

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**AYDRA MENDES ALMEIDA BIANCHI**

**EFEITOS DA VENTILAÇÃO EM POSIÇÃO PRONA NA LESÃO PULMONAR  
AGUDA LEVE INDUZIDA POR INJEÇÃO DE LIPOPOLYSACCHARIDE  
INTRAPERITONEAL EM RATOS WISTAR**

**JUIZ DE FORA**  
**2015**

**AYDRA MENDES ALMEIDA BIANCHI**

**EFEITOS DA VENTILAÇÃO EM POSIÇÃO PRONA NA LESÃO PULMONAR  
AGUDA LEVE INDUZIDA POR INJEÇÃO DE LIPOPOLYSACCHARIDE  
INTRAPERITONEAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo

**JUIZ DE FORA**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes Almeida Bianchi, Aydra.  
EFEITOS DA VENTILAÇÃO EM POSIÇÃO PRONA NA LESÃO PULMONAR AGUDA LEVE INDUZIDA POR INJEÇÃO DE LIPOPOLYSACCHARIDE INTRAPERITONEAL EM RATOS WISTAR / Aydra Mendes Almeida Bianchi. -- 2015.  
87 p. : il.

Orientador: Bruno do Valle Pinheiro  
Coorientador: Maycon de Moura Reboredo  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2015.

1. Síndrome do desconforto respiratório agudo. 2. Lesão pulmonar aguda. 3. Posição prona. 4. Lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica. 5. lipopolissacarídeos. I. do Valle Pinheiro, Bruno, orient. II. de Moura Reboredo, Maycon, coorient. III. Título.

**AYDRA MENDES ALMEIDA BIANCHI**

**EFEITOS DA VENTILAÇÃO EM POSIÇÃO PRONA NA LESÃO PULMONAR  
AGUDA LEVE INDUZIDA POR INJEÇÃO DE LIPOPOLYSACCHARIDE  
INTRAPERITONEAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovado em: 09 /março/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro – Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Rodrigo Russo  
Universidade Federal de São João del-Rei

---

Prof. Dr. Fábio Heleno Pace  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela existência e por sempre iluminar o meu caminho.

Ao meu companheiro Franco, pelo incentivo e pela cumplicidade nestes 24 anos de convivência. Seu apoio foi essencial para esta conquista.

Ao meu filho Gustavo, por sua existência e pelo amor incondicional.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro, pela oportunidade de ser sua aluna, pela paciência, pela capacidade de conduzir esta pesquisa com sabedoria e serenidade, tornando este sonho uma realidade. Por ter dado o primeiro passo para o desenvolvimento de estudos na linha de ventilação mecânica, mesmo sabendo das limitações, sempre se mostrou entusiasmado com a possibilidade de crescermos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo, pela dedicação, sugestões e por ser responsável pela minha introdução no trabalho experimental.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda pela competência e por ensinamentos práticos sobre o trabalho experimental, essenciais para a conclusão desta dissertação.

Ao Professor Doutor Júlio César Abreu de Oliveira, responsável pelo Serviço de Pneumologia, pela disponibilidade de manter as portas do serviço abertas, acreditando no ensino e na pesquisa.

A Maria Aparecida Esteves Rabelo pela grande ajuda com sua experiência em patologia.

Aos amigos Fernando Fonseca Reis e Lídia Maria Carneiro da Fonseca pela oportunidade de trabalho, pelo incentivo e grande contribuição durante as dificuldades enfrentadas neste percurso.

Aos colegas do núcleo de pesquisa pela oportunidade de convivência e pelo aprendizado durante as nossas reuniões.

Ao Prof. Dr. José Ángel Lorente pela contribuição com toda a sua experiência, generosidade e carinho, foi capaz de nos estender as mãos com sugestões e incentivos indispensáveis.

Aos acadêmicos do núcleo em especial, Joana e Manfrine, que puderam acompanhar bem de perto o desenvolvimento deste estudo.

Aos integrantes do Centro de biologia da reprodução que atuaram com organização, competência e de forma humana na realização dos experimentos.

Aos meus Pais e meus irmãos que sempre, me apoiaram e me incentivaram.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

À Rede Mineira TOXIFAR, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Programa de Apoio ao Recém-doutor/Propesq/UFJF (2013/2014) pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente estará fazendo impossível.”*

*São Francisco Assis*

## RESUMO

**Introdução:** A posição prona tem sido estudada como estratégia ventilatória em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo. Seus benefícios, inclusive com redução da mortalidade, estão bem estabelecidos nas formas graves da síndrome, mas não em formas mais leves. **Objetivo:** Investigar o efeito da posição prona nas trocas gasosas, inflamação e histologia pulmonar, em modelo experimental de lesão pulmonar aguda leve em ratos. **Métodos:** A lesão pulmonar aguda foi induzida em ratos Wistar, machos, adultos, através da injeção de lipopolissacarídeo da *Escherichia coli* (5 mg/Kg). Após 24 h, os animais com PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> entre 200 e 300 mmHg foram anestesiados e randomizados dentro de 2 grupos de acordo com a sua posição durante a ventilação (prona [n=6] e supina [n=6]). Ambos os grupos foram comparados com um grupo controle [n=5] que recebeu solução salina a 0,9% intraperitoneal e foi ventilado em posição supina. Todos os grupos foram ventilados por 1 h em modo ventilatório volume-controlado, com volume corrente de 6 ml/Kg, frequência respiratória de 80 irpm, pressão positiva ao final da expiração de 5 cmH<sub>2</sub>O e uma fração inspirada de oxigênio de 1. **Resultados:** O escore de lesão pulmonar foi significativamente maior no grupo LPS-supino, em comparação com os grupos LPS-prono e controle (0,32 ± 0,03; 0,17 ± 0,03 e 0,13 ± 0,04, respectivamente) (p < 0,001), devido a uma maior infiltração de neutrófilos no espaço intersticial e maior presença de debris proteicos na luz alveolar. Esta maior lesão pulmonar no grupo LPS-supino foi observada tanto nas regiões pulmonares dependentes da gravidade (dorsal no grupo supino e ventral no grupo prono – 0,34 ± 0,05 e 0,22 ± 0,04, respectivamente) (p < 0,05), quanto nas não dependentes (ventral no grupo supino e dorsal no grupo prono – 0,29 ± 0,04 e 0,13 ± 0,04, respectivamente) (p < 0,05). O contagem de neutrófilos no LBA foi maior no grupo LPS-supino, comparado com os grupos LPS prono e controle. Não houve diferenças significativas na relação peso úmido/peso seco e nas trocas gasosas entre os três grupos. **Conclusões:** Neste modelo experimental de lesão pulmonar aguda leve extrapulmonar, a ventilação em posição prona por 1 hora, quando comparada com a ventilação em posição supino, associou-se a menor lesão e inflamação pulmonar, mas sem impacto na oxigenação arterial e no edema pulmonar.



Palavras-chave: Síndrome do desconforto respiratório agudo, lesão pulmonar aguda, posição prona, lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica, lipopolissacarídeos.

## ABSTRACT

A posição prona tem sido estudada como estratégia ventilatória em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo. Seus benefícios, inclusive com redução da mortalidade, estão bem estabelecidos nas formas graves da síndrome, mas não em formas mais leves.

**Introduction:** Prone position has been studied as a ventilator strategy among patients with acute respiratory distress syndrome. The benefits of prone position ventilation, including reduction in the mortality, are well demonstrated in the severe but not in milder forms of this syndrome. We therefore investigated the effects of the prone position on arterial blood gases, lung inflammation and histology in an experimental model of mild acute lung injury in rats. **Methods:** Acute lung injury was induced in adult male Wistar rats by intraperitoneal *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection (5 mg/kg). After 24h, the animals with PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> between 200 and 300 mmHg were anesthetized and randomized into 2 groups according to their position during ventilation (prone [n=6] and supine [n=6]). Both groups were compared to a control group (n=5) that received intraperitoneal saline and was ventilated in the supine position. All of the groups were ventilated for 1h with volume-controlled ventilation mode, with tidal volume of 6 ml/kg, respiratory rate of 80 breaths/min, positive end-expiratory pressure of 5 cmH<sub>2</sub>O, and an inspired oxygen fraction of 1. **Results:** Significantly higher lung injury scores were observed in the LPS-supine group compared to LPS-prone and control groups (0.32 ± 0.03; 0.17 ± 0.03 and 0.13 ± 0.04, respectively) (p<0.001), mainly due to a higher neutrophil infiltration level in the interstitial space and more proteinaceous debris in the airspaces. Similar differences were observed when the gravitational dependent lung regions (dorsal in the supine group and ventral in the prone group – 0.34 ± 0.05 and 0.22 ± 0.04, respectively) (p < 0.05) and non-dependent lung regions (ventral in the supine group and dorsal in the prone group – 0.29 ± 0.04 and 0.13 ± 0.04, respectively) (p < 0.05) were analyzed separately. The BAL neutrophil content was also higher in the LPS-supine group compared to the LPS-prone and control groups. There were no significant differences in the wet/dry ratio and gas exchange levels among the three groups. **CONCLUSIONS:** In this experimental extrapulmonary mild acute lung injury model, prone position ventilation for 1 hour, when compared with supine position ventilation, was

associated with lower lung inflammation and injury, but without any impact on arterial oxygenation and lung edema.

Key words: acute respiratory distress syndrome, acute lung injury, prone position, Ventilator-Induced Lung Injury , lipopolysaccharides.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DEFINIÇÃO DE BERLIM PARA SDRA.....	16
TABELA 2	PRINCIPAIS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SDRA.....	18
TABELA 3	CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS CLÍNICOS EM POSIÇÃO PRONA.....	25
TABELA 4	SISTEMA DE ESCORE DE LESÃO PULMONAR.....	42

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	37
FIGURA 2	LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AECC	The American-European Consensus Conference on ARDS
CPAP	Pressão positiva contínua de via aérea
FR	Frequência Respiratória
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
HCO <sub>3</sub>	Nível de bicarbonato
I:E	Relação inspiração e expiração
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
Irpm	Incursões respiratórias por minuto
KC	Keratinocyte chemoattractant
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPIV	Lesão pulmonar induzida pela ventilação
LPS	Lipopolysaccharides <i>Escherichia coli</i>
MIF	Fator inibidor de macrófago
MIP2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
PAM	Pressão arterial média
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub>	Relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a fração inspirada de oxigênio
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PEEP	Pressão expiratória final positiva
pH	pH arterial
SF 0,9%	Solução fisiológica a 0,9%
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VM	Ventilação mecânica
V/Q	Relação ventilação/perfusão

VT	Volume corrente
W/D	Relação peso úmido/peso seco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	15
2.2	FISIOPATOLOGIA.....	17
2.3	LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA.....	20
2.4	VENTILAÇÃO MECÂNICA EM POSIÇÃO PRONA.....	23
2.5	MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDO POR <i>ESCHERICHIA COLI</i> LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).....	28
3	HIPÓTESES.....	31
4	OBJETIVOS.....	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1	ANIMAIS.....	33
5.2	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	33
5.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	34
5.3.1	PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA LESÃO PULMONAR AGUDA POR LPS.....	34
5.3.2	PREPARO DOS ANIMAIS.....	34
5.3.3	VENTILAÇÃO MECÂNICA INICIAL.....	36
5.3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
5.3.5	EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS ÓRGÃOS.....	38



6	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	39
6.1	TROCAS GASOSAS.....	39
6.2	PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM).....	39
6.3	RELAÇÃO PESO ÚMIDO/PESO SECO (W/D).....	40
6.4	LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	40
6.5	HISTOPATOLOGIA DE DANO TECIDUAL PULMONAR.....	41
6.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
7.1	RESUMO DO ARTIGO.....	45
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
9	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICES.....	57
	ANEXOS.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é caracterizada pela lesão de natureza inflamatória da barreira alvéolo-capilar, com a ocorrência de edema pulmonar (WARE; MATTHAY, 2000). O pulmão edemaciado e, portanto, com maior peso gera uma pressão sobreposta que colapsa as regiões pulmonares dorsais, ditas dependentes da gravidade, criando uma condição heterogênea, na qual os alvéolos dorsais tendem ao edema e ao colapso, enquanto os ventrais encontram-se normoaerados ou mesmo hiperdistendidos (PELOSI et al., 1994). Além disso, as bases dos pulmões são comprimidas também pelo peso do coração e pela pressão do conteúdo abdominal, o que aumenta a ocorrência de atelectasias nas regiões pulmonares dependentes. Como as regiões dependentes são mais profundas do que as não-dependentes, ocorre um grande desequilíbrio da relação ventilação/ perfusão (V/Q) nos pacientes com SDRA, resultando em hipoxemia grave (ALBERT; HUBMAYR, 2000).

A posição prona tem sido estudada como uma estratégia adequada para a ventilação de pacientes com SDRA (SUD et al., 2008). Ela reduz o gradiente de pressão transpulmonar existente na posição supina e atenua a compressão tanto do conteúdo abdominal, quanto do coração sobre o tecido pulmonar, reduzindo a extensão de área colapsada (GATTINONI et al., 2013). Por outro lado, o posicionamento do paciente em posição prona não altera a distribuição da perfusão, que permanece maior na região dorsal. O resultado final é o aumento da superfície pulmonar ventilada e a melhora da relação V/Q. Esta melhora é responsável pela redução da hipoxemia e aumento da eliminação de CO<sub>2</sub>, vistos com adoção da posição prona (RICHTER et al., 2005)

A posição prona também tem sido relacionada com a redução da lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV). Ao propiciar uma distribuição mais homogênea do gradiente de pressão transpulmonar, ela reduz as áreas de hiperinsuflação e colapso, o que resulta em menor tensão (*stress*) e deformação (*strain*) do pulmão durante a oferta volume corrente (GALIATSOU et al., 2006). Além disso, a oxigenação e a ventilação mais eficientes obtidas com a posição prona permitem a redução da fração inspirada de oxigênio (FIO<sub>2</sub>) e das pressões nas vias aéreas, reduzindo os riscos de LPIV (SINCLAIR et al., 2004; BROCCARD et al., 1999).

