz, quando comparado com VOAF em baixas frequências ou com a VMC.

Em estudo clínico Papazian et al.[71] avaliaram pacientes adultos com SDRA ($PaO_2/FiO_2 \leq 150$ mmHg) em VMC protetora e PP, ou em VOAF e PP ou supina,

sendo utilizada posição prona por 12 horas. Observaram menor porcentagem de neutrófilos no BAL no grupo em VMC e prona. Em nosso estudo observamos que os valores da porcentagem de neutrófilos encontrados no BAL não foram estatisticamente diferentes na comparação dos grupos de estudo. Entretanto, a atividade inflamatória avaliada pela dosagem de TNF-alfa no BAL e no tecido pulmonar também foi menor no grupo prona em VMC, sendo comparável ao grupo sem lesão. Nossos resultados podem ter sido influenciados pelo tempo do experimento (quatro horas), bem inferior as 12 horas do estudo clínico, citado anteriormente.

Em estudo anterior do nosso grupo, o qual comparou apenas coelhos ventilados com VOAF em posição prona e supina com menor tempo de ventilação (duas horas) [86], obtivemos valores menores do TNF-alfa no BAL e no homogeinato de tecido pulmonar da região dorsal pulmonar dos animais em prona, demonstrando menor lesão inflamatória neste grupo. Entretanto, nesse estudo o tempo de ventilação foi menor e não houve comparação com grupos em VMC. Sabidamente nas regiões dorsais de pacientes ventilados em posição supina predomina colapso pulmonar, menor relação V/Q e menor distribuição do VC para estas áreas, alterações que podem ser melhoradas pela posição prona[51,88]. No estudo atual, com maior tempo de ventilação, não obtivemos diferença para o TNF-alfa entre os grupos em VOAF. Entretanto, para os grupos em VMC, a dosagem do TNF-alfa foi menor no grupo prona, sendo comparável ao grupo sem lesão, o que pode indicar menor atividade inflamatória para estes animais.

5.6. *Avaliação do estresse oxidativo*

O estresse oxidativo pulmonar já foi avaliado por outros autores por meio do malondialdeído (MDA), biomarcador da peroxidação lipídica[89]. Rotta et al.[43] utilizaram este método comparando VOAF e VMC protetora e obtiveram no grupo com ventilado com VOAF valores semelhantes ao grupo controle (sem lesão pulmonar) e significantemente menores que os grupos com LPA e ventilação convencional. Em estudos anteriores do nosso grupo, foi demonstrada acentuada melhora no estresse oxidativo total (TAP) avaliado em tecido pulmonar de animais ventilados em VOAF.[46,75]

Estudo com coelhos com lavagem salina que avaliou a dosagem de malondialdeído no tecido pulmonar de forma regional pulmonar como o nosso, mas comparando apenas VOAF e VMC, observou maior lesão oxidativa na região dorsal pulmonar, com menor valor de MDA no grupo VOAF ventilado com 9Hz quando comparado a VOAF em baixas frequências ou a VMC.[85]

Não observamos diferença estatística entre os grupos quanto ao estresse oxidativo pela técnica de MDA no tecido pulmonar nas regiões dorsal e ventral, nem entre os tipos de ventilação e nem entre as posições prona e supina, inclusive sem diferença estatística com o grupo controle. Esse resultado pode ser explicado, pois em estudos anteriores[46,75] avaliamos o estresse oxidativo pelo método da TAP (capacidade antioxidante total) que mede os compartimentos lipídicos e aquosos, enquanto que o MDA mede apenas o compartimento lipídico e por isso, o último, talvez não seja o método ideal para este tipo de avaliação.

5.7. *Avaliação da lesão tecidual pulmonar*

Quanto à lesão histológica, não houve diferença na avaliação feita para as regiões dorsal e ventral pulmonares neste estudo. Os grupos VOAF foram semelhantes entre si e ao controle, mas, desses, apenas o grupo ventilado em posição prona mostrou diferença estatística em seu efeito protetor de lesão histológica quando comparado aos grupos em VMC (prona e supino). Os grupos em VMC também foram semelhantes entre si e exibiram maior lesão que o grupo controle.

