



Lesão inflamatória pulmonar em coelhos: efeitos da ventilação oscilatória de alta frequência em posição prona

Jose Roberto Fioretto^{1,a}, Rafaelle Batistella Pires^{2,b}, Susiane Oliveira Klefens^{1,c}, Cilmery Suemi Kurokawa^{1,d}, Mario Ferreira Carpi^{1,e}, Rossano César Bonatto^{1,f}, Marcos Aurélio Moraes^{1,g}, Carlos Fernando Ronchi^{1,3,h}

1. Disciplina de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu (SP) Brasil.
 2. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, Bauru (SP) Brasil.
 3. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG) Brasil.
- a. <http://orcid.org/0000-0003-4034-5962>
b. <http://orcid.org/0000-0002-3961-5534>
c. <http://orcid.org/0000-0002-4988-8317>
d. <http://orcid.org/0000-0003-1380-7527>
e. <http://orcid.org/0000-0002-1482-564X>
f. <http://orcid.org/0000-0002-0648-876X>
g. <http://orcid.org/0000-0003-0007-1506>
h. <http://orcid.org/0000-0002-5927-9320>

Recebido: 26 fevereiro 2018.
Aprovado: 12 agosto 2018.

Trabalho realizado na Disciplina de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu (SP) Brasil.

RESUMO

Objetivo: Comparar os efeitos das posições prona e supina durante ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) sobre oxigenação e inflamação pulmonar, lesão histológica e estresse oxidativo em um modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em coelhos. **Métodos:** Trinta coelhos Norfolk machos brancos foram submetidos à LPA por meio de lavagem traqueal com salina (30 ml/kg, 38°C). A lesão foi induzida durante a ventilação mecânica convencional, e a LPA foi considerada confirmada na presença de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mmHg. Os coelhos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: VOAF em posição supina (grupo PS, n = 15); e VOAF em posição prona (grupo PP, n = 15). Para a VOAF, a pressão média das vias aéreas foi inicialmente estabelecida em 16 cmH₂O. No 30°, 60° e 90° min após o início do protocolo de VOAF, a pressão média das vias aéreas foi reduzida para 14, 12 e 10 cmH₂O, respectivamente. No 120° min, os animais foram recolocados ou permaneceram na posição supina por mais 30 min. Foram avaliados os índices de oxigenação e escores histológicos de lesão pulmonar, bem como os níveis de TNF- α em lavado broncoalveolar e tecido pulmonar. **Resultados:** Após a indução da LPA, todos os animais apresentaram hipoxemia significativa, diminuição da complacência do sistema respiratório, diminuição da oxigenação e aumento da pressão média das vias aéreas em comparação aos valores basais. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, em nenhum dos momentos avaliados, quanto a PaO_2 e índice de oxigenação. Entretanto, os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar foram significativamente menores no grupo PP que no grupo PS, assim como os escores histológicos de lesão pulmonar. **Conclusões:** A posição prona parece atenuar a lesão pulmonar inflamatória e histológica durante a VOAF em coelhos com LPA.

Descritores: Respiração artificial/efeitos adversos; Decúbito ventral; Pulmão/fisiopatologia; Pneumonia; Síndrome do desconforto respiratório do adulto; Lesão pulmonar aguda; Modelos animais de doenças; Coelhos.

INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma síndrome heterogênea com patologia e mecanismos complexos.⁽¹⁾ É uma condição potencialmente fatal que se associa a altas mortalidade e morbidade, assim como altos custos.⁽²⁻⁵⁾ O manejo clínico da SDRA é essencialmente de suporte e inclui a ventilação mecânica (VM) protetora otimizada, cujas estratégias devem ser direcionadas a minimizar a lesão pulmonar induzida pelo ventilador, a toxicidade do oxigênio e a inflamação pulmonar.⁽⁶⁾ Em um estudo recente, Amato et al.⁽⁷⁾ constataram uma forte associação entre diminuições da pressão motriz e aumento da sobrevida em pacientes com SDRA. Portanto, a ventilação oscilatória de alta frequência (VOAF) é um método ventilatório atraente,^(8,9) pois envolve o uso de um volume corrente menor (V_{tr} 1-3 ml/kg) com uma frequência oscilatória maior que à da respiração fisiológica (5-10 Hz), evitando assim excursões de volume e aumentos da pressão alveolar. Durante a VOAF, aplica-se uma pressão média das vias aéreas (Pmédia) constante

para atingir e manter o recrutamento alveolar, mesmo no final da expiração.^(10,11)

Apesar das vantagens da VOAF, os resultados de estudos clínicos não apoiam seu uso rotineiro. O recente *Oscillation for Acute Respiratory Distress Syndrome Treated Early Trial*⁽¹²⁾ foi interrompido em razão do aumento da mortalidade hospitalar no grupo VOAF. No entanto, os pacientes daquele grupo necessitaram de mais suporte vasoativo que os do grupo controle, dificultando a análise dos resultados. Em duas recentes revisões sistemáticas e meta-análises, Meade et al.⁽¹³⁾ e Goligher et al.⁽¹⁴⁾ avaliaram o uso da VOAF em pacientes com SDRA. Meade et al.⁽¹³⁾ compararam a VOAF à VM convencional (VMC) protetora em pacientes com SDRA e constataram que a mortalidade foi maior nos pacientes do grupo VOAF que nos pacientes do grupo VMC, embora esse efeito tenha variado dependendo da gravidade da hipoxemia, sendo que aparentemente a lesão pulmonar foi maior entre os pacientes com SDRA leve ou moderada, embora a taxas de mortalidade tenham parecido ser menores entre os

Endereço para correspondência:

Carlos Fernando Ronchi. Universidade Federal de Uberlândia, Rua Benjamin Constant, 1286, CEP 38400-678, Uberlândia, MG, Brasil.
Tel.: 55 34 3218-2934. Fax: 55 34 99950-6299. E-mail: fernando.ronchi@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo n. 2010/06242-8).

pacientes com SDRA grave. Goligher et al.⁽¹⁴⁾ também analisaram a VOAF em comparação à VMC protetora, comparando a VOAF ao uso de V_T baixo e *positive end-expiratory pressure* (PEEP, pressão expiratória final positiva) alta, e concluíram que a VOAF, utilizada como nos estudos realizados até hoje, não fornece nenhum benefício na mortalidade em comparação à VMC protetora e pode até ser prejudicial em comparação ao uso de V_T baixo com PEEP alta.