Atualmente a posição prona tem sido recomendada para ventilação de pacientes com SDRA grave, nos quais ela mostrou redução da mortalidade (GUÉRIN et al., 2013). Este impacto na mortalidade não foi evidenciado entre pacientes com SDRA leve ou moderada, embora eles apresentassem outros benefícios, tais como aumento da oxigenação, redução de áreas colapsadas e melhora no perfil hemodinâmico (SUD et al., 2010; GATTINONI et al., 2010a; VIEILLARD-BARON et al., 2007). Uma das hipóteses para justificar os melhores resultados da posição prona nas formas graves é que seus benefícios se devam à proteção contra LPIV, os quais talvez, sejam mais pronunciados nos pulmões mais lesados (GUÉRIN, et al., 2013).

Sendo assim, o papel da posição prona na ventilação de pacientes com formas menos graves de SDRA não está estabelecido. Além disso, a maioria dos estudos experimentais que avaliaram a influência da posição prona na LPIV também foram conduzidos em modelos de lesão pulmonar grave, e não se sabe se os mesmos benefícios ocorrem nas formas mais leves (BROCCARD et al., 1997; BROCCARD et al., 2000).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da posição prona na inflamação pulmonar e nos parâmetros fisiológicos em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA) leve extrapulmonar. Além disso, os efeitos da posição prona na lesão pulmonar em diferentes regiões dos pulmões, tanto nas não dependentes da gravidade, quanto nas dependentes, também foram estudados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma condição grave de insuficiência respiratória aguda hipoxêmica, decorrente da lesão, de natureza inflamatória, da membrana alvéolo-capilar. Esta lesão determina o acúmulo de edema intersticial e alveolar, rico em proteínas e células inflamatórias, além de disfunção do sistema surfactante, que favorece o colapso alveolar, com consequente redução das unidades alveolares aeradas. Clínica e fisiologicamente, a SDRA se caracteriza por hipoxemia, opacidades bilaterais na radiografia de tórax, aumento do shunt, do espaço morto e redução da complacência pulmonar. Morfologicamente, os achados típicos são de dano alveolar difuso, com áreas de edema, inflamação, hemorragia e membrana hialina (WARE et al., 2000; VILLAR et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011).

A SDRA foi descrita inicialmente por Ashbaugh et al. (1967), em 12 pacientes com hipoxemia refratária, complacência pulmonar reduzida e infiltrados pulmonares difusos à radiografia de tórax (ASHBAUGH et al., 1967). Desde então, múltiplas definições de trabalho foram propostas e utilizadas com o objetivo de facilitar a identificação destes pacientes na prática clínica e a condução e interpretação de estudos, tais como o Escore de Lesão Pulmonar (MURRAY et al., 1988) e a definição da Conferência Americana-Europeia (*The American-European Consensus Conference on ARDS – AECC –1994*) (BERNARD et al., 1994).

Em 2012, foram propostos novos critérios diagnósticos para SDRA, criando-se a Definição de Berlim para a síndrome, que é a atualmente utilizada. Nesta definição são considerados os seguintes critérios: natureza aguda da lesão, imagem radiológica, origem do edema e nível de hipoxemia (Tabela 1) (RANIERI et al., 2012).

Tabela 1. Definição de Berlim para SDRA

Critérios	Níveis de gravidade da SDRA		
	Leve	Moderada	Grave
Tempo	Início dos sintomas dentro de 7 dias de um insulto clínico conhecido, ou piora de sintomas existentes na última semana.		
Radiologia	Opacidades bilaterais compatíveis com edema, vistas à radiografia ou tomografia computadorizada, que não podem ser explicadas por derrame pleural, colapso lobar ou pulmonar ou por nódulos pulmonares.		
Origem do edema	Não explicado por falência cardíaca ou sobrecarga de volume. Na ausência de fator de risco para SDRA, requer-se avaliação objetiva (ex. ecocardiograma) para afastar edema pulmonar hidrostático.		
Oxigenação ( $PaO_2/FIO_2$ )	201 – 300 mmHg Com PEEP ou CPAP $\geq 5$ cmH <sub>2</sub> O	101 – 200 mmHg Com PEEP $\geq 5$ cmH <sub>2</sub> O	$\leq 100$ mmHg Com PEEP $\geq 5$ cmH <sub>2</sub> O

$PaO_2/FIO_2$ : Relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a fração inspirada de oxigênio; PEEP: pressão expiratória final positiva.

Existem controvérsias sobre a real incidência da SDRA, com estudos mostrando resultados que vão desde 1,5 a 78,9 casos por 100.000 habitantes (VILLAR; ; SLUTSKY, 1989; RUBENFELD et al., 2005). Essas discrepâncias se devem, entre outros fatores, a variações nos critérios diagnósticos, heterogeneidade das populações estudadas, variações geográficas e etiológicas (RUBENFELD; HERRIDGE, 2007).

Estudos conduzidos mais recentemente, após uma maior implementação de cuidados que podem minimizar a ocorrência de SDRA, tais como ventilação

mecânica (VM) com baixos volumes correntes (VT), restrição da transfusão de hemoderivados, melhor controle de infecções e melhor controle volêmico, mostram incidência de SDRA que varia entre 7,2 a 9,6 casos por 100.000 habitantes por ano (VILLAR et al., 2011; SIGURDSSON et al., 2013). No Brasil, em 2012, em estudo de coorte prospectivo multicêntrico, na região metropolitana de Vitória, a incidência observada de SDRA foi de 10,1 casos para 100.000 habitantes por ano (IC 95% = 8,1 – 12,1) (CASER et al., 2014).

A despeito de todo avanço ocorrido nos últimos anos em relação aos cuidados dos pacientes críticos, a mortalidade na SDRA ainda é elevada. Estudos epidemiológicos recentes conduzidos na Espanha e na Islândia encontraram mortalidade hospitalar de 47,8% e de 37%, respectivamente (VILLAR et al., 2011; SIGURDSSON et al., 2013). Os dados brasileiros mais recentes foram os obtidos por Caser e colaboradores, que encontraram uma mortalidade hospitalar de 49,2% (CASER et al., 2014).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA

Uma das grandes dificuldades de se estudar e entender a SDRA como uma condição clínica homogênea é que ela pode ser originada a partir de diferentes fatores de risco. Estes fatores de risco têm sido divididos entre os pulmonares, que lesam os pulmões diretamente, e os extra-pulmonares, que agredem os pulmões indiretamente, a partir de uma resposta inflamatória sistêmica. Os principais exemplos destas duas condições estão listados na Tabela 2 (PEPE et al., 1982; FOWLER, et al., 1983; HUDSON et al., 1995; PINHEIRO et al., 2011).

Tabela 2. Principais fatores de risco associados à SDRA

Fatores de risco pulmonares	Fatores de risco extrapulmonares
Pneumonia	Sepse
Aspiração	Choque circulatório
Contusão pulmonar	Politrauma
Embolia gordurosa	Traumatismo crânio-encefálico
Inalação de gases tóxicos	Múltiplas transfusões
Quase afogamento	Pancreatite aguda
Hemorragia alveolar	Circulação extracorpórea
Edema de reperfusão	Overdose de drogas
	Queimaduras
	Embolia gordurosa, gasosa e de líquido amniótico

Nas condições pulmonares ou extra-pulmonares associadas à SDRA, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, com consequente agressão da membrana alvéolo-capilar, tanto em sua face endotelial, quanto na epitelial. O epitélio alveolar é constituído por pneumócitos tipo I, que correspondem a 90% da superfície, e pneumócitos tipo II, que representam os outros 10%. A lesão dos pneumócitos tipo I, que são mais susceptíveis, determina aumento da permeabilidade e resulta em extravasamento de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar. Já a lesão dos pneumócitos tipo II, os quais são mais resistentes, compromete a produção do surfactante, a remoção do edema alveolar e a reparação do epitélio. Com a menor produção de surfactante, há aumento da tensão superficial alveolar, favorecendo a formação de atelectasias, com redução da complacência pulmonar. O edema e o colapso alveolar repercutem na relação ventilação-perfusão (V/Q) ocasionando aumento do shunt intrapulmonar e piora da oxigenação arterial e tecidual (WARE; MATTHAY, 2000). Essas alterações correspondem à fase exsudativa da SDRA, que ocorre na primeira semana de evolução e é a primeira de



três fases, conforme descrição feita por Katzenstein et al. (1976). A segunda fase, denominada de fibroproliferativa, ocorre durante a segunda e terceira semanas e é marcada por reparação, com intensa proliferação celular, especialmente de pneumócitos tipo 2 e fibroblastos. Todo este processo evolui para a terceira fase, em que pode haver resolução ou progressão para um remodelamento com fibrose (KATZENSTEIN et al., 1976).

Embora a descrição destes estágios evolutivos da SDRA tenha antecedido as definições clínicas da síndrome, suas ocorrências foram comprovadas por estudo de Thille et al. (2013). Avaliando 159 autópsias de pacientes com achados de dano alveolar difuso e com critérios clínicos para SDRA no momento do óbito, eles observaram que a fase exsudativa estava presente em 90% dos casos na primeira semana de evolução, em 74% entre a segunda e a terceira e em 17% após a terceira semana. As alterações fibroproliferativas já iniciavam na primeira semana (54% dos casos), atingindo 78% dos casos entre a segunda e a terceira semanas e 100% dos casos após a terceira semana. Já a fibrose praticamente não ocorreu na primeira semana de evolução (presente em apenas 4% dos casos), alcançando 24% na segunda e na terceira semanas e 61% após a terceira semana. O conhecimento dessas fases evolutivas é importante, visto que determinadas estratégias ventilatórias ou medicamentosas podem ser mais importantes em determinada fase em comparação com outras. Por exemplo, os corticoides talvez sejam eficazes apenas na fase inflamatória, exsudativa, e ineficazes quando a fibrose já está instalada. Estratégias ventilatórias para aumentar a aeração de áreas colapsadas e edemaciadas também podem ser mais efetivas nas fases iniciais de exsudação (THILLE et al., 2013).

Por outro lado, esta evolução temporal da SDRA pode ser modificada em

função de novos insultos ao pulmão lesado. Infecções nosocomiais, particularmente a pneumonia associada à ventilação mecânica, múltiplas transfusões de hemoderivados, balanço hídrico positivo, são algumas das condições que podem prolongar ou piorar a evolução da SDRA (OECKLER; HUBMAYR, 2007; GAJIC et al., 2011). A própria VM pode impedir ou retardar a resolução da SDRA, no que tem sido caracterizada como LPIV (MARON-GUTIERREZ; PELOSI; ROCCO, 2012; ROCCO; SANTOS; PELOSI, 2012). Nos últimos anos, muito se avançou no conhecimento da LPIV e os estudos clínicos com melhores resultados na SDRA foram aqueles em que empregaram estratégias ventilatórias protetoras, ou seja, com potencial de redução da LPIV (AMATO et al., 1998; THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000; PAPAIZIAN et al., 2010).

### 2.3 LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA

Diferentes fatores têm sido implicados na LPIV. Antes mesmo das caracterizações atuais de LPIV, já se conhecia a correlação entre níveis elevados de pressão e complicações da VM, tais como, pneumotórax, pneumomediastino, enfisema interlobular e enfisema subcutâneo, sendo as mesmas consideradas formas de barotrauma (PINHU et al., 2003). Posteriormente, estudos experimentais mostraram que a ventilação mecânica com níveis elevados de pressão alveolar associa-se a lesão pulmonar mesmo sem a ocorrência de extravasamento de ar para o espaço extra-alveolar, uma lesão de características inflamatórias semelhantes à SDRA (WEBB; TIERNEY, 1974). A importância do VT na LPIV foi inicialmente demonstrada por Dreyfuss et al. (1988), os quais ventilaram ratos normais com pressões elevadas (45 cmH<sub>2</sub>O), mas com VT altos ou baixos, neste

caso enfaixando o tórax para limitar sua expansão e assim gerar altas pressões. Apenas os ratos ventilados com altos VT apresentaram lesão pulmonar. Por outro lado, quando altos VT eram gerados por ventilação com pressão negativa, o mesmo tipo de lesão pulmonar ocorria, confirmando a importância deste parâmetro para a LPIV. Na verdade existe uma correlação entre o VT e a pressão gerada, sobretudo quando consideramos a pressão transpulmonar, que é a diferença entre a pressão alveolar (estimada na beira do leito pela pressão de platô) e a pressão pleural (estimada pela pressão esofágica). Assim, voltando ao experimento de Dreyfuss, nos animais com o tórax enfaixado e que não apresentaram LPIV, a pressão transpulmonar era baixa, enquanto naqueles ventilados com altos VT e pressão pleural negativa, os quais apresentaram LPIV, a pressão transpulmonar era alta. Neste sentido, ambos os termos, volutrauma e barotrauma, estão corretos (DREYFUSS et al., 1988).

O impacto da ventilação mecânica com baixos VT e baixas pressões de platô já foi clinicamente demonstrado, com estudos mostrando redução da mortalidade da SDRA com estes ajustes (AMATO et al., 1998; THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000). Sendo assim, as Diretrizes Brasileiras de Ventilação Mecânica publicada em 2013, recomendam ventilação com VT igual o menor que 6 ml/kg de peso predito, com pressão de platô igual ou menor que 30 cmH<sub>2</sub>O (MECHANICAL VENTILATION COMMITTEE OF THE BRAZILIAN INTENSIVE CARE MEDICINE ASSOCIATION; COMMISSION OF INTENSIVE THERAPY OF THE BRAZILIAN THORACIC SOCIETY, 2013).

Outro mecanismo pelo qual a ventilação mecânica pode lesar o pulmão ou agravar ou impedir a recuperação de órgãos previamente lesados é com a abertura e fechamento cíclicos de vias aéreas distais, sacos alveolares e alvéolos,

denominado de atelectrauma. A abertura de alvéolos que se colapsaram com a expiração, pelo VT, gera pressões elevadas na interface entre unidades alveolares abertas e fechadas, mesmo com o emprego de baixos VT (MUSCEDERE et al., 1994; MEAD et al., 1970). Este fenômeno pode ainda inativar o surfactante, aumentando a tensão superficial e a tendência ao colapso dessas áreas, criando um ciclo vicioso que potencializa a LPIV (ITO et al., 1997). A estratégia clínica que tem sido defendida para minimizar o atelectrauma é o emprego de PEEP mais elevada, que pode ainda ser precedido de uma manobra de recrutamento alveolar. Nenhum estudo clínico isolado demonstrou a eficácia da ventilação com níveis elevados de PEEP na redução da mortalidade na SDRA (BROWER et al., 2004; MERCAT et al., 2008; MEADE et al., 2008), mas uma metanálise destes estudos identificou este benefício entre os pacientes com doença mais grave (BRIEL et al., 2010). Outra opção para redução do atelectrauma é a ventilação em posição prona, visto que ela também reduz o colapso alveolar ao final da expiração, como discutiremos a seguir.

