

DANIEL MARTINS PEREIRA

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE HIPERÓXIA NO TECIDO PULMONAR DE
RATOS *Wistar***

CAMPO GRANDE – MS, 2007

DANIEL MARTINS PEREIRA

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE HIPERÓXIA NO TECIDO PULMONAR DE
RATOS *Wistar***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

Coordenador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

CAMPO GRANDE – MS, 2007

“Falar coisas boas e pensar coisas boas, não faz de alguém um homem bom. É preciso fazer coisas boas”

Aristóteles

Aos meus pais e toda minha família, eterno exemplo de aprendizagem e lições...

A todos aqueles que pela sua presença em minha vida transformaram e ajudaram a configurar os caminhos, aprendizados e vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, “nada a pedir, só a agradecer ...”.

Agradeço imensamente à Prof. Dra. Iandara Schettert Silva, que aceitou compartilhar sua experiência e conhecimento, orientando-me nesta jornada de formação acadêmica. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, Coordenador do Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pela iniciativa e liderança na formação acadêmica.

A todos os professores do Programa que ao longo deste período trouxeram seus ensinamentos e experiências contribuindo não só com o conhecimento científico, mas também com o conhecimento da vida.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, pelo seu grande entusiasmo em pesquisar. A quem tenho grande admiração e respeito.

Ao Prof. Me. Baldomero Antonio Kato da Silva, exemplo de profissional. Pelas lições, amizade e presença gratuita em minha vida. “Ao subir cada degrau devo ao outro estender a mão e ajudar, para que este também possa junto subir”.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS GASES NO ORGANISMO	13
2.2 DIFUSÃO	14
2.3 TRANSPORTE DE OXIGÊNIO NO SANGUE	14
2.4 OXIGENIOTERAPIA	15
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MÉTODO	21
4.1 LOCAL E PERÍODO	21
4.2 AMOSTRA	21
4.3 EXPOSIÇÃO À HIPERÓXIA	22
4.4 EUTANÁSIA E PREPARO DAS PEÇAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE	40
ANEXO	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Seqüência de eventos durante e após o período de exposição à concentração de oxigênio a 100% por 72 horas.

Tabela 1 - Análise histológica das colorações HE e AgNOR em relação a espessura dos septos alveolares, congestão de vasos e capilares e pontos NORs por célula dos grupos CONTROLE e HIPERÓXIA. Valores expressos em média±dp. (n=12).

Figura 1. Comparação da espessura dos septos alveolares. Fotomicrografia das secções pulmonares (HE, 400X). (A) Grupo Controle ($0,38\pm 0,1 \mu\text{m}$), (B) Grupo Hiperóxia ($0,62\pm 0,2 \mu\text{m}$), submetido à ambiente com 100% O₂ por 72 horas. (C) Valores expressos em média±dp. Os valores são estatisticamente diferentes com aumento da espessura de septo alveolar para o grupo hiperóxia, $p<0,05$ (teste t de Student).

Figura 2. Comparação do número de pontos NORs entre o grupo Controle e Grupo Hiperóxia. Fotomicrografia das secções pulmonares (AgNOR, 1000X). (A) Grupo Controle ($1,0\pm 0,4$), (B) Grupo Hiperóxia ($1,8\pm 0,4$), submetido à ambiente com 100% O₂ por 72 horas. (C) Valores expressos em média±DP. Os valores são estatisticamente diferentes com número maior de pontos NORs nas células do grupo hiperóxia, $p<0,05$ (Mann Whitney).

Figura 3. Estrutura para produção de ambiente de hiperóxia com cilindro de oxigênio com capacidade para 10 m³ (10000 litros), umidificador de passagem (A). Conexão com caixa de vidro por meio de interface com 1 cm de diâmetro (C). Orifício de saída de ar e cabo de termômetro digital (D). Manutenção da oferta de ração e água durante período de exposição à hiperóxia (E).

Figura 4. Mensuração dos septos alveolares com uso do Software Image Pro Plus.

Figura 5. Contagem dos pontos NORs por célula.