Como terapia adjuvante, a posição prona otimiza o recrutamento pulmonar e a combinação ventilação-perfusão.^(15,16) Na posição prona, a perfusão pulmonar é distribuída de forma mais uniforme, o que melhora a ventilação para as áreas dorsais dos pulmões, melhorando assim a perfusão.^(17,18) Além disso, a posição prona diminui a hiperdistensão alveolar⁽¹⁹⁾ e o colapso alveolar cíclico, bem como reduz a lesão pulmonar induzida pelo ventilador,⁽²⁰⁾ redirecionando as forças compressivas exercidas pelo peso do coração sobre os pulmões,⁽²¹⁾ e melhora a drenagem de secreções.⁽²²⁾

No estudo *Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome*,⁽²³⁾ pacientes com SDRA grave que estavam em VM foram alocados para serem colocados na posição prona por pelo menos 16 h consecutivas ou para permanecerem na posição supina tradicional. Os autores constataram que as taxas de mortalidade em 28 e 90 dias foram menores no grupo posição prona. Uma meta-análise subsequente demonstrou que, se utilizada por períodos maiores que 16 h por dia e em conjunto com a VM protetora, a posição prona durante a VM reduz significativamente a mortalidade em pacientes com SDRA moderada ou grave.⁽²⁴⁾

Há poucos estudos avaliando os efeitos da combinação posição prona e VOAF sobre oxigenação, inflamação pulmonar e dano confirmado histologicamente em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda (LPA).⁽²⁵⁾ Até onde sabemos, não há estudos avaliando a regionalização da lesão pulmonar em relação a histologia, inflamação pulmonar e estresse oxidativo.

A hipótese do presente estudo é a de que a posição prona combinada com VOAF melhora a oxigenação, bem como atenua a lesão pulmonar causada por inflamação ou estresse oxidativo. Portanto, o objetivo foi comparar as posições prona e supina durante VOAF quanto aos seus efeitos sobre oxigenação, inflamação pulmonar, lesão histológica pulmonar e estresse oxidativo em um modelo de LPA em coelhos.

MÉTODOS

Delimitação, animais e instrumentação

Trata-se de um estudo aleatório, prospectivo, com animais in vivo. Trinta coelhos Norfolk machos brancos, pesando 2,0-3,0 kg, foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista. Os coelhos foram primeiramente anestesiados com injeções i.m. de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (4 mg/kg).^(26,27) Cada coelho foi então

ventilado com oxigênio inalatório a 100% durante respiração espontânea, e, em seguida, o pescoço e o tórax foram raspados para a colocação de eletrodos para a monitoração da frequência cardíaca. A região anterior do pescoço foi anestesiada com lidocaína a 2%, realizou-se uma traqueotomia, e foi inserido um tubo traqueal (tubo PORTEX de 3,0-3,5 mm de diâmetro; Smith Medical, Hythe, Inglaterra). Logo em seguida, a ventilação foi iniciada com o ventilador (Galileo Gold; Hamilton Medical AG, Bonaduz, Suíça) no modo controle de volume regulado por pressão com os seguintes parâmetros iniciais: $FiO_2 = 1,0$; $V_T = 6$ ml/kg; PEEP = 5 cmH₂O; e FR = 40-50 ciclos/min. Um cateter vascular de calibre 22 (Introcan Safety; B. Braun, Melsungen, Alemanha) foi então inserido na artéria carótida comum, e um cateter de duplo lúmen de 5-French (Arrow International Inc., Reading, PA, EUA) foi inserido na veia cava superior através da veia jugular. O cateter arterial foi utilizado para avaliar os gases sanguíneos e as pressões arteriais com um sistema de monitoração (LogiCal; Medex, Dublin, OH, EUA) conectado a um monitor fisiológico convencional (DX 2010; Dixtal, Manaus, Brasil). O cateter de duplo lúmen foi utilizado para a infusão intravenosa contínua de cetamina (10 mg/kg por hora) e xilazina (4 mg/kg por hora). A paralisia muscular foi induzida por administração intravenosa de brometo de pancurônio (0,2 mg/kg) e mantida com doses de 0,1 mg/kg, conforme necessário, para minimizar os movimentos respiratórios e evitar taquicardia desproporcional.

Durante o experimento, utilizamos a infusão intravenosa contínua de norepinefrina (0,5-1 µg/kg por minuto) para manter a pressão arterial média acima de 50 mmHg, conforme necessário. A necessidade de suporte inotrópico foi determinada utilizando um escore vasoativo-inotrópico.⁽²⁸⁾ A manutenção de fluidos foi realizada por infusão contínua de solução salina a 0,9% contendo 5% de glicose a 4 ml/kg por hora. A temperatura corporal foi monitorada continuamente por sonda esofágica e mantida entre 38-39°C com mantas térmicas elétricas. Também foi realizada oximetria de pulso contínua.

Os coelhos foram manuseados com cuidado para minimizar seu desconforto, sofrimento e dor, em conformidade com o Guia de Tratamento e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo *National Institutes of Health* dos EUA (Publicação n. 85-23 do NIH, revisão de 2011). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (Protocolo n. 795).