Estudo utilizando a mesma metodologia que a nossa, mas com lesão pulmonar de menor gravidade[46], comparando coelhos em VMC protetora e em VOAF, foi demonstrado menor escore de lesão histopatológica para VOAF. Outro estudo[85] comparando VOAF e VMC de acordo com regiões pulmonares, da mesma forma que procedemos, demonstrou menor lesão histopatológica nos grupos VOAF ventilados com 9 Hz quando comparado com VMC e VOAF em frequências mais baixas. Nosso resultado reforça a VOAF como terapia protetora de lesão pulmonar e acrescenta que associada à PP tem seu efeito protetor potencializado.

Broccard et al. também avaliaram o escore de lesão pulmonar das regiões dependentes e não dependentes em animais ventilados em PP 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[90], e o segundo (2000) em cães com lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica não protetora[55]. Em ambos os estudos a PP mostrou melhora dos escores de lesão pulmonar. Não obtivemos o mesmo resultado para avaliação do escore histológico nos grupos prona e supino ventilados em VMC, porém utilizamos outra técnica para induzir a lesão pulmonar.

CONCLUSÃO

1. CONCLUSÃO

Concluimos que, em modelo de LPA induzida por lavagem pulmonar com salina aquecida em coelhos:

1. A VOAF melhora a oxigenação quando comparados à VMC, independente da posição, sendo que esta melhora ocorre mais rapidamente na sua associação à posição prona;

2. Na VMC, a PP atenua a lesão inflamatória avaliada pela medida de TNF-alfa no BAL e tecido pulmonar;

3. Os modos ventilatórios e as posições não modificam o grau de estresse oxidativo quando avaliados pelo método de malondialdeído;

4. A VOAF melhora o escore histopatológico de lesão pulmonar, independemente da posição, mas a associação de VOAF e PP atenua a lesão histopatológica quando comparada com a VMC protetora, seja em posição prona ou supina.

Este estudo teve as limitações de um estudo experimental, com poucas horas de período experimental quando comparado a um estudo clínico. Mais estudos são necessários, em especial estudos clínicos, para demonstrar as vantagens da associação VOAF e posição prona no uso da SDRA em humanos, em especial para definir se há vantagens no seu uso precoce ou tardio na sua utilização clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katzeinstein AL, Bloor CM, Leimbow AA. Difuse alveolar damage – the role of oxygen, shock, and related factors: a review. *AM J Pathol.* 1976; 85:209-228.
2. The ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome, The Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307:2526-2533.
3. Thompsom BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2017; 377:562-572.
4. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophaphage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol* 2014; 306:L709-725.
5. Huppert LA, Matthay MA. Alveolar fluid clearance in pathologically relevant conditions: in vitro and in vivo models of acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2015; 195:87-95.
6. Cabrera-Benitez NE, Laffey JG, Parotto M, et al. Mechanical ventilation-associated lung fibrosis in acute respiratory distress syndrome; a significant contributor to poor outcome. Anesthesiology 2014;121:189-198.
7. The Pediatric Acute Lung Injury Consensus Group. Pediatric acute respiratory distress syndorme: Consensus recommendations from the pediatric acute lung injury consensus conference. *Pediatr Crit Care Med* 2015;16:428-439.
8. Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive cares units in 50 contries. *JAMA* 2016;315:788-800.
9. Harridge MS, Moss M, Hough CI, et al. Recovery and outcomes after the acute respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* 2016;42:725-738.
10. Herridge MS, Tansey CM, Matté A, et al. Funcional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* 2011;364:1293-1304
11. Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M, et al. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988;69:824-832.
12. Kolobow T, Moretti MP, Fumagalli R, et al. Severe impairment of lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:312-315.
13. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Int Care Med* 1990;16:372-377.
14. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Mechanical ventilation-induced pulmonary edema: interaction with previous lung alterations. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;151:1568-1575.
15. Imai Y, Slutsky AS. High-frequency oscillatory ventilation and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2005;33(3 Suppl):S129-134.
16. Malarkkan N, Snook NJ, Lumb AB. New aspects of ventilation in acute lung injury. *Anaesthesia* 2003;58:647-667.
17. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000;284:43-44.
18. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med* 2013;369:2126-2136.
19. Tsuno K, Miura K, Takeya M, et al. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1115-1120.
20. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, et al. Injurious ventilator strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; 99:944-952.
21. Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 1993;21:131-143.
22. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, et al. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:880-884.
23. 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.
24. Mehta S, MacDonald R, Hallett DC, et al. 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;31:383-389.

