

2012

DISFUNÇÃO DIAFRAGMÁTICA INDUZIDA PELO VENTILADOR (VIDD)

Isabel Amorim Ferreira
Estágio de Medicina Intensiva – UCIP HFF, EPE
Orientador: Dr^a Ana Paula Fernandes



“We have no right to assume that any physical laws exist, or if they have existed up until now, that they will continue to exist in a similar manner in the future. “

Max Planck

1. INTRODUÇÃO	3
2. ANATOMO-FISIOLOGIA DO DIAFRAGMA	7
3. MODELOS ANIMAIS DE VIDD	9
3.1. ALTERAÇÕES NA FORÇA CONTRÁCTIL	9
3.2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	9
4. ESTUDOS EM HUMANOS	16
4.1. ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO DIAFRAGMÁTICA	16
4.2. ALTERAÇÕES DA ESTRUTURA E BIOQUÍMICA	19
5. DIAGNÓSTICO	22
6. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	25
6.1. ESTRATÉGIAS DE VM	25
6.2. ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS	26
7. CONCLUSÕES	29
8. BIBLIOGRAFIA	31

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que, aproximadamente 40% dos doentes admitidos em unidades de cuidados intensivos (UCI), necessitem de ventilação mecânica invasiva (VM) durante um período médio de 5 a 7 dias (1). Simultaneamente, a existência de dificuldades na autonomização ventilatória é estimada em 20 a 30% destes doentes (2). Os atrasos na autonomização ventilatória podem aumentar desnecessariamente o risco de infecção, nomeadamente a pneumonia associada ao ventilador, bem como o trauma das vias aéreas, aumentar os efeitos adversos da sedação e os custos associados aos cuidados de saúde (3,4). Por outro lado, a interrupção precoce da VM aumenta o risco de re-intubação, pneumonia nosocomial, e morte (5). O sucesso na autonomização ventilatória depende da eficácia conjugada da força contráctil dos músculos respiratórios, da carga sobre eles aplicada e da existência de estímulo respiratório do próprio doente. De forma geral, a falência deste processo resulta do desequilíbrio entre a bomba muscular respiratória, da resolução inadequada do processo patológico inicial, por aparecimento de um novo problema (por exemplo uma complicação da VM), ou uma combinação destes factores. A literatura tem demonstrado que a aplicação de protocolos de identificação sistemática de doentes em condições de interrupção da VM pode reduzir significativamente a sua duração (6, 7). Por outro lado, a identificação de índices fisiológicos capazes de prever, de forma consistente e reproduzível, o sucesso da autonomização ventilatória ainda não chegou a resultados satisfatórios (8). Uma das causas de falência neste processo é a disfunção contráctil do diafragma, por muitos anos ignorada. O diafragma, o principal músculo respiratório nos humanos, encontra-se susceptível a várias

agressões no ambiente das UCI, tais como a hipotensão arterial, hipóxia e sépsis (9, 10).

É já conhecido que a ventilação mecânica é uma espada de dois gumes. Embora seja a intervenção terapêutica que, de forma combinada com outras estratégias, permite a sobrevivência e recuperação de doentes com insuficiência respiratória, está associada a várias complicações potencialmente fatais. Em 1974, Webb e Tierney (11) demonstraram que a ventilação mecânica pode causar lesões edematosas e hemorrágicas independentes do barotrauma, designadas posteriormente de volutrauma ou lesão pulmonar associada ao ventilador (VILI) (12). Esta observação essencial conduziu posteriormente ao estudo ARDS Network (13), em 2000, que confirmou que a utilização de volumes-minuto elevados em doentes com ARDS aumenta a mortalidade. Da mesma forma que a VM pode danificar o parênquima pulmonar, os investigadores têm defendido que o ventilador também pode danificar os músculos respiratórios. Nas décadas de 1980 e início de 1990, era aceite, no seio dos intensivistas, que muitos doentes que desenvolviam insuficiência respiratória, quando confrontados com um maior trabalho respiratório, eram alvo de um estado de fadiga diafragmática. Isto levou à crença de que um período de "descanso diafragmático", conseguido através do uso de VM controlada (CMV) com total supressão da actividade diafragmática, poderia ser uma medida útil. No entanto, a pesquisa em animais tem demonstrado que a inactividade diafragmática gera lesão grave e atrofia das fibras musculares. Durante as últimas duas décadas, o nosso entendimento da forma como a ventilação mecânica pode prejudicar os músculos respiratórios avançou de forma muito significativa. Dados humanos revelaram recentemente

que a inactividade completa do diafragma associada à VM conduz à diminuição da área de secção transversal das fibras diafragmáticas. Assim, é já sabido que a VM é capaz de induzir um estado de disfunção diafragmática por diminuição da capacidade contráctil muscular, uma condição descrita inicialmente em 2004 por Vassilakopoulos e colegas (14) e denominada de disfunção diafragmática associada à ventilação mecânica (VIDD), sobre a qual esta revisão se debruça. A lesão atrófica parece resultar do aumento do *stress* oxidativo levando à activação das vias de degradação proteicas. A compreensão da lesão muscular diafragmática ainda não atingiu um estadió que permita a realização de ensaios clínicos controlados, e, deste modo, não é possível dar recomendações concretas para o doente. Enquanto isso, os médicos são aconselhados a seleccionar as configurações do ventilador que evitam simultaneamente o esforço excessivo e o repouso muscular respiratório total dos doentes. O contorno da onda de pressão da via aérea proporciona uma das melhores indicações práticas do esforço do doente, e a forma da onda pode ser usada para titular as configurações do ventilador.

A fraqueza diafragmática parece ser muito comum em pacientes sob VM (15, 16). É simultaneamente um motivo importante de VM prolongada e recorrência da insuficiência respiratória após a extubação. Assim sendo, estes factos em conjunto sugerem que a VIDD tem potencial para ter um grande impacto na prática clínica e na utilização de recursos de saúde.

O trabalho proposto pretende resumir brevemente o corpo de evidências que demonstram a existência de VIDD em modelos animais e delinear os principais mecanismos celulares que têm sido implicados neste processo. Em seguida, pretende-se relacionar essas descobertas com dados recentemente publicados

em doentes críticos, em que se demonstra um notável grau de similitude com os dados dos modelos animais. Finalmente, pretende-se a apresentação dos métodos que podem ser utilizados na prática clínica para o diagnóstico da VIDD, e a possibilidade, ainda especulativa, de utilização de diferentes estratégias de ventilação mecânica e abordagens farmacológicas para prevenir e / ou tratar esta condição.

Palavras-chave: ventilação mecânica invasiva, disfunção diafragmática, autonomização ventilatória.

2. ANATOMO-FISIOLOGIA DO DIAFRAGMA



O diafragma é a estrutura muscular de grande área (cerca de 250 cm²) que separa as cavidades torácica e abdominal. É o músculo principal da respiração, innervado pelos nervos frénicos que surgem a partir das raízes nervosas de C3 a C5. É composto por fibras de contracção lenta (tipo I) e de contracção rápida (tipo II) (17). A sua acção mecânica é melhor entendida considerando a anatomia e a sua fixação à parede da caixa torácica. Este septo músculo-tendinoso ancora-se nas costelas, vértebras lombares e esterno, estando disposto de modo transversal. Apresenta um formato de cúpula, com a abertura virada para baixo, em direcção ao abdómen, tendo duas zonas de maior concavidade, as cúpulas diafragmáticas direita e esquerda. Este órgão não apresenta uma estrutura contínua, sendo interrompido em várias zonas - hiatos -, através das quais estruturas como o esófago, a veia cava inferior, a artéria aorta e nervos vagos se prolongam entre a zona abdominal e torácica.