Outros dois conceitos que ajudam a entender a LPIV são o de *stress* e *strain*. O *stress* pode ser entendido como a força gerada em uma determinada área em reação à força externa a ela aplicada e de igual magnitude. Em ventilação mecânica, o *stress* é a força desenvolvida na estrutura pulmonar em reação à pressão transpulmonar; como são da mesma magnitude, a pressão transpulmonar pode ser considerada como medida do *stress*. Já o *strain* é a deformação de uma estrutura em relação ao seu estado de relaxamento, o que no pulmão corresponde à alteração do volume alveolar, a partir de seu estado na capacidade residual funcional (final da expiração) até a capacidade pulmonar total (final da inspiração). Em ventilação mecânica, o *strain* pode ser representado pela relação entre o volume corrente e a capacidade residual funcional (PLATAKI; HUBMAYR, 2010). Quando o

*stress* e o *strain* são elevados o suficiente para romperem as estruturas pulmonares, tem-se lesão pulmonar com extravasamento de ar para o espaço extra-alveolar. Além disso, a exposição a níveis elevados de *stress* e *strain*, mesmo que insuficientes para ruptura de estruturas pulmonares, pode promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de leucócitos, que serão responsáveis pela LPIV. Esta resposta inflamatória em reação a forças mecânicas é denominada biotrauma (GATTINONI et al., 2010a). Do ponto de vista clínico, o emprego de baixos VT reduz o *stress* e o *strain*, visto que menores pressões pulmonares serão aplicadas e os alvéolos serão menos estirados em relação à sua conformação de repouso. Isso ocorrerá também com estratégias que reduzem o colapso alveolar, como a PEEP e a posição prona, pois elas aumentam a capacidade residual funcional, o que, para um mesmo VT, reduzirá o *stress* e o *strain* (SLUTSKY; RANIERI, 2013).

## 2.4 VENTILAÇÃO MECÂNICA EM POSIÇÃO PRONA

Desde o primeiro estudo clínico que demonstrou, nos anos setenta, melhora da oxigenação em pacientes com SDRA ventilados em posição prona, grande atenção tem sido dada a esta estratégia ventilatória (PIEHL; BROWN, 1976). O grande benefício fisiológico e clínico obtido com a posição prona na SDRA é a melhora da oxigenação, que decorre da aeração de áreas anteriormente colapsadas, as quais passam a participar das trocas gasosas, reduzindo a baixa relação V/Q e, conseqüentemente, a hipoxemia (GATTINONI et al., 2013). Na posição supina, os alvéolos das regiões dorsais, que já apresentam menor volume em função de sua posição dentro do tórax, têm seus volumes ainda mais reduzidos

em função de forças gravitacionais, que são muito maiores no pulmão com SDRA, gerando atelectasias por compressão. O peso do coração e a pressão abdominal deslocando o diafragma no sentido cefálico intensificam essa compressão nas bases pulmonares (PELOSI et al., 1994). Essas regiões dorsais, chamadas de dependentes da gravidade, compreendem uma maior massa de alvéolos e recebem a maior parte da perfusão, o que determina baixa V/Q e hipoxemia. Quando o indivíduo é mudado para posição prona, as forças gravitacionais atuarão sobre as regiões ventrais, que compreendem menor massa alveolar (GATTINONI et al., 1991). Além disso, nesta posição não há compressão de alvéolos pelo peso do coração, nem pela pressão abdominal (ALBERT; HUBMAYR, 2000). Assim, a posição prona reduz as atelectasias de compressão, ou seja, recruta áreas para a ventilação. Por outro lado, as diferenças regionais da perfusão pulmonar não são dependentes da gravidade, mas sim anatômicas, ou seja, mesmo com o decúbito prono, a perfusão será predominante nas porções dorsais, agora ventiladas (HENDERSON et al., 2013). Em resumo, a posição prona aumenta a área alveolar ventilada e o faz com áreas mais perfundidas, reduzindo o *shunt* e melhorando a oxigenação.

O impacto da posição prona na SDRA foi avaliado por quatro estudos clínicos prospectivos e randomizados, na década compreendida entre 2001 e 2010 (GATTINONI et al., 2001; GUÉRIN et al., 2004; MANCEBO et al., 2006; TACCONE et al., 2009). Do ponto de vista fisiológico, eles evidenciaram melhora nas trocas gasosas e maior possibilidade de manter os pacientes dentro de estratégias ditas protetoras, por exemplo, com menores volumes correntes e FIO<sub>2</sub>. Entretanto, nenhum deles mostrou melhora da sobrevida com a posição prona em pacientes adultos com SDRA. A tabela 3 mostra algumas características destes estudos.

Tabela 3. Características dos estudos clínicos em posição prona

	<b>Prona-supina I 2001</b>	<b>C Guérin 2004</b>	<b>J Mancebo 2006</b>	<b>Prona-supina II 2009</b>
Pacientes (N)	304	791	136	342
Seguimento	6 meses	3 meses	Alta hospitalar	6 meses
Tempo de prona/dia	7 horas	9 horas	17 horas	18 horas
Mortalidade 28 dias	60% na prona 65% na supina	48% na prona 53% na supina	42% na prona 59% na supina	38% na prona 46% na supina
Mortalidade na UTI	64% na prona 65% na supina	57% na prona 61% na supina	44% na prona 66% na supina	46% na prona 55% na supina
Mortalidade ao final do seguimento	66% na prona 76% na supina	59% na prona 65% na supina	51% na prona 72% na supina	53% na prona 63% na supina

Posteriormente, Gattinoni et al. (2010b), analisaram em conjunto todos os pacientes destes quatro estudos e observaram que, quando analisados somente os pacientes mais graves, com  $PaO_2/FIO_2$  menor que 100 mmHg, a posição prona associou-se a menor mortalidade. Este benefício não foi observado entre os pacientes com menores níveis de hipoxemia.

A partir da hipótese de que os benefícios da posição prona são mais pronunciados nas formas mais graves de SDRA, foi conduzido um estudo prospectivo e randomizado incluindo somente pacientes com  $PaO_2/FIO_2 < 150$  mmHg e com necessidade de  $FIO_2 \geq 0,6$  e  $PEEP \geq 5$  cmH<sub>2</sub>O. Eles deveriam estar na fase precoce da SDRA, dentro das primeiras 36 horas do início da ventilação mecânica e, os randomizados para posição prona, deveriam ser mantidos nesta posição por 16 horas consecutivas por dia, enquanto os critérios acima permanecessem ou até 28 dias. A mortalidade observada no grupo prono foi significativamente menor ao final de 28 dias (16% vs. 33%,  $p < 0,001$ ) e de 90 dias (24% vs. 41%,  $p < 0,001$ ). A taxa de sucesso de extubação dentro de 90 dias foi maior no grupo prono (81% vs. 65%,

$p < 0,001$ ) e não se observaram diferenças entre os grupos em relação a complicações relacionadas com a ventilação mecânica ou com o posicionamento dos pacientes (GUÉRIN et al., 2013). Assim, em conformidade com os resultados da metanálise de Gattinoni et al. (2010b), este estudo mostrou que a posição prona aplicada precocemente na SDRA grave reduz sua mortalidade.

Especula-se que o mecanismo pelo qual a posição prona diminui a mortalidade na SDRA seja por redução da LPIV, ou seja, o mesmo mecanismo presente nos demais estudos clínicos que conseguiram este efeito, seja por redução de VT (AMATO et al., 1998; THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000), seja por bloqueio neuromuscular nos primeiros dias de SDRA grave (PAPAZIAN et al., 2010). Estudos experimentais já demonstraram que a posição prona é capaz de reduzir a LPIV. Broccard et al. (2000) mostraram que, em cães com pulmões inicialmente normais e ventilados com altos volumes correntes, a posição prona, em comparação com a supina, associou-se a menor lesão pulmonar. Resultados semelhantes foram encontrados por Nishimura et al (2000), em estudo experimental em coelhos.

Valenza et al. (2005), ventilando ratos inicialmente saudáveis com VT de 30 ml/kg, observaram que a posição prona retardou o surgimento de LPIV, mostrando o efeito protetor desta estratégia. Também em estudos experimentais com pulmões lesados, por exemplo com ácido oleico intravenoso ou paraquat intraperitoneal, a ventilação em posição prona resultou em menor lesão pulmonar do que a em posição supina (BROCCARD et al., 1997; SANTANA et al., 2009).

Diferentes efeitos da posição prona sobre o sistema respiratório durante a ventilação mecânica podem explicar sua proteção contra a LPIV. Ao reduzir o colapso alveolar ao final da expiração, a posição prona aumenta a capacidade



residual funcional, reduzindo assim o *strain* que será gerado com a oferta do volume corrente (EDGCOMBE et al., 2008). Este recrutamento alveolar ainda reduz as áreas pulmonares que são abertas e fechadas em cada ciclo ventilatório e que, na interface entre alvéolos abertos e colapsados, são expostas a elevadas pressões e a inativação do surfactante, terminando por serem lesadas direta ou indiretamente, neste caso a partir da mecanotransdução (GATTINONI et al., 2010a). A posição prona, ao restringir a expansão da parede torácica em sua porção ventral, agora em contato com o leito, liberando a parede dorsal, que todavia é menos complacente, reduz a variação da pressão pleural ao longo do eixo vertical, a qual é maior na posição supina. Com isso, a pressão transpulmonar é mais uniformemente distribuída dentro dos pulmões, reduzindo o *stress* e o *strain* pulmonar (PELOSI et al., 1994). A melhora na oxigenação permite a redução na  $FIO_2$ , sendo outro fator de proteção; da mesma forma que ao reduzir a pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial ( $PaCO_2$ ) em alguns pacientes a posição prona facilita a ventilação com baixos volumes correntes (LAMM; GRAHAM; ALBERT, 1994).

O potencial de proteção contra LPV com a posição prona é maior nas formas mais graves de SDRA, que são aquelas que cursam com maiores áreas de colapso alveolar e têm maior recrutabilidade (GATTINONI et al., 2006). Ao mesmo tempo, por terem uma menor porção pulmonar aerada, as formas graves são as que mais se beneficiam da distribuição mais homogênea do *stress* e do *strain* (GATTINONI et al., 2010 a). Este fato pode explicar porque somente os pacientes graves apresentam redução da mortalidade com a posição prona. Com isso, trabalhos experimentais para avaliar possíveis efeitos da posição prona em formas leves de lesão pulmonar aguda não têm sido feitos, o que motivou a realização de nosso estudo.

## 2.5 MODELO DE LESÃO PULMONAR INDUZIDO POR *ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS)

Modelos animais constituem uma etapa importante na investigação científica. Eles podem testar tanto hipóteses geradas a partir de situações clínicas, como resultados obtidos em estudos *in vitro*, ocupando uma posição intermediária em uma hipotética escala hierárquica. Assim, hipóteses clínicas podem ser estudadas mais profundamente em um estágio anterior às pesquisas em humanos, as quais têm maiores implicações éticas e maiores custos, e achados *in vitro* podem ser comprovados em modelos animais mais complexos e mais próximos das condições clínicas (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

Idealmente, um modelo animal deve reproduzir os mecanismos envolvidos na condição que se pretende estudar, bem como suas consequências clínicas e fisiopatológicas. Na LPA, conseguir um bom modelo animal não é simples, visto tratar-se de uma condição complexa, que pode decorrer de diferentes fatores agressores (várias causas pulmonares e extra-pulmonares), apresentar diferentes níveis de gravidade (habitualmente graduados em leve, moderada ou grave) e diferentes fases evolutivas (exsudativa, fibroproliferativa e resolução ou fibrose) (WARE; MATTHAY, 2000, THILLE et al., 2013). Desta forma, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todas as características da LPA em humanos, definida como a SDRA. Ao se escolher um modelo, deve-se estar atento ao fato de que ele se aproxima de algumas características da síndrome, mas não de todas. Além disso, as respostas dos animais aos diferentes insultos variam entre si e apresentam diferenças em relação aos humanos. As diferenças ocorrem nos receptores que reconhecem os agentes agressores (REHLI, 2002), na distribuição das células

inflamatórias pelos tecidos (WARNER, 1996), nos mediadores inflamatórios produzidos (ex. citocinas, óxido nítrico, espécies reativas do oxigênio) e seus receptores (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Essas particularidades devem ser consideradas para a escolha do modelo animal a ser empregado e para a interpretação dos resultados obtidos, os quais nunca podem ser extrapolados sem restrições para condições humanas.

O modelo escolhido para este trabalho foi o de injeção intraperitoneal de LPS. O LPS é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, com um componente lipídico (lipídio A), que é o principal responsável pelos efeitos biológicos, e uma cadeia de repetidos dissacarídeos (RAETZ et al. 1991, SCHROMM et al., 2000). A ação do LPS inicia-se com a ativação de receptores presentes em monócitos, macrófagos e outras células inflamatórias, denominados receptor Toll-like 4 (TLR4), desencadeando a liberação de uma série de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), 4 (IL-4) e 6 (IL-6), interferon  $\gamma$ , proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2), fator inibidor de macrófago (MIF), KC (análogo da IL-8 em humanos) (WRIGHT et al., 1990, YANG et al., 1998, TAPPING et al., 2000, ZHOU et al., 2013). Nos pulmões, após administração de LPS, tanto por via intratraqueal, quanto por via endovenosa ou intraperitoneal, ocorre alteração na capacidade de deformação dos neutrófilos, com acúmulo dos mesmos nos capilares e interstício pulmonares (REUTERSHAN et al., 2007) . Com as injeções endovenosa e intraperitoneal de LPS, o acúmulo de neutrófilos na luz alveolar é pequeno, sendo maior quando a injeção é intratraqueal. A inflamação pulmonar gerada pelo LPS compromete a barreira alvéolo-capilar, mas neste modelo o edema alveolar não é pronunciado e a formação de membrana hialina é rara. Desta forma, a LPA decorrente da injeção de LPS, sobretudo pelas

vias endovenosa ou intraperitoneal, é de leve intensidade (KABIR et al., 2002, STEINMÜLLER et al., 2006, ROJAS et al., 2005, MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

A escolha deste modelo deveu-se principalmente ao fato dele gerar, de forma reprodutível, uma LPA leve (KABIR et al., 2002, STEINMÜLLER et al., 2006, ROJAS et al., 2005, MATUTE-BELLO et al., 2008, CHEN; BAI; WANG, 2010). Além disso, o LPS não tem ação lesiva direta sobre os pulmões, agindo através do sistema imunológico, por vias semelhantes às que ocorrem em pacientes que desenvolvem sepse a partir de gram-negativos (WRIGHT et al., 1990, YANG et al., 1998). Desta forma, este modelo tenta reproduzir, mesmo que com limitações, a LPA a partir de sepse abdominal. A opção pelo rato Wistar foi feita pelo fato deste modelo com LPS já ter sido validado nesta espécie (KABIR et al., 2002), pelo menor custo deste animal em comparação com animais maiores, pela relativa facilidade de manuseio destes animais em relação aos procedimentos necessários e pela disponibilidade de análise dos mediadores inflamatórios potencialmente envolvidos, mesmo que estas não tenham sido inicialmente avaliadas neste estudo. Por outro lado, uma potencial limitação decorrente da escolha de ratos para o modelo é a grande diferença de tamanho e conformação da caixa torácica, em comparação com humanos, o que pode influenciar nos resultados, visto que são fatores que têm relevância nos mecanismos pelos quais a posição prona pode ser benéfica na ventilação mecânica na SDRA (VALENZA et al., 2005).