Indução da lesão pulmonar

A lesão pulmonar foi induzida por meio de lavagem com surfactante.^(26,29) Resumidamente, foram realizadas seis lavagens pulmonares sucessivas com alíquotas de 30 ml/kg de salina aquecida (37-38°C) passadas pela cânula traqueal a uma pressão máxima de 30 cmH₂O, por 60 s, a cada 3-5 min. A drenagem do líquido foi obtida por gravidade, por movimentos externos de compressão

torácica e por sucção suave. Após a estabilização, foram obtidas amostras de sangue arterial para gasometria para verificar se os animais estavam hipoxêmicos (relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg em duas análises, com intervalo de 15 min entre elas). Se os animais ainda não estivessem hipoxêmicos, eram realizadas duas lavagens adicionais de forma sequencial, sendo que novas gasometrias eram realizadas 10 min após, e assim por diante, até que a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ atingisse o valor desejado. Após outro período de estabilização, os animais receberam duas insuflações sustentadas de 30 s com Pmédia de 30 cmH_2O , uma manobra dinâmica para promover o recrutamento pulmonar e normalizar o histórico do volume.⁽³⁰⁾

Grupos experimentais

Utilizando o programa *Research Randomizer* (disponível em <http://www.randomizer.org>), dividimos os coelhos aleatoriamente em dois grupos: LPA+VOAF em posição supina (grupo PS, n = 15); e LPA+VOAF em posição prona (grupo PP, n = 15). No início do período experimental, ventilamos os animais de ambos os grupos com um ventilador SensorMedics 3100A (CareFusion, Yorba Linda, CA, EUA), utilizando os seguintes parâmetros: Pmédia de 16 cmH_2O ; frequência oscilatória de 10 Hz; tempo inspiratório de 33% do ciclo respiratório; e amplitude de pressão inicial de 20 cmH_2O . A amplitude de pressão foi modificada para atingir a faixa de PaCO_2 desejada (40–45 mmHg). Em ambos os grupos, a FiO_2 foi mantida em 1,0 durante todo o experimento.

Após um período de estabilização de 15 min, os animais foram movidos para a posição prona ou mantidos na posição supina, de acordo com a randomização. Esse momento foi denominado tempo zero (T_0) do protocolo experimental. No 30º min, 60º

min e 90º min após o início do protocolo (T_{30r} , T_{60r} e T_{90r} , respectivamente), a Pmédia foi reduzida para 14, 12 e 10 cmH_2O , respectivamente, para evitar instabilidade hemodinâmica. No 120º min (T_{120r}), todos os animais foram colocados ou permaneceram na posição supina e foram ventilados por mais 30 min (isto é, até T_{150r}). Amostras de sangue arterial para gasometria foram obtidas antes e depois da indução da lesão pulmonar e a cada 30 min durante todo o período de observação de 150 min. Foram realizadas gasometrias nos momentos correspondentes (basal, ALI confirmada, T_{30r} , T_{60r} , T_{90r} , T_{120r} e T_{150r}), como mostra a Figura 1.

Em concordância com outros estudos utilizando metodologia semelhante, optamos por incluir 15 animais em cada grupo.^(26,29) Os coelhos que morreram antes de T_{150r} foram substituídos. Durante o período experimental, os grupos foram comparados com relação à pressão arterial média (para avaliar a estabilidade hemodinâmica), a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e o índice de oxigenação — $[\text{FiO}_2 \times \text{Pmédia}] / \text{PaO}_2 \times 100$ — expresso em $\text{cmH}_2\text{O}/\text{mmHg}$. No T_{150r} , os coelhos foram sacrificados por meio da administração de altas doses intravenosas de cetamina e xilazina. Os seguintes desfechos foram então avaliados: concentrações de malondialdeído (peroxidação lipídica) para a quantificação do estresse oxidativo no tecido pulmonar ventral e dorsal; proporções de neutrófilos no lavado broncoalveolar; níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar para a quantificação da inflamação pulmonar; e análise histopatológica para quantificação do dano no tecido pulmonar.

Coleta de tecidos

O pulmão direito foi dissecado e armazenado para análise do estresse oxidativo, e o pulmão esquerdo foi dissecado para o lavado broncoalveolar. As amostras

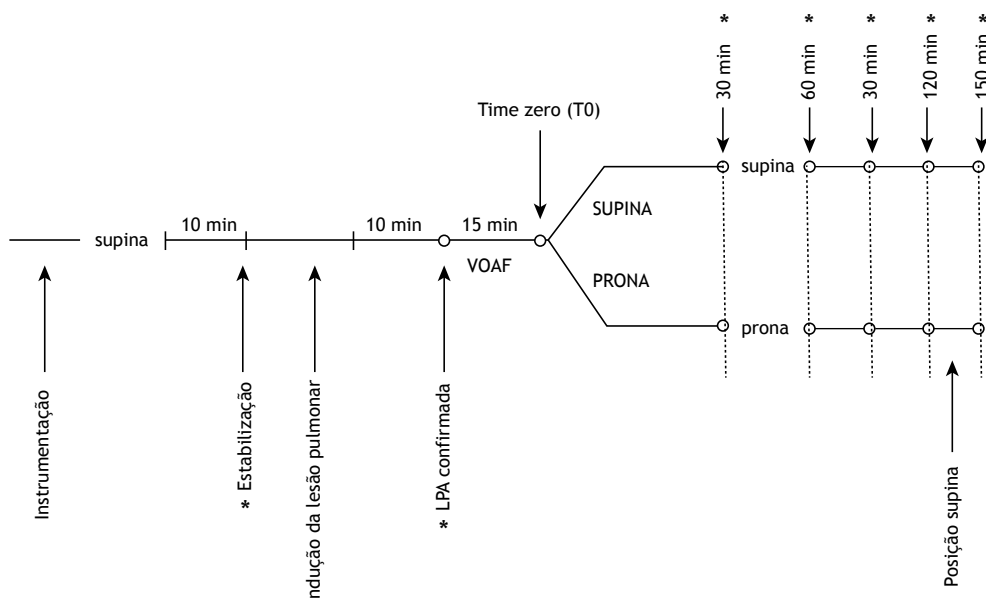


Figura 1. Delineamento do protocolo experimental. LPA: lesão pulmonar aguda; e VOAF: ventilação oscilatória de alta frequência. *Gasometria arterial.

de tecido para estudo do estresse oxidativo foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a análise, conforme descrito anteriormente.^(26,27)

Lavagem broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi coletado, e as células foram contadas em um hemocítmetro. A diferenciação celular foi realizada com o uso de coloração do tipo Romanowsky (Panótico Rápido; Laborclin, Pinhais, Brasil), e foi avaliada a proporção de neutrófilos.