O diafragma, juntamente com os músculos intercostais, músculos elevadores da caixa torácica e transversos do tórax, intervém no processo de respiração, sendo aquele cuja acção é mais relevante. Na inspiração, o aumento de volume torácico gera uma pressão negativa no interior da caixa torácica, forçando o ar a entrar, enquanto na expiração, por diminuição de volume torácico, os pulmões retraem-se, aumentando a pressão interna, forçando o ar a sair. No processo de inspiração, ocorre a contracção muscular do diafragma e de outros músculos respiratórios, provocando a elevação e aumento de volume torácico. O músculo encurta, ficando com um formato mais achatado e pressionando os órgãos da cavidade abdominal. Quanto mais forçada for a inspiração, mais plano fica o diafragma. A expiração deve-se a um relaxamento

dos músculos respiratórios, sendo que o diafragma volta a distender-se, retomando o seu formato côncavo, à medida que a caixa torácica desce e diminui de volume.



Existem várias patologias que afectam o diafragma com interesse nas UCI, nomeadamente alterações da mobilidade e posição (VIDD, paralisia e parésia diafragmáticas, eventrações) e herniações congénitas ou adquiridas, com implicações no manejo dos doentes por elas afectados.

3- MODELOS ANIMAIS DE VIDD

3.1. ALTERAÇÕES NA FORÇA CONTRÁCTIL

Em modelos animais de VIDD, a contractilidade de feixes musculares diafragmáticos isolados encontra-se gravemente deprimida, apesar da conservação da integridade da transmissão neuronal e da junção neuromuscular (18). De facto, a diminuição da capacidade contráctil do diafragma associada a CMV não resulta de alterações no volume pulmonar (19) ou da compliance abdominal (20). A integridade neuromuscular e neuronal é evidenciada pela ausência de alterações na condução do nervo frénico (latência) e na resposta estável à estimulação eléctrica repetida do nervo frénico (18). Pelo contrário, o potencial de acção muscular diminui progressivamente, sugerindo que a alteração da relação entre excitação/contracção e a despolarização membranar podem ser mecanismos envolvidos na VIDD. Portanto, a alteração na musculatura diafragmática associada à CMV reside exclusivamente nas miofibrilhas. Um curto período de CMV (sem nenhum ciclo respiratório espontâneo) é capaz de promover a diminuição da força contráctil diafragmática, *in vitro* e *in vivo* (20-26). A resistência diafragmática, definida como a capacidade de manter a força contráctil face a uma carga resistiva inspiratória, é também significativamente afectada (20).

3.2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Para além da diminuição da força contráctil, várias alterações histológicas e bioquímicas foram detectadas em modelos animais de VIDD. Uma das alterações mais proeminentes é a atrofia muscular (27), uma consequência da

diminuição de síntese proteica (28) e do aumento da proteólise (29-32). A remodelação e a lesão muscular são fenómenos associados (33).

Múltiplas alterações histológicas e bioquímicas foram relacionadas com o aumento do *stress* oxidativo, que pode ser observado após 6 horas de VM em ratos (34) e após 72 horas em porcos (20). Os alvos celulares da oxidação proteica diafragmática parecem incluir elementos da maquinaria contráctil, tais como a actina e a miosina (34).

- PROTEASES

Todos os sistemas de proteases existentes nas células de mamíferos (proteases lisossomais, as caspases e o proteossoma) são activados durante a CMV (30). As caspases são proteases que degradam proteínas, particularmente complexos de actina e miosina. A caspase-3 pode ser activada pelo *stress* oxidativo, aumento do cálcio intra-celular e aumento de actividade da calpaína (35). O proteossoma é uma multi-subunidade multi-catalítica, com a participação da ubiquitina. As proteínas degradadas por esta via são inicialmente conjugadas com a ubiquitina (Ub). O processo de ligação da ubiquitina aos resíduos de lisina das proteínas a degradar envolve a activação da enzima E1 por um mecanismo ATP-dependente. A Ub activada é transferida para um transportador E2 e depois para uma proteína substrato, uma reacção catalizada pela E3 ligase. Este fenómeno repete-se até à formação de uma cadeia de Ub. As proteínas conjugadas com a Ub são reconhecidas e ligam-se pelo complexo 19 S, com libertação da Ub e entrada da proteína no complexo 20 S. A degradação ocorre no complexo 26 S, que contém múltiplos centros proteolíticos. Os péptidos produzidos pelo proteossoma são libertados e

rapidamente degradados em aminoácidos por peptidases no citoplasma, ou transportados para o retículo endoplasmático.

A proteólise pelos sistemas da calpaína e caspases está envolvida na degradação de proteínas sarcoméricas (36, 37), ao clivarem e desmontarem as proteínas miofibrilares; estas, por sua vez, são rapidamente processadas e degradadas pelo sistema ubiquitina-proteossoma (38). Por seu lado, a degradação posterior da actina-miosina é efectuada pela calpaína e caspase-3. Existem alguns trabalhos que mostram que a activação destas duas proteínas pela CMV, é essencial e possivelmente o passo limitante na atrofia muscular (37).

Foi demonstrado o aumento da concentração de conjugados Ub-proteínas no diafragma no contexto de CMV (29). Além disso, algumas enzimas chave na via de activação Ub-proteossoma são super-reguladas no diafragma, tais como as Ub ligases (enzimas E3), muscle atrophy F-box (MAFbx/Atrogin-1) e a muscle ring finger-1 (MuRF1) (39).

A apoptose e atrofia musculares podem ser minimizadas pela inibição da caspase-3 (28). O estímulo para a activação da calpaína não é conhecido, mas aparentemente a elevação de cálcio intra-celular é importante. As protéases lisossomais (como a catepsina B) são também activadas no contexto da CMV (29).

- STRESS OXIDATIVO

O aumento do stress oxidativo no diafragma é evidenciado, indirectamente, pelo aumento da oxidação proteica (aumento da carbonilação proteica) (40) e peroxidação lipídica (aumento do 8-isoprostano e hidroperóxidos, por exemplo)

(34). O início de lesão oxidativa é rápida, ocorrendo no prazo de 6 horas após a instituição de CMV em ratos (34), e é de longa duração, podendo manifestar-se ainda após 3 dias de CMV em porcos (19). O *stress* oxidativo pode modificar as proteínas envolvidas no metabolismo energético, acoplamento entre a excitação e a contracção, regulação intracelular do cálcio e geração de força contráctil (41). O *stress* oxidativo e, especialmente, a peroxidação lipídica são capazes de alterar a actividade da ATPase membranar cálcio-dependente (42), o que pode retardar a remoção do cálcio das miofibrilhas diafragmáticas, com acumulação subsequente de cálcio intra-celular e activação da calpaína.

Inquestionavelmente, a produção de radicais livres de oxigénio (ROS) é necessária para as cascatas moleculares que, eventualmente, produzem atrofia ou lesão das fibras diafragmáticas. No entanto, o gatilho de produção dos ROS continua a ser um enigma. Anteriormente, foi defendido que a VM provoca a diminuição regional da perfusão do diafragma levando à produção de ROS e, conseqüentemente, à lesão da fibra muscular (23). Davis e colegas (43) confirmaram essa hipótese sobre a redução regional da perfusão muscular provocada pela CMV. Contribuíram também para o conhecimento sobre o impacto da CMV no diafragma muscular na entrega (DO_2) e consumo de O_2 (VO_2). Ambas diminuem rapidamente (em 30 minutos) e continuam a diminuir após seis horas de CMV em comparação com a respiração espontânea. A hipóxia regional pode complicar o metabolismo muscular oxidativo e aumentar a produção de ROS mitocondrial.