### **3 HIPÓTESES**

H0: a posição prona, em relação à supina, não traz benefícios durante a ventilação mecânica em modelo experimental de LPA leve, induzida pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos Wistar.

H1: a posição prona, em relação à supina, reduz a lesão pulmonar associada à ventilação mecânica em modelo experimental de LPA leve, induzida pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos Wistar.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da posição prona, em comparação com a supina, durante a ventilação mecânica em modelo experimental de LPA leve, induzida pela injeção intraperitoneal de LPS em ratos Wistar.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da posição prona sobre os seguintes parâmetros:

- Trocas gasosas;
- Hemodinâmica;
- Edema pulmonar;
- Celularidade no lavado broncoalveolar;
- Histologia pulmonar.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram estudados 17 ratos Wistar, machos, adultos com aproximadamente 90 dias de idade, pesando  $310 \pm 12$  g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer nº 004/2012 (ANEXO A).

### 5.2 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionadas (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola abrigava três animais, que foram mantidos em armários climatizados (Alesco, Brasil) pelo período de uma semana antecedendo o procedimento experimental, localizados em alojamento com lâmpadas incandescentes, controladas automaticamente para acenderem às 6:00 h e apagarem às 18:00 h, mantendo um fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*.

### 5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA LESÃO PULMONAR AGUDA POR LPS

A resposta inflamatória sistêmica e, conseqüentemente a LPA, foi induzida pela administração de LPS (*Escherichia coli* lipopolysaccharides - 055:B5, Sigma – Aldrich, Israel) por via intraperitoneal, na dose de 5 mg/Kg, como descrito em estudos prévios (SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2013). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina (SF 0,9%) por via intraperitoneal.

#### 5.3.2 PREPARO DOS ANIMAIS

Vinte e quatro horas após a injeção intraperitoneal de LPS ou SF 0,9%, os animais foram pesados (Balança Filizola MF 4006033, Brasil), sedados e anestesiados com 2,5 mg de midazolam (Hipolabor, Brasil) e 80 mg/kg de cloridrato de dexroacetamina (Cristália, Brasil), por via intraperitoneal. Estas doses foram suficientes para manter o animal em plano anestésico, caracterizado pela supressão do reflexo córneo-palpebral, por aproximadamente uma hora. Após este período, metade da dose anterior do midazolam (Hipolabor, Brasil) e do cloridrato de dexroacetamina (Cristália, Brasil) foi administrada.

Os animais anestesiados foram colocados sob o foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sobre uma cama aquecida (Heat Pad EFF422, Reino Unido) para prevenção de hipotermia. Os membros superiores dos animais foram fixados com fitas



adesivas, em abdução à 90 graus em relação ao corpo, e os inferiores, estendidos paralelamente ao corpo.

Após posicionamento dos animais, foi realizada a tricotomia na face ventral do pescoço e, em sequência, foi realizada anestesia local com a injeção subcutânea de 0,3 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Hipolabor, Brasil), seguida de uma incisão longitudinal medial, de aproximadamente 2 cm de extensão, na face ventral no pescoço, com a divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço proximal da traqueia. A traqueostomia foi realizada com uma lâmina de bisturi número 23 (Maxicor, Brasil) e, imediatamente, foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic<sup>®</sup>, Clay-Adams Inc., Estados Unidos da América), com 1,5 mm diâmetro interno e 7,5 cm de comprimento, fixada na porção proximal por fio seda 2.0 estéril, pré-cortado, sem agulha (Polysuture SP420, Brasil).

Com a finalidade de infusão de medicamentos e fluidos, foi dissecada a veia jugular interna e, sob visualização direta, foi introduzido um cateter periférico 24 G (Poly Medicure, Índia), fixando-o com fio seda 2.0 estéril, pré-cortado, sem agulha (Polysuture SP420, Brasil).

O acesso venoso foi mantido com a infusão de 1 ml de SF 0,9% a cada 30 minutos. Este mesmo acesso foi utilizado para infusão de midazolam (Hipolabor, Brasil), cloridrato de dexroetamina (Cristália, Brasil) e brometo de rocurônio (Eurofarma, Brasil), além de bolus de 10 ml/kg de SF 0,9%, quando necessário para manutenção da pressão arterial média (PAM) acima de 60 mmHg.

A artéria carótida comum também foi dissecada e canulada com um cateter de polietileno, 20 G (Arrow, Estados Unidos da América) com a finalidade de coletar sangue para a realização de gasometria arterial e monitorização da PAM, por meio

de um transdutor líquido (PowerLab, AD Instruments, Estados Unidos da América), situado no mesmo nível do coração.

### 5.3.3 VENTILAÇÃO MECÂNICA INICIAL

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em posição supina e acoplados, através da traqueostomia, ao ventilador (Inspira ASV-Harvard Apparatus, Estados Unidos da América), sendo curarizados com brometo de rocurônio (0,5 mg/kg, intravenoso) (Eurofarma, Brasil). O modo ventilatório foi o volume-controlado, com VT de 6 ml/kg, frequência respiratória (FR) de 80 irpm, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2, FIO<sub>2</sub> de 100% e PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O.

Após cinco minutos de ventilação com esses parâmetros, foi colhida a primeira gasometria arterial a fim de caracterizar, nos animais que receberam LPS, a presença de LPA leve, definida pela relação PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> entre 200 e 300 mmHg, necessária para a inclusão do animal no estudo. Nove animais foram excluídos, sendo sete com a relação PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> maior que 300 mmHg e dois animais com a relação PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> menor que 200.

### 5.3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

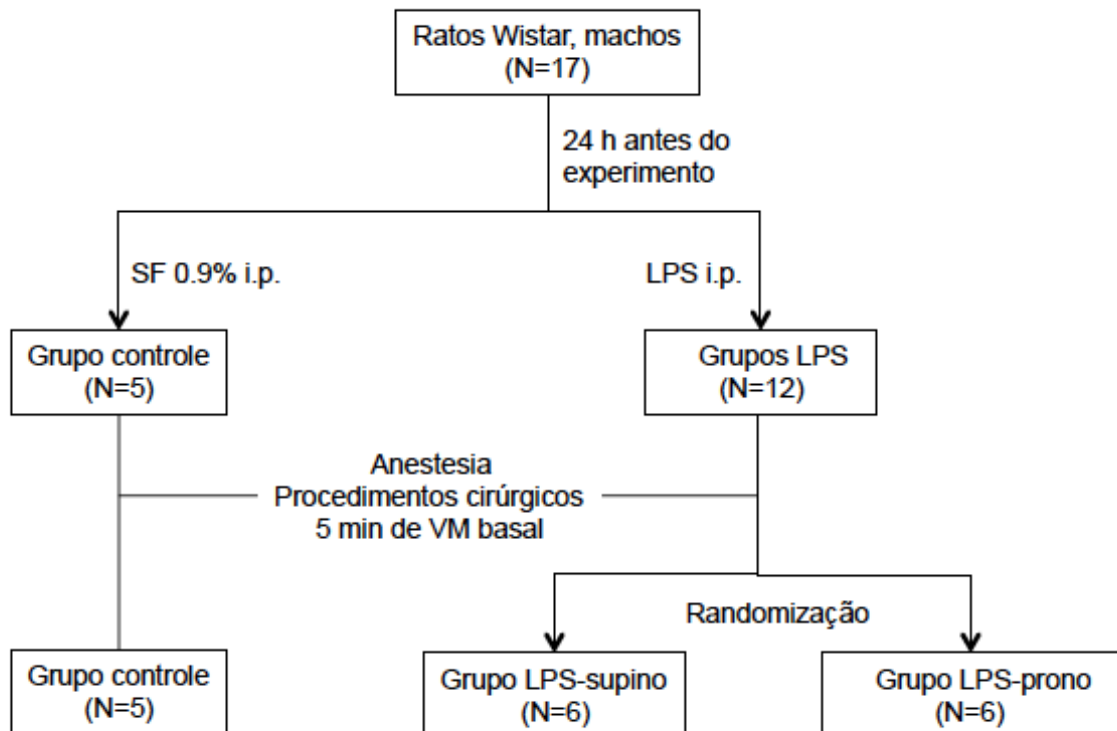
Após incluídos no estudo, os animais dos grupos LPS foram randomizados para:

- a) Grupo LPS-supino (n=6): os animais foram mantidos em ventilação mecânica em posição supina, com os mesmos parâmetros ventilatórios iniciais, por 1 hora;

b) Grupo LPS-prono (n=6): os animais foram mantidos em ventilação mecânica em posição prona, com os mesmos parâmetros ventilatórios iniciais, por 1 hora;

O grupo controle (n=5) foi constituído pelo animais que receberam SF 0,9% 24 horas antes do procedimento. Eles foram mantidos em ventilação mecânica em posição supina, com os mesmos parâmetros ventilatórios iniciais, por 1 hora. A figura 1 ilustra a distribuição dos animais entre os grupos.

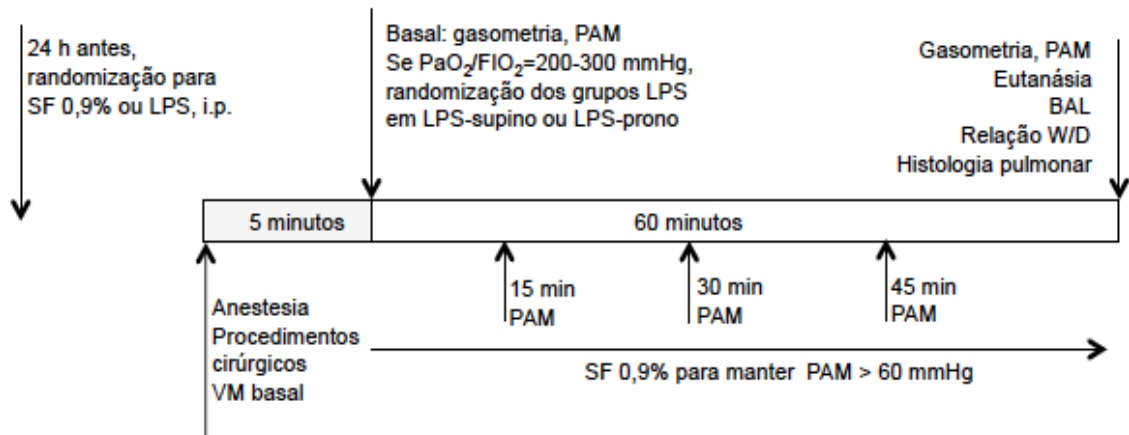
Figura 1. Distribuição dos animais entre os grupos experimentais



### 5.3.5 EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS ÓRGÃOS

Ao término do experimento os animais foram imediatamente eutanasiados por exsanguinação, com posterior oclusão da traqueia com fio cirúrgico seda 4.0 (Polysuture, Brasil), ao final da expiração e com uma PEEP de 5 cmH<sub>2</sub>O. Imediatamente após, foi realizada uma incisão abdominal com ruptura do diafragma e clampeamento da aorta. Prosseguindo, o tórax foi aberto, a parede torácica anterior removida e a porção abdominal do esôfago identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática Kelly (ABC, Brasil). As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça presa ao esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi seccionada acima do local ocluído pelo fio de cirúrgico e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. Os brônquios fontes direito e esquerdo foram ocluídos e separados. No pulmão esquerdo foi realizado o lavado broncoalveolar. No pulmão direito, o lobo superior foi separado para posterior avaliação da relação peso seco/peso úmido e o lobo inferior foi separado para avaliação histopatológica. A figura 2 mostra a linha do tempo do experimento.

Figura 2. Linha do tempo do experimento



## 6 VARIÁVEIS ANALISADAS

### 6.1 TROCAS GASOSAS

Amostras de sangue arterial foram coletadas do cateter inserido na carótida, sendo retirado 0,3 ml de sangue em uma seringa com heparina lítica (Sarstedt, Alemanha). Ao todo foram duas amostras, uma após 5 minutos de ventilação mecânica (basal), e a outra ao término de 1 hora do experimento (final). O sangue coletado foi analisado pelo gasômetro (ABL90 Flex Radiometer, Dinamarca) com determinação da  $\text{PaO}_2$ , da  $\text{PaCO}_2$ , do bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) e do pH.

### 6.2 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Os dados da PAM foram obtidos no início do experimento (basal) e com 15, 30 e 60 minutos.

### 6.3 RELAÇÃO PESO ÚMIDO/PESO SECO (W/D)

O edema pulmonar foi avaliado pela determinação da relação peso úmido/peso seco (W/D). O lobo superior direito foi separado e pesado em balança de precisão (Ohaus Adventure, Brazil), sendo o resultado caracterizado como o peso úmido. A seguir, ele foi colocado dentro de um micro ondas (Philco PMS22N3, China) ajustado para uma baixa potência (200 W), por cinco minutos. O processo de secagem foi repetido até que a diferença entre as duas mensurações consecutivas no peso seco fosse menor que 0,002 g. A última medida foi escolhida como sendo o peso seco, permitindo o cálculo da relação W/D (PETERSON; BROOKS; ZACK, 1982).