Mensuração de TNF- α

Os níveis de TNF- α foram medidos no lavado broncoalveolar e nos homogeneizados de tecido pulmonar por técnica de radioimunoensaio, conforme já relatado.⁽³¹⁾ Os padrões utilizados foram um antissoro específico para TNF- α humano (Caltag Laboratories, South San Francisco, CA, EUA) na diluição de 1:100.000; TNF- α humano radiomarcado (New England Nuclear, Boston, MA, EUA); e TNF- α humano purificado (Collaborative Research, Bedford, MA, EUA).

MENSURAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As concentrações de malondialdeído, um marcador de dano oxidativo lipídico, foram medidas nos homogeneizados de tecido pelo método elaborado por Esterbauer e Cheeseman.⁽³²⁾ Os tecidos pulmonares foram homogeneizados em tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a $3.000 \times g$ a 4°C por 10 min. O sobrenadante (200 μl) foi separado e misturado com uma solução contendo metanol e N-metil-2-fenilindol (10,3 mM) em acetônitrila (650 μl ; Oxis International, Portland, OR, EUA). A solução foi acidificada com ácido clorídrico a 37% (150 μl) e incubada a 45°C por 60 min. As amostras foram novamente centrifugadas, conforme descrito acima, para dissolver qualquer precipitado formado durante a incubação. A absorvância foi medida com um espectrofotômetro (DU 650; Beckman Coulter, Carlsbad, CA, EUA) a 586 nm, contra curvas padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano e de diacetil 4-hidroxi-nonenal (Oxis International). As medidas do tecido pulmonar foram indexadas ao conteúdo proteico do tecido pulmonar.

Análise histopatológica

Os pulmões foram preenchidos com formalina tamponada a 10% por gravidade (a uma pressão máxima de 30 cmH_2O) para a preservação da arquitetura alveolar. No mínimo 48 h após a fixação, os fragmentos foram incluídos em parafina. Os cortes axiais de pulmão foram realizados, corados com H&E e examinados por dois patologistas que estavam cegados quanto aos grupos e que trabalharam de forma independente. Para cada lâmina, selecionamos aleatoriamente dez campos microscópicos para exame, realizando assim 20 testes por animal. O dano histológico pulmonar foi

quantificado por um escore incluindo sete variáveis: inflamação alveolar, inflamação intersticial, hemorragia alveolar, hemorragia intersticial, edema, atelectasia e necrose. Para cada uma dessas sete variáveis, a gravidade foi classificada da seguinte forma: 0 = sem lesão, 1 = lesão em 25% do campo, 2 = lesão em 50% do campo, 3 = lesão em 75% do campo e 4 = lesão difusa. Portanto, a pontuação máxima possível era 28.⁽³³⁾

Análise estatística

Os dados foram analisados no SigmaPlot, versão 11.0 para Windows (Systat Software, San Jose, CA, EUA). Os dados com distribuição normal foram comparados entre os grupos para os mesmos momentos por meio do teste t ou entre os momentos por meio de *one-way* ANOVA de Kruskal-Wallis e expressos em média \pm desvio-padrão. Os dados com distribuição não normal foram comparados por meio do teste de soma de postos de Mann-Whitney e expressos em mediana (variação). As comparações intragrupo nos diferentes momentos foram realizadas utilizando ANOVA para medidas repetidas de Friedman por postos, sendo que todos os procedimentos de comparação múltipla entre pares foram realizados por meio do teste de Dunn. As tabelas de contingência dos dados categóricos foram comparadas por meio do teste exato de Fisher. As análises teciduais entre grupos e regiões de lesão pulmonar foram realizadas utilizando *two-way* ANOVA. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos quanto a peso corporal ($p = 0,50$) e número de lavagens necessárias para indução da LPA ($p = 0,75$). A proporção de líquido recuperado dos pulmões lavados foi de 85,7% e 86,2% nos grupos PP e PS, respectivamente ($p = 0,49$).

Não houve diferença estatística na pressão arterial média entre os dois grupos. Os animais de ambos os grupos estavam hemodinamicamente estáveis, sendo que a pressão arterial média permaneceu acima de 50 mmHg em razão da infusão contínua de norepinefrina, sem diferenças entre os grupos PS e PP quanto à mediana do escore vasoativo-inotrópico, que foi de 50 (variação: 0-70) e 50 (variação: 0-50), respectivamente ($p = 0,27$). Houve três mortes durante o período experimental, todas no grupo PS.

Após as lavagens, houve hipoxemia significativa, diminuição da complacência do sistema respiratório e aumento da Pmédia nos animais de ambos os grupos (Tabela 1), sendo então confirmado o sucesso da indução da LPA. No T_{30} , ambos os grupos apresentaram melhora significativa da oxigenação, com índices de oxigenação semelhantes aos observados no momento basal, sendo que esses índices permaneceram estáveis até T_{150} (Figura 2).