- LESÃO ESTRUTURAL

Em estudos efectuados com coelhos (44) são observadas alterações estruturais nos diferentes componentes subcelulares das fibras musculares do diafragma após 2-3 dias de CMV. As alterações encontradas consistem em disrupção das miofibrilhas, aumento do número de vacúolos lipídicos no sarcoplasma, e mitocôndrias anormalmente pequenas com rotura membranar. Desta forma, ocorre alteração da contractilidade do diafragma. O número de miofibrilhas anormais correlaciona-se inversamente com a produção de força do diafragma (26). Os mecanismos das lesões descritas não foram elucidados, mas podem envolver a activação de calpaínas e lesão celular directa secundária ao aumento do *stress* oxidativo.

- REMODELAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES

As fibras musculares são classificadas como fibras de contracção lenta (tipo I) ou contracção rápida (tipo II), com base na cadeia pesada de miosina (MHC) (45). Os músculos podem modificar o fenótipo da MHC de duas maneiras: atrofia preferencial/hipertrofia de fibras que contenham uma determinada isoforma de MHC; e transformação entre os diferentes de fibras, a curto e a longo prazo (46). Experiências em ratos submetidos a CMV demonstraram modificações significativas do fenótipo MHC: em 12-18 h de CMV há uma redução simultânea da quantidade e dimensões das fibras tipos I e II (40); em 24 h de CMV, ocorre diminuição em 20% dos níveis de transcritos de RNA das isoformas do MHC 2A e 2B (47), de acordo com o preferencial de atrofia observado nos estudos acima mencionados. Esta modificação do fenótipo MHC parece contribuir para a redução da força contráctil do diafragma (uma

vez que a força produzida por fibras lentas é menor do que a força produzida por fibras rápidas), e, simultaneamente, justificar a menor resistência à fadiga observada (48). No entanto, um período mais prolongado de CMV em ratos (44-93h) em ratos resulta num padrão diferente de modificação do fenótipo MHC, com diminuição do número de fibras do tipo I e aumento das isoformas rápidas, principalmente no interior das fibras (fibras híbridas capazes de co-expressar as isoformas lentas e rápidas) (46). Aparentemente, este *switch* não compromete a contractilidade diafragmática, mas é responsável pela diminuição da resistência diafragmática (menos fibras lentas ou de resistência). A justificação para este fenómeno não é conhecida, mas pode estar relacionada com a estratégia de ventilação ou a duração de CMV (<24 h vs 44-93 h).

- FÁRMACOS

A utilização de bloqueadores neuro-musculares não parece ser responsável pela totalidade de diminuição da força contráctil associada à CMV, uma vez que esta diminuição também é identificada em estudos sem utilização desses fármacos (25). Contudo, foi demonstrado que 24 h CMV em conjugação com a administração de rocurónio têm um efeito sinérgico na depressão da contractilidade muscular, na indução de atrofia das fibras tipo II e em aumentar a produção da Ub ligase (E3) MuRF1 (39). Contudo, este efeito sinérgico não foi observado com a utilização do cisatracúrio (49). A justificação para este fenómeno não é conhecida.

- EFEITO DE OUTROS MODOS DE VM EM MODELOS ANIMAIS DE VIDD

Em PSV, o doente é capaz de desencadear cada ciclo respiratório, com o ventilador a administrar um *flow* até um limite de pressão pré-definido (ao contrário, em CMV o doente não tem nenhuma autonomia no desencadear do ciclo respiratório). Portanto, ao contrário da CMV, em que o diafragma está completamente inactivo, a PSV pode permitir a activação dos músculos inspiratórios, ainda que em menor intensidade que na respiração espontânea. Embora muitos estudos tenham investigado o impacto do CMV na fraqueza e proteólise diafragmática, existem poucos dados sobre o impacto de outros modos de VM sobre o *stress* oxidativo diafragmático. Hudson e colegas (50) mostraram que níveis elevados de PSV promovem atrofia e disfunção contráctil diafragmática. Além disso, tal como com a CMV, a PSV está associada a um aumento do *stress* oxidativo e activação das proteases. Um outro estudo recente (51) mostrou que, ao contrário da CMV, o modo PSV (6 horas) parece atenuar a atrofia diafragmática pelo suporte ventilatório. São ainda necessários mais estudos que mostrem que a PSV pode ser uma alternativa viável de limitar a atrofia muscular e disfunção diafragmática. O modo NAVA (neurally adjusted ventilatory assist) é um tipo de VM parcialmente assistida que utiliza a actividade eléctrica do diafragma para controlar o tempo e o nível de assistência fornecida. Existem evidências de que pode melhorar a sincronização entre o doente e o ventilador, minorando o risco de lesão pulmonar (52). Existe apenas um estudo em modelos animais de VIDD submetidos a NAVA, que mostrou que, quando comparada a CMV, pode diminuir o *stress* oxidativo e atrofia diafragmática (53).

4- ESTUDOS EM HUMANOS

Até muito recentemente, não era claro se os efeitos da VM no diafragma observados nos modelos animais também seriam aplicáveis em humanos. As evidências sobre a existência desta entidade começaram a acumular-se apenas na última década e mostraram um notável grau de semelhança com os dados dos modelos animais.

4.1. ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO DIAFRAGMÁTICA

A incidência, prevalência, tempo até ao desenvolvimento e progressão da fraqueza muscular respiratória em doentes sob VM não são conhecidos, não existindo nenhum estudo a analisar estas questões em detalhe. É importante notar que as ferramentas clínicas que são usadas actualmente para avaliar a força da musculatura respiratória em doentes sob VM são muitas vezes imprecisas, uma vez que são altamente dependentes do operador e do grau de colaboração do doente.

Alguns autores argumentam que, mesmo quando técnicas padronizadas são utilizadas por investigadores treinados, as medidas podem não ser fiáveis (54). Assim, o diagnóstico da disfunção diafragmática é difícil, particularmente no início da doença crítica.

No entanto, existem alguns estudos responsáveis pela medição objectiva da força muscular respiratória em doentes com VM (55). Utilizou-se um método de estimulação magnética no nervo frénico para medição da pressão diafragmática gerada em resposta a uma estimulação supra-máxima de torção

(TwPdi). Laghi e colegas (56) mediram a TwPdi em doentes clinicamente candidatos a autonomização ventilatória e mostraram fraqueza diafragmática considerável numa percentagem importante de doentes com dificuldade nesse processo. Estes dados mostram que, quando avaliados objectivamente, os doentes apresentam diminuição significativa da TwPdi, o que reflecte uma redução importante na força contráctil do diafragma. Existe uma extensa revisão das metodologias para a avaliação da musculatura respiratória nos doentes sob VM (57), mas optou-se por apenas apresentar dados relativos a testes que podem ser facilmente aplicadas nas UCI. Medidas de pressão inspiratória máxima (Pimax) são relativamente fáceis de executar, mas um valor baixo muitas vezes reflecte um esforço submáximo devido à deficiente coordenação ou cooperação do doente e não uma real fraqueza muscular respiratória. No entanto, um estudo recente utilizou a avaliação da Pimax com uma técnica de válvula unidireccional (não implica a colaboração do doente) como indicador de fraqueza muscular respiratória, e foi eficaz na capacidade de detectar os doentes sob VM passíveis de apresentarem dificuldades na autonomização ventilatória (58). A frequência respiratória e o volume corrente são facilmente monitorizados, e um padrão de respiração rápida e superficial está associada a falência na autonomização ventilatória (59); no entanto, estes parâmetros não são específicos e não indicam, necessariamente, a presença de disfunção muscular respiratória. Para superar a falta de especificidade dos testes acima referidos, podem ser efectuadas medições da pressão transdiafragmática (Pdi). São necessárias medições simultâneas das pressões esofágica (SFE) e gástrica (PGA); a Pdi é o diferencial de pressão através do diafragma. Para evitar dificuldades na interpretação da Pdi (por influência da cooperação do

doente), pode fazer-se, simultaneamente, a estimulação bilateral do nervo frénico. Tal como foi inicialmente descrito pela equipa de Similowski e colegas (60), a avaliação da Pdi é bem tolerada pela maioria dos doentes quando se utiliza a estimulação magnética transcervical do frénico vs estimulação eléctrica.