### 6.4 LAVADO BRONCOALVEOLAR

O lavado broncoalveolar foi realizado no pulmão esquerdo, infundindo e aspirando por três vezes, 4,0 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo ácido etilenodiamino tetracético (10 nM). O fluido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos à 4 °C (Sorvall, General Purpose, Estados Unidos da América).

A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) após a diluição das amostras em uma solução de Turk (2% ácido acético). O sedimento de células foi diluído em PBS e depois corado pela técnica de May-Grunwald para contagem de células diferencial, sendo esta feita sobre um mínimo de 200 células.

## 6.5 HISTOPATOLOGIA DE DANO TECIDUAL PULMONAR

O lobo inferior do pulmão direito foi removido e suas porções ventral e dorsal foram identificadas, sendo que a região dorsal foi marcada com tinta nanquim. Após a identificação, o lobo foi fixado em formaldeído tamponado a 10% por 72 horas.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a banhos em uma série crescente de álcool etílico e diafanizadas em xilol para posterior impregnação em parafina. Foram obtidos cortes transversais do parênquima pulmonar englobando as porções ventral e dorsal do lobo inferior (4 µm de espessura). Após a montagem do material em lâminas de vidro, os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica.

Todas as lâminas foram analisadas por duas patologistas em um mesmo momento, porém elas não tinham conhecimento dos grupos experimentais e utilizaram para esta análise o sistema de escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society* (MATUTE-BELLO, G. et al., 2011), utilizando o microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha). Neste escore foram avaliados os seguintes parâmetros: número de neutrófilos na parede e interstício alveolar (incluindo aqueles próximos aos capilares); número de neutrófilos no espaço alveolar; formação de membrana hialina; presença de debri protéico no espaço alveolar (como filamentos de fibrina); espessura da parede alveolar.

Para obtenção do escore foram avaliados 20 campos diferentes (aumento total de 400X) em cada lâmina, sendo que pelo menos 50% de cada campo deveria estar preenchido por alvéolos pulmonares. Os campos compostos predominantemente de brônquios ou grandes vasos foram excluídos da análise.

Cada um dos cinco achados histológicos foi graduado de acordo com o esquema apresentado na tabela 4. Para gerar o escore, foi realizada a soma dos pontos obtidos em cada campo analisado, para cada uma das cinco variáveis independentes como mostrado na tabela 1. Estes pontos foram usados em uma fórmula, que aplica pesos para cada variável, com base em sua relevância na caracterização da lesão pulmonar.

Tabela 4. Sistema de escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society* (MATUTE-BELLO, G. et al., 2011)

Parâmetros	Escore por campo		
	0	1	2
A. Neutrófilos no espaço alveolar	Nenhum	1-5	>5
B. Neutrófilos no espaço intersticial	Nenhum	1-5	>5
C. Membrana hialina	Nenhum	1	>1
D. Debrí protéico preenchendo o espaço aéreo	Nenhum	1	>1
E. Espessamento do septo alveolar	< 2x	2x-4x	>4x

Equação 1

$$\text{Escore} = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{\text{Número de campos} \times 100}$$

## 6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, enquanto os dados não paramétricos foram expressos como mediana (intervalo interquartil). Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo



teste de Tukey quando necessário. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney quando necessário. A correção de Bonferroni foi aplicada para as análises repetidas. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com resultado de  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc, Illinois, EUA).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma do artigo intitulado *“The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats”*, (Apêndice A), o qual foi submetido a revista, *Critical Care* (Anexo B).

## 7.1 RESUMO DO ARTIGO

### **The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats**

Aydra Mendes Almeida Bianchi<sup>1,2</sup>, Maycon Moura Reboredo<sup>1,2</sup>, Leda Marília Fonseca Lucinda<sup>1,2</sup>, Fernando Fonseca Reis<sup>1,2</sup>, Manfrinni Vinícius Alves Silva<sup>1,2</sup>, Maria Aparecida Esteves Rabelo<sup>1</sup>, Marcelo Alcantara Holanda<sup>3</sup>, Júlio César Abreu Oliveira<sup>1</sup>, José Ángel Lorente<sup>4</sup>, Bruno do Valle Pinheiro\*<sup>1,2</sup>

1. Pulmonary Research Laboratory, Federal University of Juiz de Fora, Av. Eugênio do Nascimento - s/nº, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

2. Center of Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Khelmer - s/n, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-900, Brazil

3. Laboratory of Respiration, Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo – 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, 60430-140, Brasil

4. University Hospital of Getafe, Carretera de Toledo A-42, Km 12500, Getafe, Spain

## Abstract

**Introduction:** The benefits of prone position ventilation are well demonstrated in the severe forms of acute respiratory distress syndrome (ARDS), but not in milder forms of this condition. We therefore investigated the effects of the prone position on arterial blood gases, lung inflammation and histology in an experimental mild acute lung injury model.

**Methods:** Acute lung injury was induced in adult male Wistar rats by intraperitoneal *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection (5 mg/kg). After 24h, the animals with PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> between 200 and 300 mmHg were anesthetized and randomized into 2 groups according to their position during ventilation (prone [n=6] and supine [n=6]). Both groups were compared with a control group (n=5) that received intraperitoneal saline and was ventilated in the supine position. All of the groups were ventilated for 1h with volume-controlled ventilation mode, with tidal volume of 6 ml/kg, respiratory rate of 80 breaths/min, positive end-expiratory pressure of 5 cmH<sub>2</sub>O, and an inspired oxygen fraction of 1.

**Results:** Significantly higher lung injury scores were observed in the LPS-supine group compared to LPS-prone and control groups ( $0.32 \pm 0.03$ ;  $0.17 \pm 0.03$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.001$ ), mainly due to a higher neutrophil infiltration level in the interstitial space and more proteinaceous debris in that filled the airspaces. Similar differences were observed when the gravitational dependent lung regions (dorsal in the supine group and ventral in the prone group –  $0.34 \pm 0.05$  and  $0.22 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) and non-dependent lung regions (ventral in the supine group and dorsal in the prone group –  $0.29 \pm 0.04$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) were analyzed separately. The BAL neutrophil content was also higher in the LPS-supine group compared to the LPS-prone and control groups. There were no

significant differences in the wet/dry ratio and gas exchange levels among the three groups.

**Conclusions:** In this experimental extrapulmonary mild acute lung injury model, prone position ventilation for 1 hour, when compared with supine position ventilation, was associated with lower lung inflammation and injury, but without any impact on arterial oxygenation and lung edema.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, avaliamos o efeito da posição prona em um modelo de LPA leve, uma vez que o impacto desta modalidade nas formas mais graves de injúria pulmonar já está bem estabelecido. Nossos resultados apontam para benefícios da ventilação em posição prona, em comparação com a supina, na LPA leve, com redução do número de células inflamatórias no LBA e menor lesão pulmonar à histologia. Nosso estudo não avaliou os eventuais mecanismos responsáveis pela menor inflamação e lesão pulmonar com a posição prona, mas dados da literatura já mostraram que ela protege o pulmão, sobretudo quando já previamente lesado, da LPiV. Esses achados, aliados ao fato de que a posição prona é uma estratégia acessível às unidades de terapia intensiva, desde que com equipe devidamente treinada, reforçam a importância de estudos que elucidem melhor o papel da posição prona na ventilação da LPA em suas formas leves.

## **9 CONCLUSÃO**

Neste modelo de LPA leve induzida por LPS intraperitoneal, a posição prona associou-se a menor inflamação e a menor lesão pulmonar, embora sem impacto na troca gasosa e no edema pulmonar.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT, R. K.; HUBMAYR, R. D. The prone position eliminates compression of the lungs by the heart. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 161, n. 5, p. 1660-5, 2000.
- AMATO, M. B. P. et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 338, n. 6, p. 347-54, 1998.
- ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, London, v. 2, n. 7511, p. 319-23, 1967.
- BERNARD, G. R. et al. Report of the American – European Consensus Conference on Acute Respiratory Distress Syndrome: Definitions, Mechanics, Relevant Outcomes, and Clinical Trial Coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n. 3, p. 818-24, 1994.
- BRIEL, M. et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. **JAMA**, Chicago, v. 303, n. 9, p. 865-73, 2010.
- BROCCARD, A. F. et al. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, New York, v. 25, n. 1, p. 16-27, 1997.
- BROCCARD, A. F. et al. Effects of mean airway pressure and tidal excursion on lung injury induced by mechanical ventilation in an isolated perfused rabbit lung model. **Crit Care Med**, New York, v. 27, n. 8, p. 1533–41, 1999.
- BROCCARD, A. F. et al. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. **Crit Care Med**, New York, v. 28, n. 2, p. 295-303, 2000.
- BROWER, R. G. et al. Higher versus Lower Positive End-Expiratory Pressures in Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 351, n. 4, p. 327-36, 2004.
- CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients. **Crit Care Med**, New York, v. 42, n. 3, p. 574-82, 2014.
- CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Rev Respir Med**, London, v. 4, n. 6, p. 773-83, 2010.
- DREYFUSS, D. et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. **Am Rev Respir Dis**, Baltimore, v. 137, n. 5, p. 1159-64, 1988.



EDGCOMBE, H.; CARTER, K.; YARROW, S. Anaesthesia in the prone position. **Br J Anaesth**, London, v. 100, n. 2, p. 165-83, 2008.

FOWLER, A. A. et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 98, n. 5, p. 593-7, 1983.

GAJIC, O. et al. Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 183, n. 4, p. 462-70, 2011.

GALIATSOU, E. et al. Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 174, n. 2, p. 187-97, 2006.

GATTINONI, L. et al. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 74, n. 1, p. 15-23, 1991.

GATTINONI, L. et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. **N Engl J Med**, Boston, v. 345, n. 8, p. 568-73, 2001.

GATTINONI, L. et al. Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. **New Engl J Med**, Boston, v. 354, n. 17, p. 1775-86, 2006.

GATTINONI, L. et al. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. **Crit Care Med**, New York, v. 38, n. 10 Supp., p. S539-48, 2010 a.

GATTINONI, L. et al. Prone positioning improves survival in severe ARDS: a pathophysiologic review and individual patient meta-analysis. **Minerva Anestesiol**, Torino, v. 76, n. 6, p. 6448-54, 2010 b.

GATTINONI, L. et al. Prone position in acute respiratory distress syndrome. Rationale, indications, and limits. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 188, n. 11, p. 1286-93, 2013.

GUÉRIN, C. et al. Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 292, p. 2379-87, 2004

GUÉRIN, C. et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 368, n. 23, p. 2159-68, 2013.

HENDERSON, A. C. et al. The gravitational distribution of ventilation–perfusion ratio is more uniform in prone than supine posture in the normal human lung. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 115, n. 3, p. 313-24, 2013.

HUDSON, L. D. et al. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 151, n. 2, p. 293-301, 1995.

ITO, Y. et al. Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute

lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 155, n. 2, p. 493-9, 1997.

KABIR, K. et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. **Shock**, Augusta, v.17, n. 4, p. 300-3, 2002.

KATZENSTEIN, A. L.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage-the role of oxygen, shock, and related factors. A review. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 85, n. 1, p. 209-28, 1976.

LAMM, W. J.; GRAHAM, M. M.; ALBERT, R. K. Mechanism by which the prone position improves oxygenation in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 150, n. 1, p. 184-93, 1994.

MANCIBO, J. et al. A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 173, n. 11, p. 1233-9, 2006.

MARON-GUTIERREZ, T; PELOSI, P; ROCCO, M. R. P. Ventilator-induced lung injury. **European Respiratory Monograph**, Copenhagen v. 55, p. 1–18, 2012.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. L379-99, 2008.

MATUTE-BELLO, G. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals, **Am J Respir Cell Mol Biol**, New York, v. 44, n. 5, p. 725-38, 2011.

MEAD, J.; TAKISHIMA, T.; LEITH, D. Stress distribution in lungs: A model of pulmonary elasticity. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 28, n. 5, p. 596-608, 1970.

MEAD, J. et al. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 6, p. 637-45, 2008.

MECHANICAL VENTILATION COMMITTEE OF THE BRAZILIAN INTENSIVE CARE MEDICINE ASSOCIATION; COMMISSION OF INTENSIVE THERAPY OF THE BRAZILIAN THORACIC SOCIETY. Brazilian recommendations of mechanical ventilation 2013. Part I. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 327-63, 2014.

MERCAT, A. et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 6, p. 646-55, 2008.

MURRAY, J. F. et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, Baltimore, v. 138, n. 3, p. 720-3, 1988.

MUSCEDERE, J. G. et al. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n. 6, p. 1327-34, 1994.

NISHIMURA, M. et al. Body position does not influence the location of ventilator-induced lung injury. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 26, n. 11, p. 1664-9, 2000.

OECKLER, R. A.; HUBMAYR, R. D. Ventilator-associated lung injury: a search for better therapeutic targets. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 1216-26, 2007.

PAPAZIAN, L. et al. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 363, n. 12, p. 1107-16, 2010.

PEPE, P. E. et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. **Am J Surg**, New York, v. 144, n. 1, p. 124-30, 1982.

PELOSI, P. et al. Vertical gradient of regional lung inflation in adult respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n. 1, p. 8-13, 1994.

PETERSON, B. T.; BROOKS, J. A.; ZACK, A. G. Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, Bethesda, v. 52, n. 6, p. 1661-3, 1982.

PIEHL, M. A.; BROWN, R. S. Use of extreme position changes in acute respiratory failure. **Crit Care Med**, New York, v. 4, n. 1, p. 13-4, 1976.

PINHEIRO, V. B.; LISBOA, L. F. M.; HOLANDA, M. A. Fatores de Risco na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pulmao RJ**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 13-8, 2011.

PINHU, L. et al. Ventilator-associated lung injury. **Lancet**, London, v. 361, n. 9354, p. 332-40, 2003.

PLATAKI, M.; HUBMAYR, R. D. The physical basis of ventilator-induced lung injury. **Expert Rev Respir Med**, London, v. 4, n. 3, p. 373-85, 2010.

RANIERI, V. M. et al. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526-33, 2012.

RAETZ, C. R. et al. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **Faseb J**, Bethesda, v. 5, n. 12, p. 2652-60, 1991.

REHLI M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. **Trends Immunol**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 375-78, 2002.

REUTERSHAN, J. et al. Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Immunol**, Baltimore, v. 179, n. 2, p. 1254-1263, 2007.

RICHTER, T. et al. Effect of prone position on regional shunt, aeration, and perfusion in experimental acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v.172, n. 4, p. 480-487, 2005.