As concentrações medianas de malondialdeído não foram diferentes entre os grupos PP e PS, tanto

Tabela 1. Índices de oxigenação, mecânica pulmonar e dados hemodinâmicos basais e após a indução da lesão pulmonar.^a

Parâmetros	Grupo			
	Posição supina		Posição prona	
	Basal	Pós-indução	Basal	Pós-indução
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	447,6 (364,18-492,75)	72,1 (52,08-86,18)*	481,7 (428,37-493,88)	64,5 (48,25-81,88)*
IO ^b (cmH ₂ O/mmHg)	1,5 (1,41-2,06)	13,7 (11,21-21,15)*	1,44 (1,38-1,74)	14,7 (11,8-21,26)*
Csr (ml/cmH ₂ O)	3,3 (3,1-3,68)	1,2 (1,0-1,3)*	3,8 (2,83-4,4)	1,2 (1,0-1,38)*
Pmédia (cmH ₂ O)	7,0 (6,9-7,1)	10,0 (9,5-11,0)*	7,04 ± 0,5	9,75 ± 0,63*

IO: índice de oxigenação; Csr: complacência do sistema respiratório; e Pmédia: pressão média das vias aéreas. ^aResultados expressos em média ± dp para dados com distribuição normal e em mediana (variação) para dados com distribuição não normal. ^bCalculado como $[FiO_2 \times Pm\u00e9dia] / PaO_2 \times 100$. *p < 0,05 vs. pós-indução; one-way ANOVA de Kruskal-Wallis para dados com distribuição normal e teste de soma de postos de Mann-Whitney para dados com distribuição não normal.

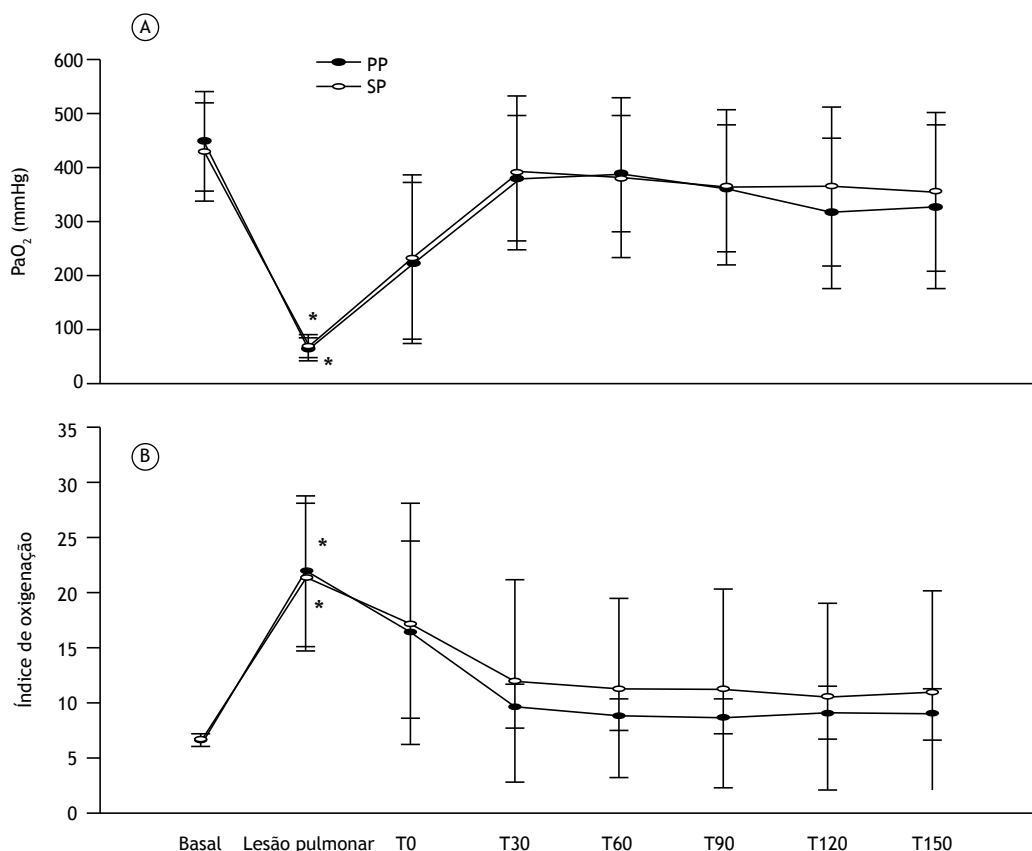


Figura 2. PaO₂ e índice de oxigenação^a ao longo do tempo (A e B, respectivamente) nos grupos experimentais.^b PP: grupo posição prona (ovais cheios); SP: grupo posição supina (ovais vazados); T₀: tempo zero; T₃₀: 30 min; T₆₀: 60 min; T₉₀: 90 min; T₁₂₀: 120 min; e T₁₅₀: 150 min. ^aCalculado como $[FiO_2 \times Pm\u00e9dia] / PaO_2 \times 100$. ^bValores expressos em média ± dp. *p ≤ 0,05 vs. basal.

medidas em amostras de tecido pulmonar ventral — 8,2 nm (variação: 7,7-11,4 nm) e 8,7 nm (variação: 5,7-13,6 nm), respectivamente (p = 0,62) — quanto em amostras de tecido pulmonar dorsal — 7,4 nm (variação: 5,9-0,8 nm) e 8,1 nm (variação: 7,1-9,5 nm), respectivamente (p = 0,62). A proporção média de neutrófilos no lavado broncoalveolar foi menor no grupo PP que no grupo PS (16 ± 14 vs. 25 ± 18), embora a diferença não tenha sido significativa (p = 0,76). No entanto, os níveis de TNF-α no lavado broncoalveolar foram significativamente menores no grupo PP que no grupo PS (Figura 3), e essa diferença

foi maior nas amostras de tecido pulmonar dorsal. O escore histológico de lesão pulmonar também foi significativamente menor no grupo PP que no grupo PS (Figura 4).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo apoiam os de estudos anteriores, a saber, que a VOAF, por si só, melhora a oxigenação e tem efeito protetor contra a lesão pulmonar histológica e inflamatória. Além disso, quando a VOAF foi combinada à posição prona neste modelo animal de