Recentemente, num estudo efectuado por Hermans e colegas (61), foi avaliada a produção de força diafragmática em 25 doentes sob VM, utilizando a estimulação magnética cervical dos nervos frénicos; os resultados demonstraram que os valores obtidos com a técnica de estimulação do nervo frénico são reprodutíveis, e que uma maior duração da MV está associada a uma perda maior de força contráctil do diafragma. O mesmo estudo também permitiu estabelecer uma relação directa entre a diminuição da força contráctil e o grau de sedação. No entanto, não foi determinado se o uso de sedativos é um factor de risco independente para a fraqueza do diafragma ou apenas um marcador de períodos mais prolongados de VM.

A magnitude da deflexão negativa da traqueal (TwPTr) durante a estimulação dos nervos frénicos pode ser usada como um substituto da Pdi em doentes entubados (62), e tem a grande vantagem de não requerer a colocação dos balões esofágico e gástrico. Watson e colegas descreveram a viabilidade e a reprodutibilidade desta medida (55). Um estudo recente realizou avaliações em série da TwPtr em doentes críticos durante um período de uma semana e demonstrou a diminuição progressiva desta medida ($32 \pm 6\%$ após 6 dias) (63).

Em resumo, os estudos humanos publicados até à data são consistentes em mostrar um maior grau de fraqueza diafragmática em doentes sob VM.

4.2. ALTERAÇÕES DA ESTRUTURA E BIOQUÍMICA DIAFRAGMÁTICA

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos na fraqueza diafragmática relatados em pacientes críticos durante a VM, a realização de biópsias diafragmáticas são mandatórias. O primeiro estudo com obtenção de amostras de tecido diafragmático, publicado no final dos anos 80 (64), consistiu numa análise *post-mortem* de recém-nascidos, em que se encontrou atrofia difusa das fibras musculares do diafragma nos doentes submetidos a VM por mais de 12 dias. O mesmo estudo revelou também que essas alterações não estavam presentes nos músculos extra-diafragmáticos dos mesmos doentes, ou no diafragma dos doentes ventilados por 7 dias ou menos. Outra estratégia que tem sido utilizada para estudar os diafragmas dos doentes sob VM é a obtenção de amostras de tecido do diafragma a partir de doadores de órgãos em morte cerebral, no momento da colheita do órgão. Em comparação com os restantes doentes em UCI, os doadores de órgãos estão relativamente salvaguardados dos efeitos confundentes da sépsis e da falência multi-orgânica. Um estudo-chave foi publicado por Levine e colegas (65) em 2008. Os investigadores avaliaram amostras de tecido diafragmático de 14 adultos doadores de órgãos em morte cerebral que foram submetidos a VM por períodos variáveis de tempo (18 a 69 horas), e compararam os resultados com amostras de oito doentes do grupo controle (submetidos a cirurgia torácica para lesões benignas ou neoplasia do pulmão localizada) com períodos de MV durante 2 a 3 horas. Os autores relataram uma atrofia de fibras de contração lentas e rápidas nos diafragmas do grupo de doadores de órgãos em comparação com os controles. Estas diferenças não foram observadas no músculo peitoral. A atrofia das fibras musculares no diafragma dos doadores de

órgãos associou-se a um aumento significativo do *stress* oxidativo (diminuição dos níveis de glutatião, uma molécula de anti-oxidante); e um aumento nos marcadores de proteólise muscular (caspase-3 e as ligases E3 ubiquitina atrogina-1 e MuRF-1). Em 2010, utilizando uma abordagem semelhante, Hussain e colegas (66) demonstraram que a VM prolongada está directamente relacionada com o aumento do *stress* oxidativo no diafragma, tal como indicado por modificações oxidativas nas proteínas do diafragma. Além de confirmar o aumento na E3 ligases de ubiquitina, este trabalho também relatou uma regulação positiva do sistema autofágico no diafragma. Este processo é um importante mecanismo regulado para degradar proteínas de longa duração e também a única via conhecida para degradação de organelos. Ocorre em níveis basais de actividade celular para executar funções homeostáticas, mas pode ser rapidamente regulada positivamente quando as células necessitam de gerar energia. A autofagia está relacionada com a regulação positiva do factor de transcrição FOXO-1. É importante notar que estas alterações eram relativamente específicas para o diafragma e não foram observadas nos músculos de controlo (quadríceps). Foi demonstrado que nos diafragmas de doentes submetidos a VM prolongada há um aumento nos níveis globais de proteínas ubiquitinadas, maior expressão de p65 de NF- κ B e maiores níveis de expressão de isoformas de calpaínas (1, 2, e 3). Um achado particularmente interessante foi a presença de lesões ultra-estruturais nas fibras musculares do diafragma, caracterizadas principalmente pela ruptura da organização miofibrilar normal (63). Realça-se o facto de que tanto as lesões ultra-estruturais como a atrofia das fibras do diafragma nos doentes sob MV correlacionam-se com o tempo total da duração da VM.

Para resumir, os estudos realizados em diafragmas de doentes sob VM confirmam amplamente os dados dos modelos animais, no que diz respeito a alterações estruturais e bioquímicas. Assim, os resultados comuns incluem o aumento do *stress* oxidativo, atrofia da fibra muscular e lesões ultra-estruturais, bem como a activação de várias vias proteolíticas principais (ubiquitina-proteassoma, caspases/calpains e lisossomas).

5- DIAGNÓSTICO

A dificuldade em estudar a VIDD está relacionada, em parte, à escassa quantidade de ferramentas de diagnóstico disponíveis. A fluoroscopia do diafragma é o método mais simples, rápido e prático de avaliar o movimento do diafragma. É, essencialmente, um método qualitativo. A redução ou ausência do movimento, ou o movimento paradoxal da cúpula diafragmática, especialmente durante o *sniffing test*, caracteriza a paralisia ou parésia hemidiafragmática (67). A fluoroscopia do diafragma exige o transporte de doentes ventilados, o que acarreta risco médico considerável. Além disso, o movimento do diafragma pode ser limitado por processos inflamatórios locais, tais como pneumonia, pleurite, derrame pleural, peritonite e abscesso sub-frénico.

O estudo da condução nervo frénico, outro método frequentemente utilizado, provoca uma sensação desagradável no doente e só é capaz de detectar alterações na condução nervosa, o que não ocorre necessariamente na disfunção do diafragma, como foi exposto.