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
AgNOR	Região Organizadora Nucleolar Argirofílica
CAT	Catalase
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GPX	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
N ₂	Nitrogênio
NOR	Região Organizadora Nucleolar
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH	Hidroxila
PH ₂ O	Pressão de vapor de água
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SaO ₂	Saturação de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da concentração de oxigênio a 100% em tempo de exposição de 72 horas no tecido pulmonar de ratos *wistar*. Foram estudados 12 ratos machos com peso médio de $210 \pm 15,9$ g, com idade entre 60 e 90 dias, distribuídos de forma aleatória em dois grupos com 6 animais cada, permanecendo o grupo Controle nas condições da fase de adaptação e o grupo Hiperóxia, submetidos à inalação de oxigênio umidificado na concentração de 100% administrado de forma contínua em um total de 12 L/min por 72 horas. Ao término da exposição todos os animais apresentaram padrão compatível com insuficiência respiratória aguda (aumento da frequência respiratória, perda da coloração cutânea e manutenção de estado de hipocinesia), com progressão de óbito para três animais antes de completadas 24 horas após a exposição. A análise histológica revelou para o grupo Controle média de espessura dos septos alveolares de $0,38 \pm 0,1$ μm e para o grupo Hiperóxia de $0,62 \pm 0,2$ μm ($p < 0,0001$). Em relação à contagem de pontos NORs por célula o grupo Controle apresentou $1,0 \pm 0,4$ dots e o grupo Hiperóxia $1,8 \pm 0,4$ dots ($p = 0,0064$). Achados como inflamação aguda, inflamação crônica, edema alveolar, hemorragia alveolar, desnudamento de áreas do epitélio alveolar e atelectasia não foram observados. Após análise dos resultados conclui-se que a exposição à concentração de 100% por tempo de 72 horas pode causar alterações histológicas compatíveis com início do processo de inflamação e com aumento da atividade celular em decorrência de agressões oxidativas, provocando disfunção respiratória para todo o grupo e óbito para alguns dos animais submetidos à hiperóxia.

Descritores: Oxigênio, hiperóxia, radicais livres, estresse oxidativo, doença pulmonar.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the 100% oxygen concentration effects in Wistar rats' lung tissue after 72 hours of exposition. Twelve male rats with mean weight $210 \pm 15,9$ g, 60 to 90 days of age was studied, at random distributed in two groups with 6 animals. Control group remained in adaption phase conditions, and Hyperoxic group was submitted to inhalation of 100% humidified oxygen concentration with 12 L/min continuous administration during 72 hours. After exposition, all animals presented compatible signals of acute respiratory failure (respiratory rate increase, cyanosis and hypocinetic state), three animals to made death progress before 24 hours exposition. Histological analysis revealed alveolar septa thickness mean of $0,38 \pm 0,1$ μ m in Control group, and $0,62 \pm 0,2$ μ m in Hyperoxic group. The mean values of AgNOR dots for the Control group was $1,0 \pm 0,4$ dots, and in Hyperoxic group $1,8 \pm 0,4$ dots ($p=0,0022$). Acute inflammation, chronic inflammation, alveolar edema, alveolar hemorrhage, alveolar epithelium denuded areas and atelectasis weren't observed. After results analysis it was concluded that 100% oxygen concentration after 72 hour exposition can cause histological alterations compatible with inflammatory process beginning and cellular activity increase by oxidative aggressions, causing respiratory dysfunction in whole group and death in some animals submitted to hyperoxia.

Key words: Oxygen, hyperoxic, free radicals, oxidative stress, pulmonary disease.

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio pode causar lesões pulmonares e sistêmicas quando administrado em altas doses ou por um período prolongado de tempo. Desta maneira, os pacientes com doenças respiratórias crônicas que dependem de oxigenioterapia por longo prazo e, aqueles que necessitam de ventilação mecânica prolongada podem estar mais expostos a esses riscos. Considerando-se que o tratamento adequado da hipoxemia depende primeiramente de uma compreensão fisiopatológica satisfatória de todos os mecanismos envolvidos, doses desnecessárias de oxigênio podem ser utilizadas em determinadas situações sem que a real causa da hipoxemia seja efetivamente corrigida¹.

A exposição a altas concentrações de oxigênio produzem conseqüências com alterações do trato respiratório em seres humanos e outros animais, que se manifestam durante as primeiras 24 a 72 horas após serem expostos a 100% oxigênio. As alterações ocorrem no epitélio pulmonar, na rede arterial pulmonar, nos septos alveolares e também no espaço pleural. Os achados experimentais mostram disfunções como atelectasias, edema alveolar intersticial, derrame pleural e alterações na função e estrutura celular. As alterações morfológicas decorrentes da inalação de concentrações elevadas de oxigênio (O₂) foram descritas inicialmente em 1897-1899 por J. Lorraine Smith, que caracterizou os achados histológicos agudos incluindo, atelectasia, inflamação, congestão vascular e edema alveolar relacionadas à toxicidade do O₂².