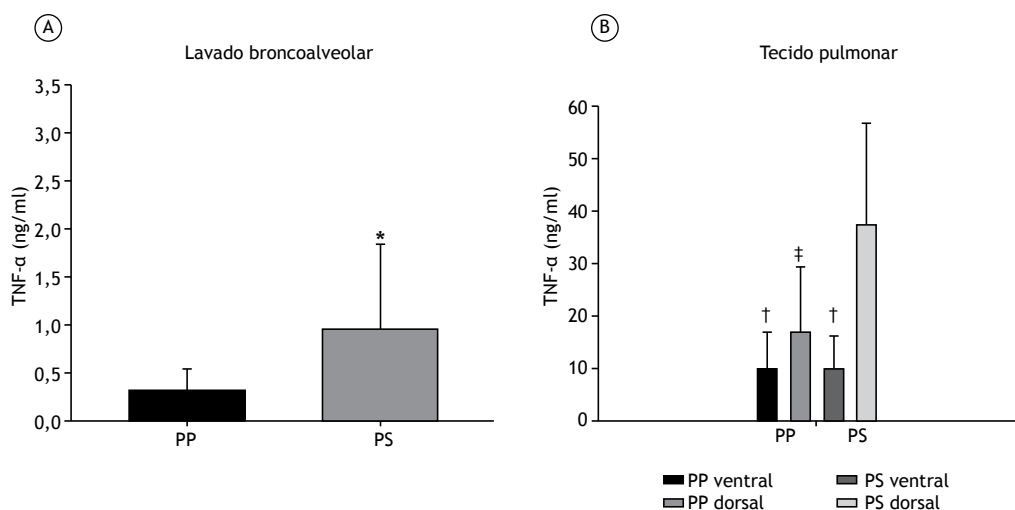


Figura 3. Níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar (A e B, respectivamente).^a Em B, comparam-se amostras de tecido pulmonar ventral e dorsal nos grupos posição prona (PP) e posição supina (PS). ^aValores expressos em média \pm dp. * $p \leq 0,05$ vs. grupo PP. † $p > 0,05$ vs. tecido pulmonar dorsal no grupo PP. ‡ $p \leq 0,05$ vs. tecido pulmonar dorsal no grupo PS.

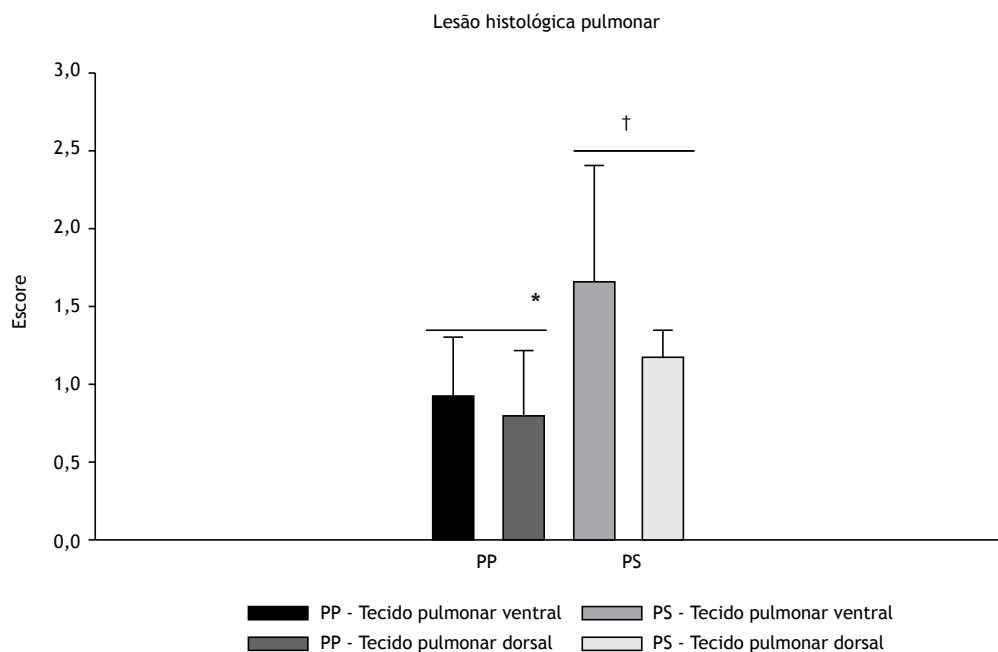


Figura 4. Escores histológicos de lesão pulmonar nos grupos posição prona (PP) e posição supina (PS), incluindo comparações entre escores para amostras de tecido pulmonar ventral e dorsal.^{a,*} ^aValores expressos em mediana (variação). * $p < 0,05$ vs. tecido pulmonar ventral (teste de soma de postos de Mann-Whitney). † $p < 0,05$ vs. grupo PP (teste de soma de postos de Mann-Whitney). ‡ $p > 0,05$ para interações entre regiões pulmonares e posição (ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn).

LPA, observamos melhor proteção contra a resposta inflamatória, avaliada pela determinação dos níveis de TNF- α , bem como menores escores histológicos de lesão. Apesar do menor número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar no grupo PP, a diferença em comparação ao grupo PS não foi significativa.

Sabe-se há décadas que a posição prona melhora a oxigenação em modelos animais de lesão pulmonar e em pacientes com SDRA grave. Os mecanismos dessa

melhora incluem um gradiente de pressão pleural mais uniforme e menos compressão do pulmão pelo coração, bem como uma distribuição mais uniforme e uma melhor combinação entre ventilação e perfusão.⁽³⁴⁾ Além desses efeitos fisiológicos, constatamos que, na posição prona, houve alterações estruturais nos pulmões; isto é, as áreas pulmonares dorsais foram preservadas quanto à lesão histológica e inflamatória.

Um estudo anterior realizado por nosso grupo mostrou que a VOAF desempenha um importante papel protetor na LPA, melhorando a oxigenação, minimizando os processos inflamatórios, reduzindo o dano histológico e atenuando a lesão pulmonar oxidativa, mostrando-se superior à VMC protetora nesses aspectos.⁽²⁹⁾ Da mesma forma, um estudo conduzido por Liu et al.⁽³⁵⁾ mostrou que a VOAF a uma frequência oscilatória relativamente alta atenuou a lesão pulmonar em um modelo ovino de SDRA. Naquele estudo, a VOAF a uma frequência oscilatória de 9 Hz minimizou o estresse pulmonar e o V_T , resultando em menos lesão pulmonar e menores níveis de mediadores inflamatórios que os observados quando se empregou a VOAF a uma frequência oscilatória de 3 Hz ou a VMC.