A electromiografia de agulha do diafragma seria uma ferramenta útil para o diagnóstico e prognóstico de pacientes com disfunção diafragmática, se não acarretasse riscos importantes, como o pneumotórax (68). Existem outras técnicas não convencionais de EMG do diafragma, como a utilização de eléctrodos de superfície ou de um cateter esofágico. A colocação de eléctrodos de tórax de superfície permite a realização do EMG diafragmático de forma não invasiva, mas reveste-se de algumas limitações. Primeiro, o EMG do diafragma registado desta forma pode ser alvo de contaminação do sinal com origem em músculos adjacentes, se o plexo braquial for co-activado, particularmente com

a utilização simultânea de estimulação magnética (69). Da mesma forma, o espectro de potência e actividade espontânea com origem no diafragma pode não ser confiável por causa de *cross-talk* de sinais de músculos intercostais e abdominais, que estão activos durante a VM. Em segundo lugar, pode ocorrer redução significativa da intensidade do sinal pela gordura subcutânea. Não existe um método padrão para a colocação dos eléctrodos da parede torácica, o que torna a comparação dos dados entre os indivíduos e os estudos difícil. Em contraste, o EMG do diafragma gravado a partir de um eléctrodo esofágico é menos afectado pela obesidade e pelo cruzamento de sinais de músculos periféricos (70). Consequentemente, este último método de EMG tornou-se uma técnica cada vez mais importante do ponto de vista clínico e de investigação (71).

Uma vez que a avaliação da função do diafragma, incluindo a eficiência electromecânica, é efectuada de forma mais eficaz com a medição simultânea da Pdi e do EMG diafragmático, um catéter único com um eléctrodo esofágico e dois balões para a medição de pressão esofágica e gástrica (72) tem vantagens adicionais sobre os eléctrodos de superfície da parede do tórax.

A ultrassonografia (US) torácica é uma modalidade de imagem não invasiva e prontamente disponível à cabeceira do doente com múltiplas aplicações em medicina pulmonar, incluindo no diagnóstico de VIDD (72,73). Tipicamente, o doente é estudado em posição semi-sentada. Ao avaliar a função diafragmática em doentes sob VM, quando ocorre a entrada do ar nos pulmões e a sua insuflação, o diafragma é empurrado numa direcção caudal, dando a falsa impressão de função contráctil diafragmática normal. Portanto, ao testar a função diafragmática, o ventilador deve ser ajustado para o menor nível de

suporte possível. O diafragma surge, nas imagens de US, como uma estrutura fina, curvilínea e ecogénica, que se move em direcção caudal com a inspiração. A paralisia hemi-diafragmática é inferida pelo movimento ausente ou paradoxal da cúpula diafragmática; por outro lado, na parésia existe um movimento reduzido durante a inspiração. Várias técnicas de US têm sido usados para avaliar o movimento do diafragma, incluindo o modo B, modo-M, e as medições de alteração da espessura muscular. O modo-M é o mais fácil de executar e o que mostrou os maiores coeficientes de correlação intra e inter-observadores (75). Mostrou também ser capaz de quantificar, de forma coerente, os movimentos do diafragma. A utilidade desta técnica na avaliação da função diafragmática e previsão da evolução na autonomização ventilatória não foi relatado até 2011 (76). Os investigadores demonstraram uma prevalência de 29% de doentes com VIDD diagnosticada por US. Os doentes com VIDD apresentaram maior tempo de autonomização ventilatória. Como não existem dados acerca da excursão do diafragma em pacientes ventilados, o *cut-off* para o diagnóstico de VIDD foi estabelecido como inferior a 10 milímetros (o limite inferior da excursão para doentes saudáveis não ventilados).

6- ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

6.1. ESTRATÉGIAS DE VM

Estudos em animais indicam que a VIDD é parcialmente prevenida com a utilização de modos de VM com suporte parcial, em que é permitido um significativo grau de esforço diafragmático (21). Do ponto de vista puramente prático, parece lógico permitir o máximo de actividade diafragmática possível, desde que isso permita o conforto do doente e as trocas gasosas adequadas. No entanto, são necessários mais estudos para determinar o nível óptimo de esforço diafragmático e se existe algum método específico de VM mais eficaz para promover a acção diafragmática e impedir o desenvolvimento da VIDD (por exemplo, NAVA e outros métodos mais recentes). Em coelhos sedados, a permissão de contracções diafragmáticas parciais em AC em » 30 % parece atenuar o declínio da força de contracção diafragmática após 3 dias de VM (77). Em ratos anestesiados, a respiração espontânea durante 5 minutos, quatro vezes por dia no decurso de 24 horas de CMV impede a atrofia da fibra muscular diafragmática (78). Num doente tetraplégico, a estimulação nervosa frénica 30 minutos por dia, por 33 semanas, melhorou substancialmente a função diafragmática (79). Diversos estudos em animais demonstraram que a manutenção de esforços respiratórios espontâneos durante a VM pode evitar/melhorar a VIDD (77). Desta forma, parece evidente que se deve incentivar a actividade diafragmática permanente, desde que isso seja compatível com o conforto do paciente e adequada troca gasosa. Os efeitos de alteração dos parâmetros mais frequentes na VM, tais como VC e PEEP, necessitam de ser avaliados. Será também interessante avaliar se os novos métodos de VM (como a NAVA, PAV- proportional assist ventilation, e ASV-adaptative support

ventilation) podem ter efeito na diminuição da VIDD. Outro método que poderá ser estudado no futuro possível para assegurar a actividade contráctil do diafragma durante a VM é a estimulação diafragmática eléctrica diária intermitente, estratégia já estudada para utilização em músculos dos membros (80, 81).

6.1.1. NAVA – neurally adjusted ventilatory assist

O objectivo da ventilação mecânica em situações agudas é, muitas vezes, "ganhar tempo" para que o doente recupere de algum evento catastrófico. Idealmente, o ventilador não deve lesar os músculos respiratórios ou parênquima pulmonar. Ao longo dos últimos anos, com maior consciência do potencial de morbidade e mortalidade associadas ao suporte ventilatório em excesso ou insuficiente (82-83), e à assincronia doente-ventilador como factor de mau prognóstico (84), novas modalidades de ventilação mecânica foram introduzidas. A ventilação NAVA (neurally adjusted ventilatory assist), é um tipo de VM parcialmente assistida disponível nos modos invasivo e não invasivo. Para o registo da actividade eléctrica diafragmática (EAdi), o sistema utiliza um sistema de dez eléctrodos esofágicos incorporados em série na parte distal numa sonda nasogástrica especial. A EAdi pode ser captada em qualquer modo ventilatório, inclusive em estado de espera, sendo uma ferramenta importante na monitorização respiratória. Pode também ser usada para monitorizar a actividade eléctrica do diafragma, fornecer informações sobre o impulso respiratório, os requisitos de volume e o efeito das configurações de ventilação, e obter indicações de sedação e autonomização ventilatória. Durante a NAVA, a assistência inspiratória mecânica inicia-se no momento em que o centro respiratório é activado, e o disparo é independente de qualquer

componente pneumático. Por ser um modo que trabalha em sincronia com a excitação do diafragma, há uma diminuição no tempo de resposta do equipamento (cerca de 50 ms), favorecendo o acoplamento neuroventilatório. Durante a inspiração, a pressão fornecida é proporcional à EAdi, e a pressurização inspiratória cessa quando a activação neural da musculatura diafragmática apresenta uma queda após atingir um valor máximo. Como o trabalho do ventilador e do diafragma é controlado pelo mesmo sinal, o acoplamento entre o diafragma e o ventilador é sincronizado simultaneamente (85). A sincronização doente- ventilador é benéfica, uma vez que a assistência respiratória sincronizada permite diminuir os níveis de assistência e elimina a assincronia entre tempo respiratório mecânico e neural, evitando o risco de perda de esforços respiratórios. O NAVA proporciona uma transição suave para a respiração natural (86), facilitando a autonomização ventilatória. Este tipo de ventilação causa pressões de pico menores das vias respiratórias, em comparação com a ventilação pulmonar mecânica convencional com pressão de suporte. Teoricamente, a NAVA pode diminuir o risco de VIDD ao permitir a actividade diafragmática durante a VM e, simultaneamente, permite a monitorização da actividade diafragmática. No entanto, ainda não existem resultados publicados sobre a diminuição da incidência da VIDD com esta modalidade de VM.