ROCCO, M. R. P.; SANTOS, C.; PELOSI, P. Pathophysiology of ventilator-associated lung injury. **Curr Opin Anesthesiol**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 123-30, 2012.

ROJAS, M. et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 288, n.2, p. 333-41, 2005.

RUBENFELD, G. D. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**, Boston, v. 353, n. 16, p. 1685-93, 2005.

RUBENFELD, G.D.; HERRIDGE M.S.. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. **Chest**, Chicago, v. 131, n. 2, p. 554-62, 2007.

SANTANA, M. C. et al. Prone position prevents regional alveolar hyperinflation and mechanical stress and strain in mild experimental acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, Amsterdam, n. 167, p. 181-8, 2009.

SANTOS, C. L. et al. Effects of different tidal volumes in pulmonary and extrapulmonary lung injury with or without intraabdominal hypertension. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 38 n. 3 p. 499-508, 2012.

SILVA, P. L. et al. Recruitment maneuvers modulate epithelial and endothelial cell response according to acute lung injury etiology. **Crit Care Med**, New York, v. 41, n.10, p. 256-65, 2013.

SCHROMM, A.B. et al. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. **Eur J Biochem**, Berlin, v. 267, n. 7, p. 2008-13, 2000.

SIGURDSSON, M. I. et al. Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. **Acta Anaesthesiol Scand**, Aarhus, v. 57, n. 1, p. 37-45, 2013.

SINCLAIR, S. E. et al. Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical ventilation. **Crit Care Med**, New York, v. 32, n. 12, p. 2496-501, 2004.

SLUTSKY, S. A.; RANIERI, V. M. Ventilator-induced lung injury. **N Engl J Med**, Boston, v. 369, n. 22, p. 2126-36, 2013.

STEINMÜLLER, M. et al. Endotoxin induced peritonitis elicits monocyte immigration into the lung: implications on alveolar space inflammatory responsiveness. **Respiratory Research**, London, v. 7, n. 1, p. 30, 2006.

SUD, S. 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**, Ottawa, v.178, n. 9, p. 1153-61, 2008.

SUD, S. et al. Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systemic review and meta-analysis. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 36, n. 4, p. 585-599, 2010.

TACCONE, P. et al. Prone positioning in patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, Chicago, v. 302, n. 18, p. 1977-84, 2009.

TAPPING, R. I. et al. Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides. **J Immunol**, Baltimore, v. 165 n. 10, p. 5780-7, 2000.

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**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1301-8, 2000.

THILLE, A. W. et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 187, n. 7, p. 761-7, 2013.

VALENZA, F. et al. Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: does lung strain distribution play a role? **Crit Care Med**, New York, v. 33, n. 2, p. 361-7, 2005.

VIEILLARD-BARON, A. et al. Prone positioning unloads the right ventricle in severe ARDS. **Chest**, Chicago, v.132, n. 5, p. 1440-6, 2007.

VILLAR, J.; SLUTSKY, A. S. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, New York, v. 140, n. 3, p. 814-6, 1989.

VILLAR, J. et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. **Intensive Care Med**, New York, v. 37, n. 12, p. 1932-41, 2011.

ZHOU, G. J. et al. Evaluation of the inflammatory response in a two-hit acute lung injury model using [18F]FDG microPET. **Exp Ther Med**, Athens, v. 6, n. 4, p. 894-8, 2013.

WARNER, A. E. Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. **Clin Chest Med**, Philadelphia, v. 17, n.1, p. 125-35, 1996.

WARE, L. B; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N England J Med**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1334-49, 2000.

WEBB, H. H.; TIERNEY, D. F. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. **Am Rev Respir Dis**, Baltimore, v. 110, n. 5, p. 556-65, 1974.

WRIGHT, S.D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, New York, v. 249, n. 4975, p. 1431-3, 1990.

YANG, R. B. et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, London, v. 395 n. 6699, p. 284-8, 1998.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Artigo

**The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats**

Aydra Mendes Almeida Bianchi<sup>1,2</sup>, Maycon Moura Reboredo<sup>1,2</sup>, Leda Marília Fonseca Lucinda<sup>1,2</sup>, Fernando Fonseca Reis<sup>1,2</sup>, Manfrinni Vinícius Alves Silva<sup>1,2</sup>, Maria Aparecida Esteves Rabelo<sup>1</sup>, Marcelo Alcantara Holanda<sup>3</sup>, Júlio César Abreu Oliveira<sup>1</sup>, José Ángel Lorente<sup>4</sup>, Bruno do Valle Pinheiro<sup>\*1,2</sup>

1. Pulmonary Research Laboratory, Federal University of Juiz de Fora, Av. Eugênio do Nascimento - s/nº, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

2. Center of Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Khelmer - s/n, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-900, Brazil

3. Laboratory of Respiration, Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo – 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, 60430-140, Brasil

4. University Hospital of Getafe, Carretera de Toledo A-42, Km 12500, Getafe, Spain

\*Corresponding author

Aydra Mendes Almeida Bianchi: aydra@ig.com

Maycon Moura Reboredo: mayconreboredo@yahoo.com.br

Leda Marília Fonseca Lucinda: ledamarilia@yahoo.com.br



Fernando Fonseca Reis: fernandocajuri@yahoo.com.br

Manfrinni Vinícius Alves Silva: manfrinni104@gmail.com

Maria Aparecida Esteves Rabelo: maerabelo@gmail.com

Marcelo Alcantara Holanda: marceloalcantara2@gmail.com

Júlio César Abreu Oliveira: julioabreuoliveira@gmail.com

José Ángel Lorente: joseangel.lorente@salud.madrid.org

Bruno do Valle Pinheiro: bvallepinheiro@gmail.com

## Abstract

**Introduction:** The benefits of prone position ventilation are well demonstrated in the severe forms of acute respiratory distress syndrome (ARDS), but not in milder forms of this condition. We therefore investigated the effects of the prone position on arterial blood gases, lung inflammation and histology in an experimental mild acute lung injury model.

**Methods:** Acute lung injury was induced in adult male Wistar rats by intraperitoneal *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection (5 mg/kg). After 24h, the animals with PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> between 200 and 300 mmHg were anesthetized and randomized into 2 groups according to their position during ventilation (prone [n=6] and supine [n=6]). Both groups were compared with a control group (n=5) that received intraperitoneal saline and was ventilated in the supine position. All of the groups were ventilated for 1h with volume-controlled ventilation mode, with tidal volume of 6 ml/kg, respiratory rate of 80 breaths/min, positive end-expiratory pressure of 5 cmH<sub>2</sub>O, and an inspired oxygen fraction of 1.

**Results:** Significantly higher lung injury scores were observed in the LPS-supine group compared to LPS-prone and control groups ( $0.32 \pm 0.03$ ;  $0.17 \pm 0.03$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.001$ ), mainly due to a higher neutrophil infiltration level in the interstitial space and more proteinaceous debris in that filled the airspaces. Similar differences were observed when the gravitational dependent lung regions (dorsal in the supine group and ventral in the prone group –  $0.34 \pm 0.05$  and  $0.22 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) and non-dependent lung regions (ventral in the supine group and dorsal in the prone group –  $0.29 \pm 0.04$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) were analyzed separately. The BAL neutrophil content was also higher in the LPS-supine group compared to the LPS-prone and control groups. There were no

significant differences in the wet/dry ratio and gas exchange levels among the three groups.

**Conclusions:** In this experimental extrapulmonary mild acute lung injury model, prone position ventilation for 1 hour, when compared with supine position ventilation, was associated with lower lung inflammation and injury, but without any impact on arterial oxygenation and lung edema.

**Keywords:** acute respiratory distress syndrome, experimental model, prone position, ventilator induced injury.

## Introduction

In acute respiratory distress syndrome (ARDS), diffuse alveolo-capillary barrier injury induces inflammatory edema, which increases lung weight. The edematous lung applies a superimposed pressure that collapses the dependent lung regions, which creates a heterogeneous disease [1]. Moreover, the lung bases become compressed by the heart weight and the pressure from the abdominal contents, which increases the atelectasis in the dependent lung regions. Because the dependent regions are more perfused than the non-dependent regions, a large ventilation/perfusion mismatch occurs in ARDS patients, resulting in severe hypoxemia [2]. The prone position reduces the supine gradient of the transpulmonary pressure and relieves both the cardiac and abdominal compression of lung tissue, reducing the collapsed area amount, which is redistributed from the dorsal to the ventral regions [3]. Shifting the patient to the prone position does not change the blood flow distribution, which remains higher in the dorsal regions, which becomes a non-dependent and recruited area. A better ventilation-perfusion ratio is responsible for the oxygenation and CO<sub>2</sub> clearance improvements that are seen with prone positioning [4].

The prone position was also shown to reduce ventilator-induced lung injury (VILI) by creating a more homogeneous transpulmonary pressure gradient distribution by reducing overinflated and collapsed areas, which results in lower lung stress and strain [5]. Additionally, the more efficient oxygenation and ventilation that is obtained with the prone position may allow for reduction in the applied inspired oxygen fraction (FIO<sub>2</sub>) and airway pressures, reducing the risks of VILI [6, 7]. The capacity of the prone position in reducing VILI is assumed to be an important factor

that is responsible for the improvement in severe ARDS patients who present with lower mortality when ventilated in the prone position compared to supine position [8]. However, this impact on mortality was not seen among patients with less severe disease, even though they presented other benefits, such as increased oxygenation, reduced collapsed areas, and an improved hemodynamic profile [9,10,11].

Since the effects of the prone position may vary among different acute lung injury severities, the better results observed in the more severe patients may emerge because the protection against VILI, which occurs only in more injured lungs. Furthermore, most of the experimental studies that evaluated the influence of the prone position on VILI were conducted in severe lung injury models, and it is not known if the same benefits occur in the milder forms [12, 13]. Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the effects of prone positioning on lung inflammation and the physiological parameters in an experimental mild extrapulmonary acute lung injury (ALI) model. Additionally, the effect of prone positioning on lung injury in the dependent and non-dependent regions was also studied.

## Methods

### Animal preparation

This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experiments of Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Seventeen adult male Wistar rats (weighing  $310 \pm 12$  g) were obtained from the Reproduction Biology Center, Federal University of Juiz de Fora vivarium (Brazil). Over the week prior to the experiment, groups of three animals were housed in clear plastic cages with stainless steel wire lids and pinewood shavings as bedding. Additionally, the rats were kept in an animal room with controlled environmental conditions (12-h light/12-h dark cycle, temperature 22 °C) on closed ventilated shelves. The animals were fed with rat chow pellets (an average of 25 g daily) and received water at libitum.

### Experimental protocol

The animals received either *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS serotype 055:B5, purified by phenol extraction, Sigma-Aldrich, Israel) intraperitoneally (5 mg/kg) that was dissolved in 0.5 ml of 0.9% saline solution (LPS group) or an equivalent amount of saline alone (control group). After 24 hours, the animals were anesthetized with an intraperitoneal bolus of midazolam (5 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg), and the trachea was cannulated with a 14-gauge tube. A left carotid line was used to obtain blood samples for arterial blood gas analysis (ABL 90 flex, Radiometer, Copenhagen, Denmark) and to measure the mean arterial blood pressure (MAP) (PowerLab, AD Instruments, USA). A polyethylene catheter was introduced into the jugular vein for saline infusion to maintain the MAP above 60 mmHg. The rats were then paralyzed (rocuronium 1 mg/kg, intravenously) and

mechanically ventilated (Inspira ASV, Harvard Apparatus, USA) with the following parameters: tidal volume ( $V_T$ ) = 6 ml/kg, respiratory rate (RR) = 80 breaths/minute, inspiratory to expiratory ratio = 1:2,  $FIO_2$  = 1.0, and positive end-expiratory pressure (PEEP) = 5 cmH<sub>2</sub>O. After 5 minutes of ventilation (baseline), an arterial blood gas analysis was performed and the animals in the LPS group with arterial oxygen partial pressure ( $PaO_2$ ) between 200 and 300 mmHg were randomized to supine (LPS-supine group) or prone (LPS-prone group) ventilation, with the same ventilator parameters, for 1 hour. The control group animals were ventilated in the supine position, with the same parameters, for 1 hour (control group) (Figure 1).

After the ventilation period ( $t = 60$  min), an arterial blood sample for blood gas analysis was obtained. Thereafter, a laparotomy was performed and the animals were euthanized by exsanguination through a section of the abdominal aorta. After performing a bronchoalveolar lavage (BAL), the lungs were extracted for further analysis (see below).

### **Respiratory and hemodynamic measurements**

The mean arterial pressure was measured each 15 minutes for 1 hour. Arterial blood samples for gas analysis were obtained at baseline (used to randomize the animals) and at  $t=60$  min, just before animal sacrifice.

### **Lung histology**

Lungs were removed in blocks, and the lower right lobes were separated, fixed in 10% buffered formaldehyde, and then processed for paraffin embedding. Four-micrometer thick slices, which contained the ventral and dorsal regions, were cut and stained with hematoxylin-eosin. Morphological examinations were performed by two

investigators in a blinded way, with a conventional light microscope (Zeiss, Hallbergmoos, Germany).

Lung injury was quantified using a weighted scoring system, as described elsewhere [14]. Briefly, 20 random fields at a magnification of 400x, 10 in the ventral region and 10 in the dorsal region, were independently scored. Values of zero, one or two were used to represent the severity based on the following findings: neutrophils in the alveolar space, neutrophils in the interstitial space, hyaline membranes, proteinaceous debris filling the airspaces, and alveolar septal thickening. To generate a lung injury score, the sum of the five variables were weighted according to the relevance ascribed to each one. The resulting score was a continuous value between zero (normal) and one (the most severe injury). Additionally, the extent of each lung injury score component was calculated based on the sum of the value (zero, one, or two) for each of the 20 analyzed fields.

### **Bronchoalveolar lavage (BAL)**

The left lung was washed three times via a tracheal tube with 4 ml of phosphate-buffered saline solution containing ethylenediamine tetraacetic acid (10 nM). The fluid was centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes to separate the cellular from the non-cellular elements. Total leukocyte numbers were measured in a Neubauer chamber under light microscopy after diluting the samples in Turk solution (2% acetic acid). The cell pellet was resuspended in phosphate-buffered saline solution and stained with May-Grunwald-Giemsa for differential cell counts, which were performed with a minimum of 200 cells.