25. Crotti S, Mascheroni D, Caironi P, el al. Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: a clinical study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:131-140.
26. Richard JC, Maggiore SM, Jonson B, et al. Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med 2001*;163:1609-1613.
27. Arnold JH, Hanson JH, Toro-Figuero LO, et al. Prospective, randomized comparison of high-frequency oscillatory ventilation and conventional ventilation in pediatric respiratory failure. *Crit Care Med* 1994;22:1530-1539.
28. 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;148:569-577.
29. Hemmila MR, Napolitano LM. Severe respiratory failure: advanced treatment options. *Crit Care Med* 2006;34(9 Suppl):S278-290.
30. 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;25:937-947.
31. Mehta S, Lapinsky SE, Hallet 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;29:1360-1369.
32. 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 Resp Crit Care Med* 2002;166:801-808.
33. 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;126:518-527.
34. Sud S, Sud M, Friedrich JO, et al. High frequency oscillation in patients with acute respiratory lung injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS): systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010;240:c2327-2337.
35. Young D, Lamb SE, Shah S, et al. High-frequency oscillation for acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:806-813.
36. Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH, et al. High-frequency oscillation in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:795-805.
37. Gerstmann DR, Minton SD, Stoddard RA, 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):1044-1057.
38. Plavka R, Kopecky P, Sebron V, et al. 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;25:68-75.
39. Ben Jaballah N, Khaldi A, Mnif K, et al. High-frequency oscillatory ventilation in pediatric patients with acute respiratory failure. *Pediatr Crit Care Med* 2006;7:362-367.
40. Gupta P, Green JW, Tang X, et al. Comparison of high frequency oscillatory ventilation and conventional mechanical ventilation in pediatric respiratory failure. *JAMA Pediatr* 2014;168:234-249.
41. Fioretto JR, Batista AB, 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. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:809-816
42. Imai Y, Nakagawa S, Ito Yet al. Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation. *J Appl Physiol* 2001;91:1836-1844.
43. 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.
44. Viana ME, Sargentelli GA, Arruda AL, 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.
45. Meyer J, Cox PN, McKerlie C, Bienzle D. Protective strategies of high-frequency oscillatory ventilation in a rabbit model. *Pediatr Res* 2006;60:401-406.

46. Ronchi CF, Ferreira ALA, Campos FJ, et al. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Experim Biol and Med* 2011;236:1188-1196.
47. Ronchi CF, Fioretto JR, Ferreira ALA, et al. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 2012;112:1184-1190.
48. 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.
49. Bryan AC. Comments of a devil's advocate. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:143-144.
50. Kallet RH. A comprehensive review of prone position in ARDS. *Respir Care* 2015;60:1660-1687.
51. Cakar N, Kloot TV, Youngblood M, et al. 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;161:1949-1956.
52. Guérin 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.
53. 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.
54. Mackenzie CF. Anatomy, physiology and pathology of prone position and postural drainage. *Crit Care Med* 2001;29:1084-1085.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Mentezepoulos SD, Roussos C, Zakynthinos E. Prone position reduces lung stress and strain in severe acute respiratory distress syndrome. *Eur Resp Journal* 2005;25:1046-1056.
59. Romero CM, Cornejo RA, Gálvez R, et al. Extended prone position ventilation in severe acute respiratory distress syndrome: a pilot feasiblility study. *J Crit Care* 2009;24:81-88.
60. Guérin C. Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Critical Care* 2006;12:50-54.
61. 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.
62. Alsaghir AH, Martin CM. Effect of prone positioning in patients with acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2008;36:603-609.
63. Sud S, Sud M, Friedrich JO, et al. 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;178:1153-1161.
64. Sud S, Friedrich JO, Taccone P, et al. Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2010;36:585-599.
65. Guérin C, Reignier J, Richard JC, et al. Prone Positioning in Servere acute Respiratory Distress Syndrome*. N Engl J Med* 2013;368:2159-2168.
66. Sud S, Friederich JO, Adhikari NJK, et al. Effect of prone positioning during mechanical ventilation on mortality among patients with acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 2014;186:E381-90.
67. Relvas MS, Silver PC, Sagy M. Prone positioning of pediatric patients with ARDS results in improvement in oxigenation IF maintained > 12 h daily. *CHEST* 2003;124:269-274.
68. Casado-Flores J, Azagra AM, Ruiz-Lopez MJ, et al. Pediatric ARDS: effect of supine-prone postural changes on oxigenation. *Intensive Care Med* 2002;28:1792-6.
69. Curley MA, 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;294:229-37.
70. 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.