6.2. ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS

É importante reconhecer que, mesmo quando se utilizam os modos de apoio parciais de VM ou permitindo períodos intermitentes de respiração espontânea, os estudos em animais mostraram a existência de *stress* oxidativo persistente

(20), bem como um défice residual na geração de força contráctil do diafragma (87), o que sugere que medidas adicionais, para além da alteração as configurações do ventilador ou do modo ventilatório, como agentes farmacológicos, podem ser necessárias para prevenir a VIDD em humanos.

Maes e colegas (88) descreveram, num modelo animal, que uma única dose elevada de metilprednisolona, em ratos submetidos a VM, protegeu o diafragma da diminuição da força contráctil relacionada com a CMV. A inibição do sistema calpaína é o mecanismo mais provável que explica o efeito protector dos corticosteróides. Note-se, no entanto, que muitas vezes os doentes sob VM são tratados de forma aguda com corticosteróides (por doença pulmonar subjacente ou no contexto de outra doença sistémica). Esta observação é muito importante, uma vez que a terapêutica com corticosteróides está associada a uma miopatia que afecta os músculos respiratórios e periféricos. De facto, o tratamento agudo dos animais com doses maciças de corticosteróides é capaz de induzir fraqueza respiratória e muscular periférica graves; no diafragma, induz uma atrofia preferencial das fibras tipo IIx (89). Os resultados acima descritos necessitam de ser validados em humanos.

Como discutido anteriormente, os estudos animais e em humanos indicam que a VM está associada a um aumento nos marcadores de *stress* oxidativo no diafragma. O tratamento com um anti-oxidante (o análogo da vitamina E, Trolox) durante a VM diminuiu a proteólise do diafragma e a perda de força contráctil em animais (90). Este antioxidante também atenua a atrofia muscular diafragmática (91). Um estudo recente em ratos mostrou que a N-acetilcisteína pode ser, no futuro, uma arma terapêutica na VIDD, ao proteger o diafragma do

stress oxidativo gerado pela VM (92). Num estudo de doentes críticos, a suplementação com vitaminas E e C reduziu a duração da VM, em comparação com doentes não-suplementados (93). Embora estes resultados sejam encorajadores e pareçam apoiar o uso de antioxidantes para prevenir a VIDD, estes agentes também podem ter efeitos deletérios, devido à sua inespecificidade de acção. Além disso, verificou-se que os efeitos benéficos da apocinina, um inibidor da produção do superóxido NADPH oxidase, sobre a VIDD em ratos pode ser mais uma função da sua capacidade para regular positivamente o inibidor da calpaína (calpastatina) e não pela sua acção anti-oxidante (94).

Estudos em animais evidenciaram o papel das principais fontes de espécies reactivas de oxigénio (ROS) geradas no diafragma durante a VM. A NADPH oxidase, que pode gerar superóxido no interior das fibras musculares, está apenas ligeiramente aumentada no diafragma de animais submetidos a VM. Por outro lado, a xantina oxidase, outra fonte potencial de superóxido, também está aumentada no diafragma durante a VM, e sua inibição melhora a contractilidade diafragmática, mas não conseguiu ter um impacto sobre a atrofia (95). Face ao exposto, verificou-se que as mitocôndrias podem ser a principal fonte de produção de ROS excessivo do diafragma durante a VM. A este respeito, as mitocôndrias isoladas de ratos sob VM libertam significativamente mais ROS e exibem evidência bioquímica de danos oxidativos (96). Assim, estudos futuros devem focar a sua atenção, não só no uso de anti-oxidantes de largo espectro de acção para a prevenção ou tratamento de VIDD, mas também sobre a utilização de fármacos com acção nas mitocôndrias.

Uma vez que há evidência de que vários sistemas proteolíticos desempenham papéis importantes no desenvolvimento da VIDD, são também alvos lógicos para intervenção terapêutica. Recentemente, foi publicado um estudo sobre o efeito da administração de bortezomib (inibidor da porção 26 S do proteossoma) sobre o diafragma em ratos ventilados e concluiu-se que parcialmente protege da VIDD, mas não da atrofia (a actividade da calpaína manteve-se) (97). Por outro lado, uma única administração de leupeptina (inibidor da calpaína / catepsina) no início da VM não só diminuiu a atrofia como também impediu o compromisso da capacidade contráctil do diafragma em ratos (98).

7- CONCLUSÕES

Existem evidências consistentes de que a VM, por si só, pode ser uma causa importante de fraqueza diafragmática, associada a uma combinação de atrofia diafragmática e lesão estrutural, uma condição denominada de VIDD. Nos doentes sob VM nas UCI é possível que vários factores confundentes (sépsis, doença de base, utilização de bloqueadores neuro-musculares e sedativos, etc) possam contribuir para a fraqueza diafragmática observada; desta forma, não é possível, actualmente, efectuar um diagnóstico definitivo de VIDD (tal como não é no caso da VILI). No entanto, a investigação sobre os mecanismos básicos subjacentes à VIDD permite-nos desenvolver um quadro conceptual para a compreensão do problema e aplicar esse conhecimento na prática clínica. Actualmente, a melhor abordagem para a prevenção da VIDD é evitar, quando possível, a CMV prolongada e a utilização de agentes de bloqueio neuromuscular. No futuro, o desafio será o desenvolvimento de novas estratégias ou modos de VM que diminuam a ocorrência da VIDD. No que diz respeito à intervenção farmacológica, o caminho parece apontar para a utilização de antioxidantes ou inibidores das vias de proteólise muscular.

Além das áreas de pesquisa em intervenções terapêuticas acima mencionadas, no futuro, será importante determinar a influência do estado prévio do diafragma e a existência de co-morbilidades que podem afectar as propriedades diafragmáticas e contribuir para a VIDD. Por exemplo, têm sido relatadas múltiplas alterações no diafragma de doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica, incluindo diminuição do teor de miosina, lesão estrutural das miofibrilas, atrofia muscular e aumento da oxidação proteica (99, 100). Simultaneamente, há também pouca informação disponível sobre a interacção

entre a VIDD e alterações metabólicas frequentemente encontradas nas UCIs, nomeadamente a hiperglicemia e a sépsis. No que se refere a este último aspecto, um estudo relatou que a VM de curta duração em ratos (4 horas) pode funcionar como uma protecção contra a disfunção diafragmática induzida por endotoxinas (101). Outras questões que surgem dos dados em modelos animais humanos dizem respeito aos possíveis efeitos da homeostase do cálcio na mecânica ventilatória. Embora as investigações até à data tenham dissecado as relações de várias vias celulares com a atrofia das fibras musculares, os mecanismos que conduzem à lesão e disfunção contráctil permanecem obscuros. São também necessários mais estudos para avaliar a recuperação do diafragma após a VIDD.