### **Wet-to-dry lung weight ratio (W/D ratio)**



The W/D ratio was determined in the upper right lobe, as previously described [15]. Briefly, the upper right lobe was isolated and weighed (wet weight) using a precise balance (Ohaus Adventure, Brazil). Then, it was dried in a microwave at low power (200 W) for five minutes. The drying process was repeated until the difference between two consecutive measurements were less than 0.002 g. The last weight was considered the dry one.

### **Statistical analysis**

The normality of the data was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. The parametric data were expressed as mean  $\pm$  standard error, while the non-parametric data were expressed as median (interquartile range). Parametric data were analyzed using a two-way analysis of variance followed by the Tukey test when required. Nonparametric data were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test. Adjustments for repeated measures were performed according to the Bonferroni correction. A **P** < 0.05 was considered significant. All statistical analysis were performed using SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Illinois, USA).

### **Results**

Only one animal died during the 24-hour period between the LPS intraperitoneal injection and the beginning of the mechanical ventilation (survival rate of 94.4%), and no animals died during the 1-hour mechanical ventilation period.

At baseline, the PaO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub> levels were lower in the LPS-supine and

LPS-prone groups than in the control group, and the pH was higher in the control and LPS-prone groups compared with the LPS-supine group. After 60 minutes of mechanical ventilation, there were no significant differences among the three groups regarding the arterial blood gas parameters. The groups did not differ in MAP, neither at baseline nor at the end of the experiment (Table 1).

The BAL cellularity was significantly higher in the LPS-supine group compared with the control group. An increase in the mean neutrophil content was observed in the differential BAL cell counts in the LPS-supine group compared with the LPS-prone and control groups (Figure 2). There was no significant difference in the W/D ratios among the three groups.

The overall lung injury scores were higher in the LPS-supine group compared to LPS-prone and control groups ( $0.32 \pm 0.03$ ;  $0.17 \pm 0.03$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.001$ ). The same differences were observed when the gravitational dependent lung regions (dorsal in the supine group and ventral in the prone group –  $0.34 \pm 0.05$  and  $0.22 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) and the non-dependent lung regions (ventral in the supine group and dorsal in the prone group –  $0.29 \pm 0.04$  and  $0.13 \pm 0.04$ , respectively) ( $p < 0.05$ ) were analyzed separately (Figure 3). The analysis of the variables that compose the lung injury score showed higher neutrophil infiltration in the interstitial space and more proteinaceous debris filling of the airspaces in the LPS-supine group compared to the other groups. The LPS-prone group showed lower neutrophil infiltration in the non-dependent region interstitial spaces compared to the dependent regions (Table 2) (Figure 4).

## Discussion

In this study, we observed that prone positioning reduced the deleterious effects of mechanical ventilation on the lungs with intraperitoneal LPS-induced injury. This protective effect was demonstrated by the reduction of inflammatory cells, particularly neutrophils, in the BAL fluid, and by lower lung injury scores, which were mainly due to decreased neutrophil infiltration in the interstitial space and proteinaceous debris filling of the airspaces. However, the lower lung injury scores observed with prone positioning were associated neither with improvements in gas exchange nor with reduction of lung edema, as measured by the W/D ratio, probably because the injuries were mild.

In this model, lung injury was induced by intraperitoneal LPS injection, which is an important constituent of gram-negative bacterial cells involved in the pathogenesis of both direct (i.e., pneumonia) and indirect (i.e., sepsis) lung injury [16]. When administered intraperitoneally, LPS induces a well reproducible mild lung injury that is characterized by neutrophil accumulation in the interstitium, mild epithelial permeability changes, and edema, followed by tissue repair without fibrosis [17]. In this study, lung injury was demonstrated by a lower baseline PaO<sub>2</sub> level in the LPS groups compared to the control group. Moreover, the LPS groups had lower bicarbonate levels, which was in accordance with a systemic inflammatory response.

The protective effect of the prone position against VILI was demonstrated in other studies that evaluated normal and previously injured lungs. In studies conducted with animals with initially normal lungs, prone position ventilation reduced or delayed the occurrence of lung injury that was induced by ventilation with large tidal volumes, such as 35 ml/kg in Valenza's study [18] and 70 ml/kg in Broccard's

study [19]. Although high  $V_T$  are necessary to induce VILI in previously normal lungs, these ventilatory adjustments are not normally applied, making it difficult to interpret these results in a clinical context.

Among the studies that evaluated the effects of ventilation in the prone position in previously injured lungs, Broccard et al studied dogs with acute lung injury that was induced by oleic acid. They demonstrated that the prone position, compared with the supine position, was associated with lower histologic lung injury scores, higher  $PaO_2$  levels, and lower venous admixture levels. However, the animals in both groups were ventilated with high tidal volumes (approximately 35 ml/kg), which may have maximized the lung injury and favored the occurrence of the prone position protective effect.

Nevertheless, this will not occur in clinical practice [12]. Santana et al showed that, in mild lung injured rats induced by intraperitoneal paraquat, one hour of mechanical ventilation in the prone position compared to the supine position was associated with better oxygenation, reduction in atelectasis areas, and hyperinflation. Additionally, a lower type III procollagen expression level, which is an early marker of lung parenchyma remodeling, usually presented in lungs that were submitted to elevated and cyclic pressures [19]. In this study, the usual mechanical ventilation conditions were not observed because the animals were maintained without PEEP. Consequently, it was difficult to quantify the protective effect of the prone position. In our study, we chose to ventilate the animals with the recommended mild lung injury parameters, which included a low tidal volume (6 ml/kg) and a low PEEP level (5  $cmH_2O$ ), to evaluate the impact of the prone position under conditions seen in daily practice. Even after adjusting the mechanical ventilation level with the protective parameters, the prone position was associated with lower lung injury scores.

The prone position reduces VILI by mechanisms that are not well established. It is speculated that at least part of the protective effect is due to a reduction of the collapsed areas at the end of expiration. With the prone position, the dorsal areas, where the lung mass is anatomically greater, assume a non-dependent position and are recruited, while the ventral areas, which have a smaller tissue mass, are turned to a dependent position. Therefore, the increased aeration in the dorsal areas exceeds the decreased aeration in the ventral regions, and the net result is an improvement in the residual functional capacity [3, 20]. Other facts contribute to the alveolar recruitment that is seen with prone positioning, such as the reduction of the compression imposed on the lungs by the heart weight and abdominal pressure [21]. With an improved residual functional capacity, the tidal volume will be distributed to a greater pulmonary area, resulting in lower strain, which is an important factor associated with VILI [22]. Prone positioning also determines a more homogeneous distribution of transpulmonary pressure across the lungs due to alterations in the shape and compliance of the chest wall, resulting in a lower and more uniform stress and strain distribution throughout the lungs [23].

Taking into account the possible mechanisms by which prone positioning decreases VILI, it is expected that its effects are more pronounced in the more severe ARDS forms, in which the alveolar collapse is larger. Actually, in the first four large randomized clinical trials that investigated the effects of prone positioning on clinical outcomes, no impact on mortality was observed [25, 26, 27, 28]. However, Gattinoni et al, in an individual patient meta-analysis of these studies, showed that if only severely hypoxemic patients ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  less than 100 mmHg) were considered, then prone positioning was associated with mortality reduction [10]. This finding was confirmed by the PROSEVA study, which showed that the prone position reduced the

mortality rate within 28 and 90 days among patients with ARDS and a  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  ratio less than 150 mmHg [8]. Our results showed that even in mild levels of lung injury and with protective mechanical ventilation, prone positioning is able to decrease pulmonary inflammation. However, it is not known if these benefits have a clinical significance that justifies the adoption of periods of prone position among patients with mild acute lung injury.

Our study has important limitations that must be considered. The LPS intraperitoneal injection induced acute lung injury model was used; therefore, the observed results cannot be extrapolated to other experimental models, different injury levels, and, specifically, to clinical conditions. The experiment had a short duration of only one hour, and it is not possible to infer the impact of prone positioning during longer periods. Because of the technical constraints of the mechanical ventilator, the experiments were conducted with  $\text{FIO}_2$  of 1, which may have increased the lung injury level due to oxidative stress. As all of the groups were ventilated with the same  $\text{FIO}_2$ , we believe that this limitation did not compromise the achieved results.

## **Conclusion**

In this experimental mild acute lung injury model that was induced by intraperitoneal LPS, the prone position was associated with a lower BAL fluid neutrophil levels and lower lung injury scores. However, there was no impact on gas exchange and pulmonary edema, as evaluated by the W/D ratios. These results suggest that we should continue to study the role of prone positioning for VILI prevention, even in the mild forms of acute lung injury.

**Key messages**

- The prone positioning reduced the deleterious effects of mechanical ventilation on the lungs with intraperitoneal LPS-induced injury.
- The prone position was associated with lower inflammatory cells, particularly neutrophils, in the BAL fluid, and lower lung injury scores, which were mainly due to decreased neutrophil infiltration in the interstitial space and proteinaceous debris filling of the airspaces.

**List of abbreviations**

ALI: acute lung injury; ARDS: acute respiratory distress syndrome; BAL: bronchoalveolar lavage;  $FIO_2$  : inspired oxygen fraction;  $HCO_3$ : bicarbonate level; H&E: Hematoxylin and eosin; I:E: inspiratory to expiratory ratio; LPS: lipopolysaccharide; MAP: mean arterial blood pressure;  $PaO_2$ : arterial oxygen partial pressure; pH: arterial pH; PEEP: positive end-expiratory pressure; RR: respiratory rate; VILI: ventilator-induced lung injury;  $V_T$ : tidal volume; W/D ratio: wet-to-dry lung weight ratio

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

AMAB contributed to animal preparation, performance of experimental work, analysis of data, and drafting of the manuscript. MMR contributed to experimental design, performance of experimental work, analysis of data, statistical analysis, and drafting of the manuscript. LMFL contributed to animal preparation, performance of

experimental work, analysis of histological and BAL data, and drafting of the manuscript. FFR contributed to animal preparation, performance of experimental work, analysis of data, and drafting of the manuscript. MVAS contributed to animal preparation, performance of experimental work, and drafting of the manuscript. MAER contributed to analysis of histological data, and drafting of the manuscript. MAH contributed to experimental design, and supervision and overview of entire project. He was involved in revising the manuscript critically for important intellectual content. JCAO contributed to experimental design, drafting of the manuscript, and supervision and overview of entire project. JAL contributed to experimental design, and supervision and overview of entire project. He was involved in revising the manuscript critically for important intellectual content. BVP contributed to experimental design, supervision of experimental work, statistical analysis, drafting of the manuscript, and supervision and overview of entire project. All authors revised the manuscript and approved its final version.

### **Acknowledgments**

This study was supported by a research grant from Rede Mineira TOXIFAR, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Center of Reproductive Biology and Programa de Apoio ao Recém-Doutor/Propesq/UFJF (2013/2014). We would like to thank Rafael Bastos for the English review of the manuscript.



## References

1. Pelosi P, D'Andrea L, Vitale G, Pesenti A, Gattinoni L: **Vertical gradient of regional lung inflation in adult respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:8-13.
2. Albert RK, Hubmayr RD: **The prone position eliminates compression of the lungs by the heart.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:1660-1665.
3. Gattinoni L, Taccone P, Carlesso E, Marini JJ: **Prone position in acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **188**:1286-1293.
4. Richter T, Bellani G, Harris RS, Melo MFV, Winkler T, Venegas JG, Musch G: **Effect of prone position on regional shunt, aeration, and perfusion in experimental acute lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **172**:480-487.
5. Galiatsou E, Kostanti E, Svarna E, Kitsakos A, Koulouras V, Efremidis SC, Nakos G: **Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**:187-197.
6. Sinclair SE, Altemeier WA, Matute-Bello G, Chi EY: **Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical ventilation.** *Crit Care Med* 2004, **32**:2496-2501.
7. Broccard AF, Hotchkiss JR, Suzuki S, Olson D, Marini JJ: **Effects of mean airway pressure and tidal excursion on lung injury induced by mechanical ventilation in an isolated perfused rabbit lung model.** *Crit Care Med* 1999, **27**:1533-1541.
8. Guérin C, Reignier J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G, Bengler C, Richecœur J, Gainnier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R, Baboi L, Ayzac L, PROSEVA Study Group: **Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome.** *N Engl J Med* 2013, **368**:2159-2168.
9. Sud S, Friedrich JO, Taccone P, Polli F, Adhikari NK, Latini R, Pesenti A, Guérin C, Mancebo J, Curley MA, Fernandez R, Chan MC, Beuret P, Voggenreiter G, Sud M, Tognoni G, Gattinoni L: **Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systemic review and meta-analysis.** *Intensive Care Med* 2010, **36**:585-599.
10. Gattinoni L, Carlesso E, Taccone P, Polli F, Guérin C, Mancebo J: **Prone positioning improves survival in severe ARDS: a pathophysiologic review and individual patient meta-analysis.** *Minerva Anestesiol* 2010, **76**:448-454.

11. Vieillard-Baron A, Charron C, Caille V, Belliard G, Page B, Jardin F: **Prone positioning unloads the right ventricle in severe ARDS.** *Chest* 2007, **132**:1440-1446.
12. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Ravenscraft SA, Marini JJ: **Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome.** *Crit Care Med* 1997, **25**:16-27.
13. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ: **Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs.** *Crit Care Med* 2000, **28**:295-303.
14. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM, on behalf of the Acute Lung Injury in Animals Study Group: **An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **44**:725-738.
15. Peterson BT, Brooks JA, Zack AG: **Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs.** *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1982, **52**:1661-1663.
16. Chen H, Bai C, Wang X: **The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine.** *Expert Rev Respir Med* 2010, **4**:773-783.
17. Zhou GJ, Jiang SY, Zhang M, Gan JX, Jiang GY: **Evaluation of the inflammatory response in a two-hit acute lung injury model using [18F]FDG microPET.** *Exp Ther Med* 2013, **6**:894-898.
18. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, Tedesco C, Maccagni P, Fossali T, Aletti G, Porro GA, Irace M, Carlesso E, Carboni N, Lazzerini M, Gattinoni L: **Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: does lung strain distribution play a role?** *Crit Care Med* 2005, **33**:361-367.
19. Santana MC, Garcia CS, Xisto DG, Nagato LK, Lassance RM, Prota LF, Ornellas FM, Capelozzi VL, Morales MM, Zin WA, Pelosi P, Rocco PR: **Prone position prevents regional alveolar hyperinflation and mechanical stress and strain in mild experimental acute lung injury.** *Respir Physiol Neurobiol* 2009, **167**:181-188.
20. Edgcombe H, Carter K, Yarrow S: **Anaesthesia in the prone position.** *Br J Anaesth* 2008, **100**:165-183.