Em um estudo clínico prospectivo aleatório envolvendo pacientes com SDRA,⁽³⁶⁾ os autores analisaram a oxigenação por meio do cálculo da relação PaO_2/FiO_2 e do índice de oxigenação, analisando a inflamação pulmonar por meio da determinação dos níveis de citocinas no soro e no lavado broncoalveolar, bem como por meio da citologia do lavado broncoalveolar. Os autores concluíram que a posição prona durante a VMC ou a VOAF melhorou a oxigenação em comparação à posição supina durante toda a VOAF. Além disso, constataram que a posição prona durante a VOAF reduziu os níveis séricos de IL-8 e a proporção de neutrófilos no lavado broncoalveolar, indicando diminuição da inflamação pulmonar. Tais dados foram confirmados por nossos achados, que mostraram que, no tecido pulmonar dorsal, a resposta inflamatória, avaliada por meio da determinação dos níveis de TNF- α , foi menos pronunciada no grupo PP que no grupo PS.

No presente estudo, a proporção de neutrófilos no lavado broncoalveolar não foi significativamente diferente entre os dois grupos, embora tenha havido uma tendência a valores menores no grupo PP. É possível que a proporção de neutrófilos tenha sido maior no grupo PS em razão do maior dano ocorrido no tecido pulmonar dorsal durante a indução da LPA. Isso sugere que a posição prona foi protetora contra a lesão inflamatória pulmonar. O fato de que nossos achados não atingiram significância estatística provavelmente deveu-se ao curto período de VM. Com relação à avaliação da inflamação pulmonar, constatamos que os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar foram menores, provavelmente indicando menos lesão inflamatória, no grupo PP que no grupo PS, assim como os níveis de TNF- α nos homogeneizados de tecido pulmonar das regiões ventral e dorsal. No entanto, os valores de TNF- α para as regiões ventral e dorsal foram comparáveis no grupo PP. Resultados semelhantes foram observados por Fu et al.,⁽³⁷⁾ que induziram LPA em leitões recém-nascidos que foram ventilados subsequentemente por 24 h. Os autores observaram que, entre os leitões com LPA, a lesão histológica

pulmonar foi mais grave na região dependente da gravidade que na região não dependente da gravidade, e também que diferentes estratégias de ventilação resultaram em diferentes efeitos sobre os pulmões lesionados. Apesar de melhorar a oxigenação, a VOAF com uma estratégia de alto volume pulmonar, quando comparada à VMC, mostrou causar maior atenuação da lesão pulmonar ao reduzir a infiltração pulmonar por células polimorfonucleares, a hemorragia, o edema alveolar e a formação de membranas hialinas.⁽³⁷⁾

Em um estudo envolvendo pacientes com pneumonia grave adquirida na comunidade e SDRA em VMC protetora, Chan et al.⁽³⁸⁾ mostraram que a oxigenação foi melhor e os níveis de IL-6 foram significativamente menores nos pacientes ventilados em posição prona que nos ventilados em posição supina. De forma semelhante, em um estudo inicial sobre SDRA, Rival et al.⁽³⁹⁾ constataram que a manobra de recrutamento e a posição prona provavelmente têm efeitos combinados, bem como mostraram que a manobra de recrutamento provavelmente causou maior melhora na PaO_2 quando os pacientes estavam em posição prona, especialmente se eles permaneceram nessa posição por um longo período de tempo.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Uma é o fato de se tratar de um estudo experimental, já que modelos animais não podem replicar todas as características da LPA/SDRA em humanos.⁽⁴⁰⁾ Além disso, em razão do risco de instabilidade hemodinâmica, o tempo de ventilação é limitado em modelos de LPA em coelhos. No presente estudo, os coelhos foram ventilados por apenas duas horas, e, portanto, foi difícil aplicar a VOAF e o tempo em posição prona ideais para atingir o efeito anti-inflamatório e diminuir a lesão. Ademais, avaliamos a posição prona apenas durante a VOAF. São necessários estudos mais longos envolvendo grupos de animais saudáveis e não ventilados (controles) e grupos de animais ventilados com VMC, bem como estudos clínicos avaliando desfechos em pacientes tratados com essas estratégias combinadas.

Em conclusão, nossos achados corroboram os de estudos anteriores que mostraram que a VOAF melhora a oxigenação e tem efeito protetor contra a resposta inflamatória e o dano histológico pulmonar em modelos de lesão pulmonar. Além disso, nossos dados enfatizam o importante papel protetor da posição prona. Neste modelo de LPA em coelhos submetidos subsequentemente a VOAF, em que comparamos regiões pulmonares dependentes e não dependentes da gravidade, a posição prona minimizou os processos inflamatórios e o dano histológico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à equipe do Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Universidade Estadual Paulista (UNESP) sua assistência.

REFERÊNCIAS

1. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
2. MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury. *Curr*