Clinicamente o uso de doses suplementares de oxigênio é freqüente, principalmente para o tratamento das condições de disfunções respiratórias. No entanto a falta de monitoragem adequada pode levar a situações de hiperóxia, que

por tempo prolongado pode cursar com danos difusos em capilares pulmonares, endotélio e epitélio gerando extensiva inflamação com infiltrados celular e intersticial e edema intra-alveolar. Estas situações patológicas pulmonares estão relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio secundárias à hiperóxia³.

Os mecanismos de lesão tecidual provocados por espécies reativas de oxigênio despertam considerável interesse científico, gerando estudos fisiopatológicos em relação ao envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação⁴. Entretanto o uso de técnicas que não constituem análise imunohistoquímica na investigação de lesões causadas pela exposição a altas concentrações de oxigênio por tempo prolongado é pouco descrita o que embasa o estudo de técnicas de metodologia simples com análise morfológica, objetivando diminuir os custos como complemento para a investigação científica.

As espécies reativas de oxigênio são moléculas que apresentam elétrons não pareados em sua órbita externa, sendo capazes de modificarem outras moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos e o ácido desoxirribonucléico (DNA). São encontradas em todos os sistemas biológicos. Estas espécies reativas se desenvolvem a partir do metabolismo aeróbio do oxigênio que pelo processo de sua redução acaba por formar espécies reativas^{5, 6, 7}.

O pulmão é protegido contra as espécies reativas de oxigênio por enzimas endógenas antioxidantes tal como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase. Mitocôndrias pulmonares são particularmente suscetíveis aos danos oxidativos e a isoforma mitocondrial da SOD (manganese SOD [Mn SOD]), é a maior antagonista da injúria oxidativa pulmonar^{3, 8}.

Mais especificamente relacionados ao ambiente de cuidados intensivos e ao procedimento de suporte ventilatório artificial, o II Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica⁹,

...define a ventilação mecânica como um método de suporte para o paciente durante uma enfermidade aguda, não constituindo procedimento curativo, e seu emprego implica em riscos próprios, o que exige uma indicação prudente e criteriosa com cuidados específicos em decorrência à sua aplicação.

Descreve ainda que o uso de concentrações de frações inspiradas de oxigênio acima de 60% pode produzir efeitos secundários, como alteração da formação de surfactante, efeitos citotóxicos e traqueobronquites, a síndrome da angústia respiratória aguda e displasia broncopulmonar, dentre outras.

A hipótese de que ambientes que levem a produção de espécies reativas de oxigênio pela hiperóxia e seus efeitos deletérios motiva o esclarecimento e informação, uma vez que no ambiente hospitalar, constantemente nos deparamos com situações clínicas onde um paciente flutua entre estados clínicos de hipóxia e hiperóxia.

Diante do exposto, justifica-se a execução da pesquisa, alicerçados na importância da documentação de efeitos que possam interferir fisiopatologicamente na evolução clínica de situações que envolvam estados relacionados à exposição a altas concentrações de oxigênio por tempo prolongado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS GASES NO ORGANISMO

O ar ambiente seco é composto por uma mistura gasosa incluindo oxigênio (O_2) com 20,93%, dióxido de carbono (CO_2) com 0,04% e nitrogênio (N_2) com 79,03%, e ainda outros gases em concentrações diminutas. A pressão parcial de cada gás constituinte é proporcional à quantidade deste gás na mistura e ao seu número de moléculas, assim, quanto mais moléculas, maior será a sua pressão parcial^{10, 11}.

Segundo a lei de Dalton a pressão da coluna de ar acima de um determinado ponto da Terra é denominada pressão barométrica, que ao nível do mar corresponde a 760 mmHg. Tal pressão é determinada pela soma das pressões de cada gás constituinte do ar ambiente, assim podemos calcular a pressão parcial que, por exemplo o O_2 exerce: onde $PO_2 = 760 \times 0,2093$, resultando em uma pressão parcial de 159,1 mmHg. É importante mencionar que a pressão barométrica de 760 mmHg se refere à pressão ao nível do mar e que esta pressão passa a diminuir com o aumento da altitude, tornando o ar mais rarefeito¹⁰.