71. Papazian L, Gainnier M, Marin V, et al. Comparison of prone positioning and high-frequency oscillatory ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005;33:2162-2171.
72. Demory D, Michelet P, Arnal JM, et al. High-frequency oscillatory ventilation following prone positioning prevents a further impairment in oxygenation. *Crit Care Med* 2007;35:106-111.
73. Brederlau J, Muellenbach R, Kredel M, et al. High frequency oscillatory ventilation and prone positioning in a porcine model of lavage-induced acute lung injury. *BMC Anesthesiol* 2006;6:4
74. Zurek J, Dominik P, Kosut P, et al. Effects of a combination of prone positioning and high-frequency oscillatory ventilation on blood gas exchange in an experimental pig model of acute respiratory distress syndrome. *Acta Veterinaria-Beograd* 2014;64:307-318.
75. Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF, 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;57:273-81.
76. Maurenbrecher H, Lamy M, Deby-Dupont G, et al. An animal of model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest* 2001;120:573-581
77. 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.
78. Godornes C, Leader BT, Molini BJ, et al. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 2007;38:1-7.
79. National Research Council of USA. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington DC: National Academy Press; 2000. P59.
80. Otáhal M, Mlcek M, Vitrova I, et al. A Novel experimental Model of Acute Respiratory Distress Sindrome in Pig. *Physiol Res* 2016;65:S643-651.
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 desease in early life. *Paedatr* Respir *Rev* 2001;2:151-158.
83. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Phyiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L379-399.
84. Lachmann B, Roberson N, Vogel J. On vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980;24:231-236.
85. Liu S, Yi Y, Wang M, Chen Q, et al. Higher Frequency Ventilation attenuates Lung Injury during high-frequency oscillatory ventilation in sheep models of acute respiratory distress syndrome. *Anestesiology* 2013;119:398-411.
86. Pires RB. Comparação entre posição prona e posição supina, associadas a ventilação oscilatória de alta frequência, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Botucatu; 2013. 61 p.D
87. 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.
88. 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 Med* 1998;157:387-393.
89. Parish LC. Retinoides and carotenoids in dermatology. JAMA 2008;299:1622-1612.
90. Broccard AF, Shapiro RS, Schimitz LL, et al. Influence of prone positions on the extend and distributions of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Med* 1997;25:16-27.

CONTROLE DURANTE A INDUÇÃO DE SDRA

Data: Animal nº: Peso: Volume lavagem:
Grupo de estudo:

Hora							
Nº lavagens	**Pré-ind.**						
VC (ml/kg)							
MAP							
P insp.							
Peep							
FR							
pH							
$PaCO_2$							
PaO_2							
Bic							
Sat.							
BE							
IO							
PaO_2/FiO_2							
Compl. Estática							
IEV							
FC							
PAM							
Temperatura							
Pancurônio							

CONTROLE DAS LAVAGENS

	1ª	**2ª**	**3ª**	**4ª**	**5ª**	**6ª**	**7ª**	**8ª**	**9ª**	**10ª**	**11ª**	**12ª**	**13ª**	**14ª**	**15ª**	**16ª**
Infundido																
Retirado																

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

Hora						
Tempo (min.)	**0**	**30**	**60**	**120**	**180**	**240**
Posição	Supina					
Amplitude						
MAP	16	16	14	12	10-11	10-11
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 x MAP)/ PaO_2] x 100 MAP = [(PIP x Ti) + (PEEP x Te)]/ (Ti+Te)
Índice de eficiência ventilatória = IEV = 3800/ [(PIP - PEEP) x $PaCO_2$ x FRmec)]
PAO_2 = [(FiO_2 x (PB - PH_2O)] - ($PaCO_2$/ 0,8)].
* = Momentos da virada

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

Hora						
Tempo (min.)	**0**	**30**	**60**	**120**	**180**	**240**
Posição	Supina					
PEEP						
PIP						
MAP	16	16	14	12	10-11	10-11
FR						
pH						
$PaCO_2$						
PaO_2						
Bic						
Sat.						
BE						
IO						
Complacência						
IEV						
PaO_2/FiO_2						
FC						
PAM						
Temperatura						
Pancurônio						
Peso do pulmão direito (g)						

IO = [(FiO_2 x MAP)/ PaO_2] x 100 MAP = [(PIP x Ti) + (PEEP x Te)]/ (Ti+Te)
Índice de eficiência ventilatória = IEV = 3800/ [(PIP - PEEP) x $PaCO_2$ x FRmec)]
PAO_2 = [(FiO_2 x (PB - PH_2O)] - ($PaCO_2$/ 0,8)].
* = Momentos da virada

Apêndice B – Tabelas em anexo

Evolução da Relação PaO_2/FiO_2 nas quatro horas de experimento para os grupos experimentais.