Nesta revisão, enfatizaram-se as principais características da VIDD que foram determinadas com base em estudos recentes, com um foco particular sobre os dados humanos. É importante salientar que quase todos os dados disponíveis em modelos animais foram, até agora, realizados em animais saudáveis. Foram também apresentadas estratégias de diagnóstico e perspectivas de terapêutica, ainda em fase embrionária.

8- BIBLIOGRAFIA

1. Esteban A, Anzueto A, Alia I, et al. How is mechanical ventilation employed in the intensive care unit? An international utilization review. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161: 1450–1458.
2. Esteban A, Frutos F, Tobin MJ, Alia I, Solsona JF, et al. A comparison of four methods of weaning patients from mechanical ventilation. Spanish Lung Failure Collaborative Group. *N Engl J Med*, 1995, 332: 345–350.
3. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, et al. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med*, 1995, 129:433-44.
4. Ely EW, Baker AM, Evans GW, et al. The distribution of costs of care in mechanically ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med*, 2000, 28:408-413.
5. Epstein SK, Ciubotaru RL, Wong JB. Effect of failed extubation on the outcome of mechanical ventilation. *Chest*, 1997, 112:186-192.
6. Ely EW, Baker AM, Dunagan DP et al. Effect on the duration of mechanical ventilation of identifying patients capable of breathing spontaneously. *N Engl J Med*. 1996; 335 (25):1864-9.
7. Kollef MH, Shapiro SD, Silver P, et al. A randomized, controlled trial of protocol-directed versus physician directed weaning from mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 1997;25(4):567-89.
8. Vallverdú I MJ. Weaning criteria: physiologic indices in different groups of patients. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.

9. Khan J, Harrison TB, Rich MM: Mechanisms of neuromuscular dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin* 2008; 24:165–177.
10. Herridge MS, Batt J, Hopkins RO: The pathophysiology of long-term neuromuscular and cognitive outcomes following critical illness. *Crit Care Clin* 2008; 24:179 –199.
11. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110: 556-65.
12. Dreyfuss D, Saumon G, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. In: Tobin MJ, ed. *Principles and Practice of Mechanical Ventilation*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2006:903-30.
13. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000; 342:1301-1308.
14. Vassilakopoulos T, Petrof BJ. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:336–341.
15. Laghi F, Cattapan SE, Jubran A, et al. Is weaning failure caused by lowfrequency fatigue of the diaphragm? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:120–127.
16. Watson AC, Hughes PD, Louise HM, et al. Measurement of twitch transdiaphragmatic, esophageal, and endotracheal tube pressure with bilateral anterolateral c magnetiphrenic nerve stimulation in patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2001; 29:1325–1331.

17. Al-Bilbeisi F, McCool FD. Diaphragm recruitment during nonrespiratory activities. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:456-9.
18. Radell PJ, Remahl S, Nichols DG, Eriksson LI: Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function. *Intensive Care Med* 2002, 28:358-364.
19. Jaber S, Sebbane M, Koechlin C, Hayot M, Capdevila X, Eledjam JJ, Prefaut C, Ramonatxo M, Matecki S, (2005) Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm. *Intensive Care Med* 31:1427–1433.
20. Anzueto A, Peters JI, Tobin MJ, de los SR, Seidenfeld JJ, Moore G, Cox WJ, Coalson JJ. Effects of prolonged controlled mechanical ventilation on diaphragmatic function in healthy adult baboons. *Crit Care Med*, 1997, 25:1187–1190.
21. Futier E, Constantin JM, Combaret L et al. Pressure support ventilation attenuates ventilator induced protein modifications in the diaphragm. *Crit Care* 2008, 12:R116.
22. Gayan-Ramirez G, de Paepe K, Cadot P, et al. Detrimental effects of short-term mechanical ventilation on diaphragm function and IGF-I mRNA in rats. *Intensive Care Med* 2003, 29:825-833.
23. Jung B, Constantin JM, Rossel N, et al. Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an in vivo and in vitro study. *Anesthesiology* 2010, 112:1435-1443.
24. Le Bourdelles G, Viires N, Boczkowski J, et al. Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149:1539-1544.

25. Powers SK, Shanely RA, Coombes JS, et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2002, 92:1851-1858.
26. Sassoon CS, Caiozzo VJ, Manka A, et al. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 2002, 92:2585-2595.
27. Yang L, Luo J, Bourdon J, et al. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:1135-1140.
28. McClung JM, Van Gammeren D, Whidden MA, et al. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med* 2009, 37:1373-1379.
29. DeRuisseau KC, Kavazis AN, Deering MA, et al. Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2005, 98:1314-1321.
30. Maes K, Testelmans D, Powers S, et al. Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:1134-1138.
31. McClung JM, Kavazis AN, DeRuisseau KC, et al. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:150-159.
32. Zhu E, Sassoon CS, Nelson R, et al. Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2005, 99:747-756.

33. Radell P, Edstrom L, Stibler H, et al. Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004, 48:430-437.
34. Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA, et al. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2003, 95:1116-1124.
35. Powers SK, Kavazis AN, Deruisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 288:R337–R344.
36. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 1998, 179:135-145.
37. Du J, Wang X, Miereles C, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *Clin Invest* 2004, 113:115-123.
38. Jackman RW, Kandarian SC: The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287:C834-843.
39. Testelmans D, Maes K, Wouters P, et al. Rocuronium exacerbates mechanical ventilation induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med*, 2006, 34:3018–3023.
40. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166:1369–1374

41. Reid MB. Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*, 2000, 90:724–731.
42. Siems W, Capuozzo E, Lucano A, et al. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-trans-nonanal. *Life Sci*, 2003, 73:2583–2590.
43. Davis RT III, Bruells CS, Stabley JN, et al: Mechanical ventilation reduces rat diaphragm blood flow and impairs oxygen delivery and uptake. *Crit Care Med* 2012; 40:2858–2866.
44. Bernard N, Matecki S, Py G, et al. Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med*, 2003, 29:111–118.
45. Bottinelli R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflugers Arch*, 2001, 443:6–17.
46. Yang L, Luo J, Bourdon J, et al. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166:1135–1140.
47. Racz GZ, Gayan-Ramirez G, Testelmans D, et al, Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 168:297–304.
48. Shanely RA, Coombes JS, Zergeroglu AM, et al, Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs force production. *Chest*, 2003, 123:195–201.

49. Testelmans D, Maes K, Wouters P, et al. Infusions of rocuronium and cisatracurium exert different effects on rat diaphragm function. *Intensive Care Med*, 2007, 33:872–879.
50. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, et al. Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy. *Crit Care Med*. 2012 Apr;40(4):1254-60.
51. Oliveira Ade S, Costa LB, Assis T de O, et al. Effects of controlled and pressure support mechanical ventilation on rat diaphragm muscle. *Acta Cir Bras*. 2012 Feb;27(2):109-16.
52. Terzi N, Pelieu I, Guittet L, et al. Neurally adjusted ventilatory assist in patients recovering spontaneous breathing after acute respiratory distress syndrome: physiological evaluation. *Crit Care Med*. 2010 Sep;38(9):1830-7.
53. Huang DY, Liu J, Wu XY, et al. Effects of neurally adjusted ventilatory assist on prevention of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in acute respiratory distress syndrome rabbits. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2011 Apr;34(4):288-93.
54. Multz AS, Aldrich TK, Prezant DJ, et al. Maximal inspiratory pressure is not a reliable test of inspiratory muscle strength in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 142: 529 –532, 1990.
55. Watson AC, Hughes PD, Louise Harris M, et al. Measurement of twitch transdiaphragmatic, esophageal, and endotracheal tube pressure with bilateral anterolateral magnetic phrenic nerve