- Opin Crit Care. 2005;11(1):43-9. <https://doi.org/10.1097/00075198-200502000-00007>
3. de Hemptinne Q, Rimmelink M, Brimioules S, Salmon I, Vincent JL. ARDS: a clinicopathological confrontation. *Chest*. 2009;135(4):944-949. <https://doi.org/10.1378/chest.08-1741>
 4. Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(8):683-93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022450>
 5. Cheung AM, Tansey CM, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Matté A, Barr A, et al. Two-year outcomes, health care use, and costs of survivors of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(5):538-44. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-6930C>
 6. Fioretto JR, Batista KA, Carpi MF, Bonatto RC, Moraes MA, Ricchetti SM, 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(8):809-16. <https://doi.org/10.1002/ppul.21452>
 7. Amato MB, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa EL, Schoenfeld DA, et al. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2015;372(8):747-55. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1410639>
 8. Turner DA, Arnold JH. Insights in pediatric ventilation: timing of intubation, ventilatory strategies, and weaning. *Curr Opin Crit Care*. 2007;13(1):57-63. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32801297f9>
 9. Girard TD, Bernard GR. Mechanical ventilation in ARDS: a state-of-the-art review. *Chest*. 2007;131(3):921-929. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1515>
 10. Fioretto JR, Rebello CM. High-frequency oscillatory ventilation in pediatrics and neonatology. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2009;21(1):96-103. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2009000100014>
 11. Chan KP, Stewart TE, Mehta S. High-frequency oscillatory ventilation for adult patients with ARDS. *Chest*. 2007;131(6):1907-16. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1549>
 12. Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH, Mehta S, Hand L, Austin P, et al. High-frequency oscillation in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368(9):795-805. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215554>
 13. Meade MO, Young D, Hanna S, Zhou Q, Bachman TE, Bollen C, et al. Severity of Hypoxemia and Effect of High-Frequency Oscillatory Ventilation in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(6):727-733. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1938OC>
 14. Goligher EC, Munshi L, Adhikari NKJ, Meade MO, Hodgson CL, Wunsch H, et al. High-Frequency Oscillation for Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(Supplement_4):S289-S296.
 15. Cakar N, der Kloot TV, Youngblood M, Adams A, Nahum A. Oxygenation response to a recruitment maneuver during supine and prone positions in an oleic acid-induced lung injury model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(6):1949-56. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.6.9907113>
 16. Pelosi P, Brazzi L, Gattinoni L. Prone position in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 2002;20(4):1017-28. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00401702>
 17. Richard JC, Janier M, Lavenne F, Berthier V, Lebars D, Annat G, et al. Effect of position, nitric oxide, and almitrine on lung perfusion in a porcine model of acute lung injury. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(6):2181-91. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00313.2002>
 18. Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, Vicardi P, Crotti S, Valenza F, et al. Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):387-93. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.2.97-04023>
 19. Galiatsou E, Kostanti E, Svarna E, Kitsakos A, Koulouras V, Efremidis SC, et al. Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(2):187-97. <https://doi.org/10.1164/rccm.200506-899OC>
 20. Gattinoni L, Protti A. Ventilation in the prone position: for some but not for all? *CMAJ*. 2008;178(9):1174-6. <https://doi.org/10.1503/cmaj.080359>
 21. Albert RK, Hubmayr RD. The prone position eliminates compression of the lungs by the heart. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1660-5. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.5.9901037>
 22. Gillart T, Bazin JE, Guelon D, Constantin JM, Mansoor O, Conio N, et al. Effect of bronchial drainage on the improvement in gas exchange observed in ventral decubitus in ARDS [Article in French]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2000;19(3):156-63. [https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(00\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0750-7658(00)00199-4)
 23. Guérin C, Reigner J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368(23):2159-68. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214103>
 24. Sud S, Friederich JO, Adhikari NK, Taccone P, Mancebo J, Polli F, 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(10):E381-90. <https://doi.org/10.1503/cmaj.140081>
 25. Brederlau J, Muellenbach R, Kredel M, Greim C, Roewer N. High frequency oscillatory ventilation and prone positioning in a porcine model of lavage-induced acute lung injury. *BMC Anesthesiol*. 2006;6:4. <https://doi.org/10.1186/1471-2253-6-4>
 26. Ronchi CF, Fioretto JR, Ferreira AL, Berchieri-Ronchi CB, Correa CR, Kurokawa CS, et al. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(7):1184-90. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01334.2011>
 27. Ronchi CF, Ferreira AL, Campos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, et al. Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide and oxidative stress in acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014;190:118-23. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.10.008>
 28. Gaies MG, Gurney JG, Yen AH, Napoli ML, Gajarski RJ, Ohye RG, et al. Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(2):234-8. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181b806fc>
 29. Ronchi CF, dos Anjos Ferreira AL, Campos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, de Moraes MA, et al. High-frequency oscillatory ventilation attenuates oxidative lung injury in a rabbit model of acute lung injury. *Exp Biol Med* (Maywood). 2011;236(10):1188-96. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011085>
 30. McCulloch PR, Forkert PG, Froese AB. Lung volume maintenance prevents lung injury during high frequency oscillatory ventilation in surfactant-deficient rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(5):1185-92. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.5.1185>
 31. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodt T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1333-46. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.4.9810071>
 32. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
 33. Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care*. 1999;14(2):84-92. [https://doi.org/10.1016/S0883-9441\(99\)90019-9](https://doi.org/10.1016/S0883-9441(99)90019-9)
 34. Fessler HE, Talmor DS. Should prone positioning be routinely used for lung protection during mechanical ventilation? *Respir Care*. 2010;55(1):88-99.
 35. Liu S, Yi Y, Wang M, Chen Q, Huang Y, Liu L, et al. Higher frequency ventilation attenuates lung injury during high-frequency oscillatory ventilation in sheep models of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2013;119(2):398-411. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31829419a6>
 36. Papazian L, Gannier M, Marin V, Donati S, Arnal JM, Demory D, et al. Comparison of prone positioning and high-frequency oscillatory ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005;33(10):2162-71. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000181298.05474.2B>
 37. Fu W, Qin X, You C, Meng Q, Zhao Y, Zhang Y. High frequency oscillatory ventilation versus conventional ventilation in a newborn piglet model with acute lung injury. *Respir Care*. 2013;58(5):824-30.
 38. Chan MC, Hsu JY, Liu HH, Lee YL, Pong SC, Chang LY, et al. Effects of prone position on inflammatory markers in patients with ARDS due to community-acquired pneumonia. *J Formos Med Assoc*. 2007;106(9):708-16. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60032-7](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60032-7)
 39. Rival G, Patry C, Floret N, Navellou JC, Belle E, Capellier G. Prone position and recruitment manoeuvre: the combined effect improves oxygenation. *Crit Care*. 2011;15(3):R125. <https://doi.org/10.1186/cc10235>
 40. Wang HM, Bodenstern M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 2008;40(4):305-16. <https://doi.org/10.1159/000121471>