Grupos (n=15)	T0	T30	T60	T120	T180	T240
GC	454±65 Ae	487±44 Ae	474± 80 Ae	437±110 Ae	424±96 Ae	438±41 Ae
GVAFP	107±104 Af	237±128 ABf	310±136 Bef	311±140 Bef	339±110 Bef	338±103 Bef
GVAFS	90±59 B Af	162±88 ABf	232±99 BCf	239±113 BCf	298±97 Cfg	326±105 Cf
GVMP	160±102 Af	191±117 Af	203±138 Af	188±79 Af	182±85 Ag	213±110 Ag
GVMS	132±61 Af	190±107 ABf	208±124 ABf	255±85 Bf	209±86 Bg	209±61 Bg

Valores expressos em média ± dp. Teste ANOVA (Bonferroni) para comparação entre grupos.
Teste ANOVA de medidas repetidas (Bonferroni) para comparação entre momentos.
Letras maiúsculas (A-D) comparam momentos e letras minúsculas (e-g) comparam grupos; Letras diferentes indicam significância estatística (p < 0,05).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina; n = número de animais

Evolução do Índice de Oxigenação (IO) inicial, após indução da lesão e nas 4 horas de experimento para os grupos experimentais.

Grupos (n=15)	T0	T30	T60	T120	T180	T240
GC	1,9 (1,6-2,1) ABe	1,8 (1,5-1,9) Ae	1,7 (1,6-2,0) Ae	1,9 (1,7-2,2) ABe	1,9 (1,8-2,5) ABe	2,0 (1,7-2,4) Be
GVAFP	23,2 (14,2-30,1) Af	6,7 (4,2-15,0) ABf	4,2 (3,6-10,1) Bf	4,5 (3,6-6,1) Bf	4,4 (3,8-5,0) Bf	4,4 (3,8-5,1) Bf
GVAFS	22,7 (15,0-28,1) Af	14,1 (6,8-15,2) ABf	5,7 (4,4-12,0) BCf	6,9 (4,2-10,6) BCf	5,2 (3,9-6,7) Cfg	4,3 (3,5-5,9) Cf
GVMP	9,7 (5,0-16,2) Af	7,3 (5,3-12,7) Af	6,2 (5,4-14,1) Af	7,4 (5,7-11,0) Af	8,0 (5,1-13,1) Agh	7,6 (4,7-11,3) Afg
GVMS	13,0 (7,8-15,4) Af	8,5 (6,7-13,2) ABf	8,9 (4,7-13,1) ABf	6,4 (4,8-8,7) Bf	7,9 (6,1-11,0) ABh	7,6 (6,3-11,0) ABg

Valores expressos em mediana (P25-P75). Teste de Kruskal-Wallis (Dunn's) para comparação entre grupos. Teste de Friedman de medidas repetidas (Dunn's) para comparação entre momentos.
Letras maiúsculas (A-D) comparam momentos e letras minúsculas (e-h) comparam grupos; Letras diferentes indicam significância estatística (p < 0,05).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina; n = número de animais.

Porcentagem de neutrófilos e níveis de TNF-alfa e IL-6 no lavado broncoalveolar em cada grupo (n=7)

	GC	GVAFP	GVAFS	GVMP	GVMS
Neutrófilos (%)	1,0 (0-3,0) a	74 (72-80) b	86 (82-87) b	85 (68-94) b	79 (62-92) b
TNF-alfa (ng/ml)	0,3 (0,1-0,6) a	8,2 (1,8-10,3) b	2,9 (2,2-15,9) b	2,9 (0,8-6,0) ab	3,3 (1,7-13,5) b

Valores expressos em medianas (P25-P75). Teste: Anova de Kruskall-Wallis
n = numero de animais; ND= não detectado; Letras minúsculas comparam os grupos.
Letras diferentes indicam significância estatística (p < 0,05).
Sendo: GC: Grupo Controle, GVAFP: Grupo em ventilação de alta frequência e posição prona, GVAFS: Grupo em ventilação de alta frequência e posição supina, GVMP: Grupo em ventilação convencional e posição prona, GVMS: Grupo em ventilação convencional e posição supina.