Para ser mensurada a pressão que um determinado gás exerce no organismo, mais especificamente nas vias aéreas é importante considerar a parte líquida existente nos sistemas biológicos. Desta maneira, a quantidade de gás dissolvido em um líquido, a dada temperatura, é igual ao produto da pressão parcial desse gás no líquido por um coeficiente de solubilidade, característico de cada combinação gás-líquido (lei de Henry). A influência que o líquido proporciona nas pressões parciais está relacionada à pressão do vapor deste mesmo líquido no ambiente de mensuração. A pressão exercida pelas moléculas de água ao se desprender de sua

superfície é denominada pressão de vapor de água (P_{H_2O}), que na temperatura corporal normal (37°C), é igual a 47 mmHg. Como a P_{H_2O} é incluída na pressão total da mistura gasosa, os cálculos das pressões parciais dos gases usam como fator multiplicador das frações a diferença entre pressão barométrica e de vapor da água, em exemplo: ($760 - 47 = 713$ mmHg), o que determina uma PO_2 traqueal durante a inspiração de 149,2 mmHg^{10, 11, 12}.

2.2 DIFUSÃO

A velocidade com que um gás se difunde através de um tecido é proporcional à área disponível para a troca, ao coeficiente de difusão do gás no tecido e ao gradiente de pressão parcial entre as duas faces do tecido. O coeficiente de difusão é diretamente proporcional à solubilidade do gás no tecido e inversamente proporcional ao seu peso molecular (lei de Fick).

Em relação ao O_2 e o CO_2 , observa-se que o CO_2 se difunde cerca de 20 vezes mais rapidamente do que o O_2 pelos tecidos, porque, embora seu peso molecular seja um pouco maior, o CO_2 tem maior solubilidade nos tecidos orgânicos. O que determina equilíbrio entre a difusão dos dois gases é a diferença do gradiente de pressão para cada gás, com o O_2 com um gradiente de aproximadamente 60 mmHg e o CO_2 com um gradiente de apenas 6 mmHg aproximadamente^{12, 13}.

2.3 TRANSPORTE DE OXIGÊNIO NO SANGUE

A maior parte do O_2 é transportada nas hemácias, combinados à hemoglobina. Uma pequena porção permanece no plasma e no fluido intracelular eritrocitário,

transportado para os tecidos em solução simples. A quantidade de O_2 dissolvido é diretamente proporcional à sua pressão parcial no sangue. Para cada mmHg de PO_2 , há 0,003 ml de O_2 para cada 100 ml de sangue, expresso na forma de 0,003 vol%. Assim em uma PO_2 de 100 mmHg, há somente 0,3 vol% de oxigênio dissolvido. Quando um indivíduo respira O_2 puro em uma pressão barométrica de 760 mmHg, a PO_2 eleva-se para um máximo teórico de 673 mmHg, a PO_2 arterial excede 600 mmHg e seu O_2 dissolvido se aproxima de 2 vol%¹⁰.

2.4 OXIGENIOTERAPIA

A oxigenioterapia é definida como a oferta de oxigênio em porcentagens superiores àquela presente no ar ambiente, em torno de 21%. Desde que Priestley e Lavoisier (1775) descobriram o oxigênio, ele vem sendo utilizado como terapia suplementar em diversas situações clínicas com o objetivo de propiciar uma oxigenação sistêmica adequada e de, conseqüentemente, evitar os efeitos prejudiciais da hipóxia ao organismo¹⁴.

A oxigenioterapia está indicada para muitos pacientes com hipoxemia. O fisioterapeuta, com freqüência, trata pacientes que necessitam de oxigênio suplementar.

O principal objetivo da oxigenioterapia é obter uma saturação de oxigênio (SaO_2) superior a 90% de forma que a PaO_2 esteja acima de 60 mmHg, afim de favorecer o metabolismo aeróbico. Também objetiva manter a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial em valores normais ou próximos ao normal.

A oxigenioterapia pode ser ofertada ao paciente utilizando-se de sistema de baixo fluxo, que fornece oxigênio por meio de um fluxo inferior à demanda do

paciente. Desta forma, ocorre diluição do O₂ fornecido com o gás inspirado. Os sistemas de baixo fluxo compreendem: o cateter nasal, máscara facial simples e transtraqueal. Também pode ser utilizado o sistema de alto fluxo, que suplanta a demanda inspiratória do paciente, podendo regular a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de acordo com as necessidades terapêuticas¹⁵.