- stimulation in patients in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 2001, 29: 1325–1331.
56. Laghi F, Cattapan SE, Jubran A, et al. Is weaning failure caused by low-frequency fatigue of the diaphragm? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 15;167(2):120-7.
 57. Boles JM, Bion J, Connors A, et al. Weaning from mechanical ventilation. *Eur Respir J* 2007, 29:1033-1056.
 58. Tzanis G, Vasileiadis I, Zervakis D, et al. Maximum inspiratory pressure, a surrogate parameter for the assessment of ICU-acquired weakness. *BMC Anesthesiol*. 2011 Jun 26;11:14.
 59. Boles JM, Bion J, Connors A, et al. Weaning from mechanical ventilation. *Eur Respir J* 2007, 29:1033-1056.
 60. Similowski T, Fleury B, Launois S et al. Cervical magnetic stimulation: a new painless method for bilateral phrenic nerve stimulation in conscious humans. *J Appl Physiol* 1989, 67:1311-1318.
 61. Hermans G, Agten A, Testelmans D, et al. Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study. *Crit Care* 2010, 14:R127.
 62. Cattapan SE, Laghi F, Tobin MJ. Can diaphragmatic contractility be assessed by airway twitch pressure in mechanically ventilated patients? *Thorax* 2003, 58:58-62.
 63. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 183:364-371.

64. Knisely AS, Leal SM, Singer DB. Abnormalities of diaphragmatic muscle in neonates with ventilated lungs. *J Pediatr* 1988, 113:1074-1077.
65. Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 2008, 358:1327-1335.
66. Hussain SN, Mofarrahi M, Sigala I, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 182:1377-1386.
67. Houston JG, Fleet M, Cowan MD, et al. Comparison of ultrasound with fluoroscopy in the assessment of suspected hemidiaphragmatic movement abnormality. *Clinical Radiology* 1995;50:95-8.
68. Demoule A, Verin E, Locher C, et al. Validation of surface recordings of the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation in humans. *J. Appl. Physiol*, 2003, 94, 453–461.
69. Luo, YM, Polkey, MI, Johnson, LC. et al. Diaphragm EMG measured by cervical magnetic and electrical phrenic nerve stimulation. *J. Appl. Physiol*, 1998, 85, 2089–2099.
70. Beck J, Sinderby C, Weinberg J, Grassino A. Effects of muscle-to-electrode distance on the human diaphragm electromyogram. *J. Appl. Physiol.*, 1995, 79, 975–985.
71. Similowski T, Mehiri S, Duguet A, Attali V, et al. Comparison of magnetic and electrical phrenic nerve stimulation in assessment of phrenic nerve conduction time. *J. Appl. Physiol.*, 1997, 82, 1190–1199.

72. Onal E, Lopata M, Ginzburg AS, O'Connor TD. Diaphragmatic EMG and transdiaphragmatic pressure measurements with a single catheter. *Am. Rev. Respir. Dis.* (1981), 124, 563–565.
73. Gerscovich EO, Cronan M, McGahan JP, et al. Ultrasonographic evaluation of diaphragmatic motion, *J Ultrasound Med* 2001 206 597-604.
74. Patel AS, O'Donnell C, Parker MJ, et al. Diaphragm paralysis definitively diagnosed by ultrasonography and postural dependence of dynamic lung volumes after seven decades of dysfunction, *Lung* 2007 1851 15-20.
75. Boussuges A, Gole Y, Blanc P. Diaphragmatic motion studied by M-mode ultrasonography: Methods, reproducibility, and normal values. *Chest* 2009; 135:391–400.
76. Kim WY, Suh HJ, Hong SB, et al. Diaphragm dysfunction assessed by ultrasonography: influence on weaning from mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2011 Dec;39(12):2627-30.
77. Sassoon CSH, Caiozzo VJ: Bench-to-bedside review: Diaphragm muscle function in disuse and acute high-dose corticosteroid treatment. *Crit Care* 2009; 13:221
78. Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Maes K, et al: Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. *Crit Care Med* 2005; 33:2804–2809.
79. Ayas NT, McCool FD, Gore R, et al: Prevention of human diaphragm atrophy with short periods of electrical stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:2018–2020.

80. Gerovasili V, Stefanidis K, Vitzilaios K, et al: Electrical muscle stimulation preserves the muscle mass of critically ill patients: a randomized study. *Crit Care* 2009, 13:R161.
81. Gerovasili V, Tripodaki E, Karatzanos E, et al. Short-term systemic effect of electrical muscle stimulation in critically ill patients. *Chest* 2009, 136:1249-1256.
82. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, Zhu J, Sachdeva R, Sonnad S, Kaiser LR, Rubinstein NA, Powers SK, Shrager JB (2008) Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358:1327–1335.
83. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR (1998) Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 338:347–353.
84. Thille AW, Rodriguez P, Cabello B, Lellouche F, Brochard L (2006) Patient-ventilator asynchrony during assisted mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 32:1515–1522.
85. [Piquilloud L](#), [Vignaux L](#), [Bialais E](#), et al, **Neurally adjusted ventilatory assist improves patient-ventilator interaction.** *Intensive Care Med.* 2011 Feb;37(2):263-71.
86. [Bertrand PM](#), [Futier E](#), [Coisel Y](#), et al, **Neurally adjusted ventilator assist versus pressure support ventilation for noninvasive ventilation during acute respiratory failure: a cross-over physiological study** *Chest.* 2012 May 31.
87. Gayan-Ramirez GN, Decramer ML: Diaphragm antioxidant system in controlled mechanical ventilation in piglets: short term vs. prolonged mechanical ventilation response. *Intensive Care Med* 2005, 31:1303-1305.
88. 83.Maes K, Testelmans D, Cadot P, et al. Effects of Acute Administration of Corticosteroids during Mechanical Ventilation on Rat

- Diaphragm , Am J Respir Crit Care Med Vol 178. pp 1219–1226, 2008.
89. Nava S, Gayan-Ramirez G, Rollier H, et al. Effects of acute steroid administration on ventilator and peripheral muscles in rats. Am J Respir Crit Care Med 1996;153.
 90. Wang KK: Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci 2000, 23:20-26.
 91. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, et al: Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. Cell Metab 2008, 8:425-436.
 92. Agten A, Maes, K, Smuder, A, et al. N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation Crit Care Med 2011; 39:777–782.
 93. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. Ann Surg 2002, 236:814-822.
 94. McClung J, Van Gammeren D, Whidden M, et al. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. Crit Care Med 2009; 37:1373–1379.
 95. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. J Appl Physiol 2009, 106:385-394.
 96. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. Am J Physiol Cell Physiol 2004, 287:C834-843.

97. Agten A, Maes K, Thomas D, et al. Bortezomib partially protects the rat diaphragm from ventilator-induced diaphragm dysfunction, Crit Care Med 2012; 40: 2449–2455).
98. Maes K, Testelmans D, Powers S, et al. Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. Am J Respir Crit Care Med 2007, 175:1134-1138.
99. Ottenheijm CA, Heunks LM, Dekhuijzen PN. Diaphragm muscle fiber dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: toward a pathophysiological concept. Am J Respir Crit Care Med 2007, 175:1233-1240.
100. Testelmans D, Crul T, Maes K, et al. Atrophy and hypertrophy signalling in the diaphragm of patients with COPD. Eur Respir J 2010, 35:549-556.
101. Ebihara S, Hussain SN, Danialou G, et al. Mechanical ventilation protects against diaphragm injury in sepsis: interaction of oxidative and mechanical stresses. Am J Respir Crit Care Med 2002, 165:221-228.