21. Albert RK, Hubmayr RD: **The prone position eliminates compression of the lungs by the heart.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:1660–1665.
22. Mutoh T, Guest RJ, Lamm WJ, Albert RK: **Prone position alters the effect of volume overload on regional pleural pressures and improves hypoxemia in pigs in vivo.** *Am Rev Respir Dis* 1992, **146**:300-306.
23. Pelosi P, D'Andrea L, Vitale G, Pesenti A, Gattinoni L: **Vertical gradient of regional lung inflation in adult respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:8-13.
24. Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A, Taccone P, Mascheroni D, Labarta V, Malacrida R, Di Giulio P, Fumagalli R, Pelosi P, Brazzi L, Latini R; Prone-Supine Study Group: **Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure.** *N Engl J Med* 2001, **345**:568-573.
25. Guerin C, Gaillard S, Lemasson S, Ayzac L, Girard R, Beuret P, Palmier B, Le QV, Sirodot M, Rosselli S, Cadiergue V, Sainty JM, Barbe P, Combourieu E, Debatty D, Rouffineau J, Ezingard E, Millet O, Guelon D, Rodriguez L, Martin O, Renault A, Sibille JP, Kaidomar M: **Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2004, **292**:2379-2387.
26. Mancebo J, Fernández R, Blanch L, Rialp G, Gordo F, Ferrer M, Rodríguez F, Garro P, Ricart P, Vallverdú I, Gich I, Castaño J, Saura P, Domínguez G, Bonet A, Albert RK: **A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:1233-1239.
27. Taccone P, Pesenti A, Latini R, Polli F, Vagginelli F, Mietto C, Caspani L, Raimondi F, Bordone G, Iapichino G, Mancebo J, Guérin C, Ayzac L, Blanch L, Fumagalli R, Tognoni G, Gattinoni L: **Prone positioning in patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2009, **302**:1977-1984.

**Table 1 Mean arterial pressure and arterial blood gas parameters at the beginning and end of the experiment**

Variable	Control		LPS-supine		LPS-prone	
	Baseline	60-min	Baseline	60-min	Baseline	60-min
MAP (mmHg)	121 ± 12	134 ± 9	131 ± 8	117 ± 10	134 ± 20	113 ± 26
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	346 ± 21*	376 ± 23	272 ± 21	350 ± 22	251 ± 27	329 ± 18
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	49 ± 4	53 ± 3	39 ± 3	53 ± 7	49 ± 3	51 ± 3
pH	7.28 ± 0.04	7.21 ± 0.04	7.14 ± 0.04	7.10 ± 0.03	7.21 ± 0.05	7.11 ± 0.07
HCO <sub>3</sub> (mEq/L)	23 ± 1*	22 ± 1	14 ± 2	17 ± 0.4	18 ± 0.5	18 ± 0.5

All values are expressed as mean and standard error. Comparability of the groups at baseline and 60-minutes was tested with one-way ANOVA followed by Tukey's test.

\* represents significantly different values between the LPS-supine and LPS prone groups at baseline ( $p < 0.05$ ).

HCO<sub>3</sub>, bicarbonate level; MAP, mean arterial pressure; PaCO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of CO<sub>2</sub>; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of O<sub>2</sub>; pH, arterial pH.

**Table 2 Lung injury score variables analyzed**

Variables	Region	Control	LPS-supine	LPS-prone
Interstitial neutrophils	Overall	9.2 ± 1.9	29.9 ± 1.5*	15.7 ± 1.1
Alveolar neutrophils	Overall	0 (2.5)	3.5 (2.5)	2 (3.3)
Hyaline membranes	Overall	0 (0)	0 (1)	0 (0.3)
Proteinaceous debris	Overall	9.4 ± 3.2	17.7 ± 2.7**	8.0 ± 1.0
Septal thickening	Overall	17.4 ± 1.9	22.5 ± 2.4	16.5 ± 2.3
Interstitial neutrophils	Dependent	3.4 ± 1.3	15.2 ± 0.9*	10.2 ± 0.5***
Alveolar neutrophils	Dependent	0 (2)	2.5 (2.5)	1 (2.3)
Hyaline membranes	Dependent	0 (0)	0 (1)	0 (0.3)
Proteinaceous debris	Dependent	4.4 ± 1.3	9.0 ± 1.8	3.8 ± 0.5
Septal thickening	Dependent	8.4 ± 1.5	11.3 ± 1.1	9.8 ± 0.8
Interstitial neutrophils	Non-dependent	5.8 ± 1.2	14.0 ± 0.7*	5.5 ± 0.8****
Alveolar neutrophils	Non-dependent	0 (0.5)	0.5 (1.3)	0 (2)
Hyaline membranes	Non-dependent	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Proteinaceous debris	Non-dependent	5.0 ± 2.3	8.7 ± 1.0	4.2 ± 0.7
Septal thickening	Non-dependent	9.0 ± 1.3	11.2 ± 1.2	6.7 ± 1.8

Values are expressed as mean ± standard error or median (interquartile range) for normally and non-normally distributed data, respectively.

\* represents a significant difference from the control and LPS prone groups ( $p < 0.05$ ).

\*\* represents a significant difference from the LPS prone group ( $p < 0.05$ ).

\*\*\* represents a significant difference from the control group ( $p < 0.05$ ).

\*\*\*\* represents a significant difference from the dependent region in the LPS prone group ( $p < 0.05$ ).

**Figure 1 Time line of the study design**

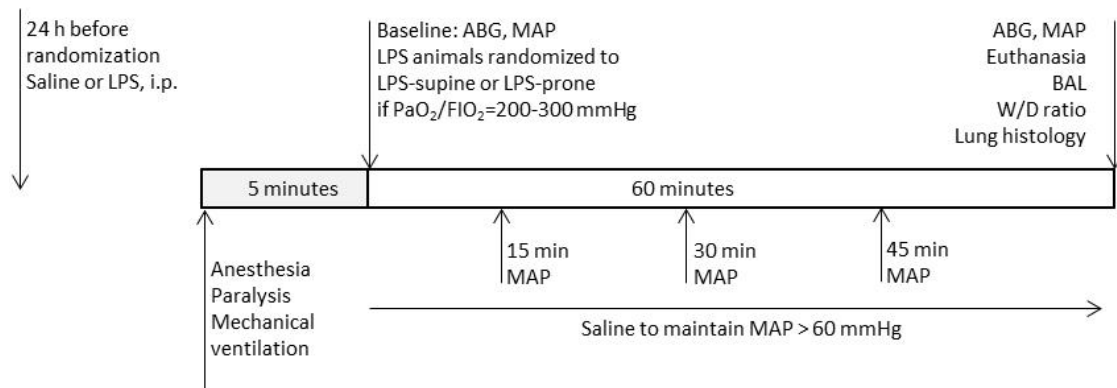


Fig. 1. Time line of the study design. MAP = mean arterial pressure; ABG = arterial blood gases; LPS = lipopolysaccharide; i.p. = intraperitoneal; BAL = bronchoalveolar lavage, W/D = wet to dry.

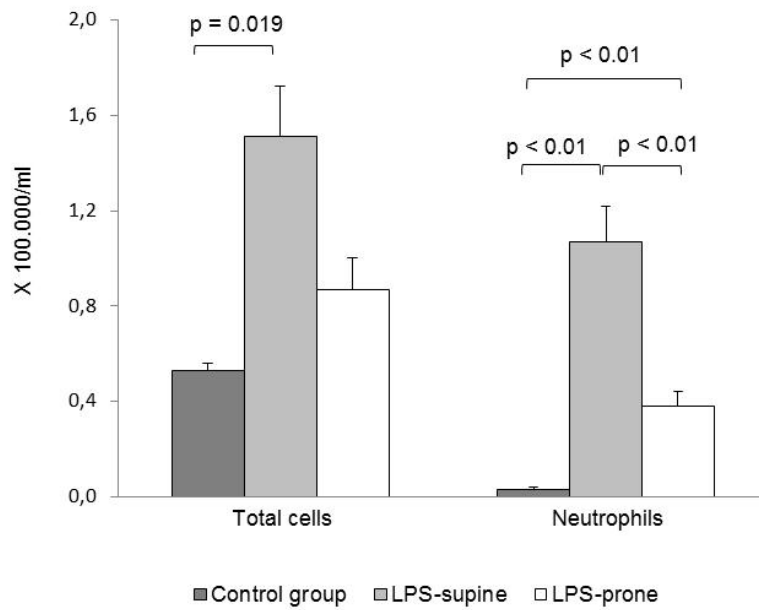
**Figure 2 Total and neutrophil cell counts in the bronchoalveolar lavage fluid**

Fig. 2. Total and neutrophil cell counts in the bronchoalveolar lavage fluid. Values are given as mean and standard error of 6 animals in LPS-supine and LPS-prone groups and 5 animals in the control group.

**Figure 3 Lung injury scores**

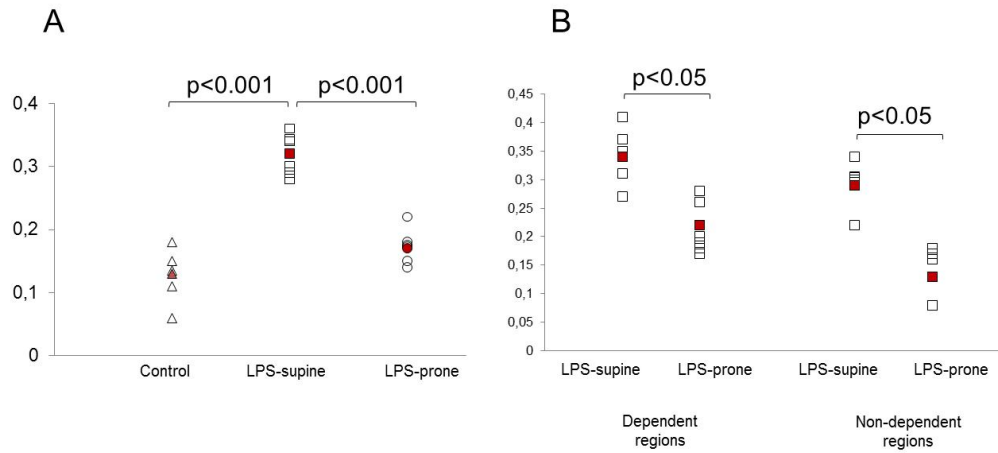


Fig. 3. Lung injury scores in the control, LPS-supine, LPS-prone groups (A) and in the dependent and non-dependent regions in the LPS-supine and LPS-prone groups (B). Scatter values are shown with white symbols and means with red symbols.



**Figure 4 Lung histology**

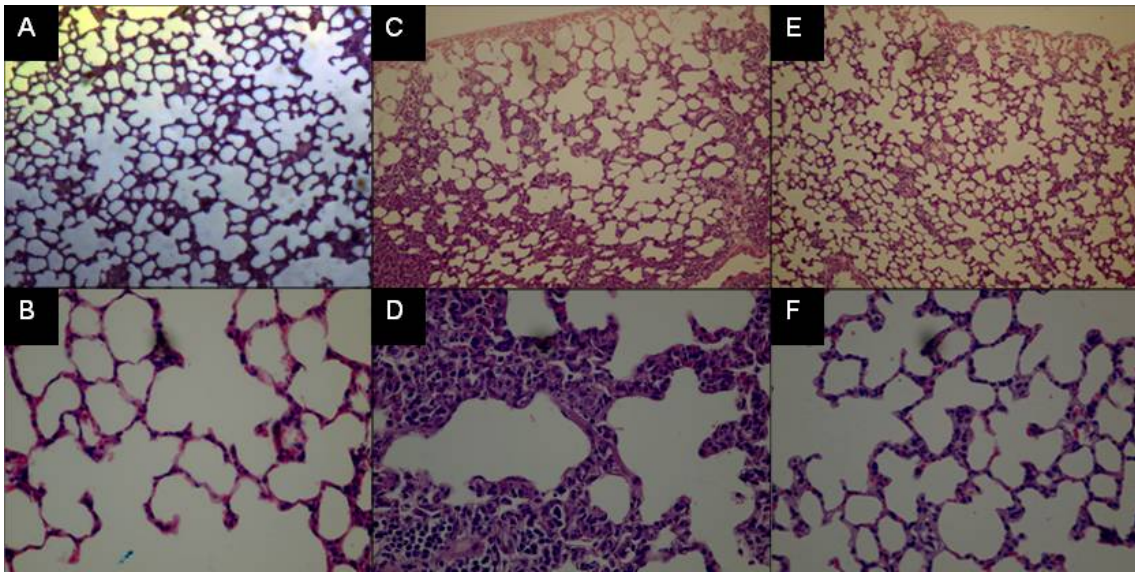


Figure 4: Right lung inferior lobe longitudinal sections from: (A) control, (C) supine, and (E) prone groups (H&E, 100 $\times$ ); (B) control, (D) supine and (F) prone groups (H&E, 400 $\times$ ). Note that prone group showed lower accumulation of neutrophils and thickening of the alveolar wall when compared to supine group.

## ANEXOS

## ANEXO A

Comprovante do parecer da comissão de ética na experimentação animal (CEEA).



## ANEXO B

Comprovante de submissão do artigo *“The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats”*.

Article title: The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats

MS ID : 2127683948157656

Authors : Aydra MA Bianchi, Maycon M Reboredo, Leda MF Lucinda, Fernando F Reis, Manfrinni VA Silva, Maria Aparecida E Rabelo, Marcelo A Holanda, Júlio CA Oliveira, José A Lorente and Bruno V Pinheiro

Journal : Critical Care

Dear Dr Pinheiro

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

[http://ccforum.com/imedia/2127683948157656\\_article.pdf](http://ccforum.com/imedia/2127683948157656_article.pdf) (802K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

[http://ccforum.com/imedia/9779784621578334\\_comment.pdf](http://ccforum.com/imedia/9779784621578334_comment.pdf)

If deemed suitable, we will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within 6 weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on [editorial@ccforum.com](mailto:editorial@ccforum.com). We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The Critical Care Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

Facsimile: +44 (0) 20 3192 2011

e-mail: [editorial@ccforum.com](mailto:editorial@ccforum.com)

Web: <http://ccforum.com/>