Em estudo realizado por Robert et al.,¹⁶ testando-se a hipótese de diminuir a resistência vascular pulmonar em pacientes cardiopatas com hipertensão pulmonar usando oxigenioterapia com fração inspirada de oxigênio a 100%, obtiveram como resultado potencial vasodilatação da circulação pulmonar e aumento da saturação de oxigênio arterial, incluindo a prescrição de oxigenioterapia como método terapêutico para tal disfunção.

Mais especificamente relacionados ao ambiente de cuidados intensivos e ao procedimento de suporte ventilatório artificial, o II Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica⁹, descreve que o uso de concentrações de frações inspiradas de oxigênio acima de 60% pode produzir efeitos secundários, como alteração da formação de surfactante, efeitos citotóxicos e traqueobronquites, a síndrome da angústia respiratória aguda e displasia broncopulmonar, dentre outras.

É importante lembrar que a indicação da oxigenioterapia deve ter metas, logo devem ser definidos: o sistema de administração do O₂, o tempo da aplicação da técnica e a porcentagem do fluxo (O₂) ofertado. O oxigênio é uma droga e deve ser prescrito e monitorado criteriosamente, utilizando a gasometria arterial ou registros de saturação de oxigênio. A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia em referência a toxicidade e efeitos colaterais na oxigenioterapia domiciliar prolongada relata que a toxicidade pulmonar por oxigênio pode ocorrer quando forem utilizadas frações inspiradas superiores a 50% por longos períodos, ressaltando que a

recomendação é de que seja utilizado o menor fluxo de O₂ necessário para manutenção da saturação adequada de oxigênio¹⁷.

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Todos os órgãos corporais demonstram lesões quando expostos a altos níveis de oxigênio, porém, o pulmão é o mais afetado por estar diretamente exposto às maiores pressões desse gás. Pelo fato de ser preferencialmente distribuído para áreas pulmonares que apresentam melhor complacência, o oxigênio suplementar inspirado aumenta o risco de lesões nessas regiões previamente normais. Muitas células do parênquima pulmonar são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Com a hiperóxia há formação do radical superóxido pela ação da xantina oxidase sobre a hipoxantina, tal situação pode produzir lesões em decorrência do aumento do estresse oxidativo advindo da hiperóxia. O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o “desafio” por radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos^{5, 18}.

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e as ERO. Essas últimas são subprodutos do metabolismo celular e se constituem de átomos ou moléculas que contém oxigênio e apresentam um elétron não pareado na sua órbita externa. Elas são capazes de reagir com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons dessas substâncias e modificando suas estruturas moleculares^{6, 19}.

Sob condições aeróbicas normais, menos de 5% do consumo de oxigênio corporal participa da formação de intermediários tóxicos de oxigênio. Entretanto, em

situações em que ocorre aumento da pressão arterial de oxigênio (PaO_2), nem todo oxigênio inspirado é reduzido diretamente à água, o que favorece o aparecimento das ERO. As principais ERO conhecidas são: oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), hidroxila (OH^-), superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A geração dessas espécies reativas por diversos agentes agressores e células inflamatórias causam lesão celular e tecidual nos pulmões^{26, 27}. O O_2^- é formado a partir da redução do oxigênio com um elétron e, quando protonado em meio com baixo pH, torna-se a principal fonte de H_2O_2 . Esse último pode reagir com alguns metais redox-reativos como o ferro e o cobre formando novas ERO como o hidroxila²⁰.

A exposição prolongada em níveis de 100% de oxigênio podem causar lesão pulmonar difusa com insuficiência respiratória, de forma similar a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). Tanto a SARA quanto a toxicidade do oxigênio envolvem os mecanismos do estresse oxidativo no pulmão. As lesões pulmonares são produzidas em parte pela geração do radical superóxido, que pode causar danos biológicos e também desencadear a formação de outras espécies reativas³¹.

As ERO podem promover a peroxidação lipídica da membrana celular e conseqüentemente, induzir a formação de moléculas vasoativas e proinflamatórias, o que altera a barreira lipídica e aumenta a permeabilidade da membrana²⁸. Proteínas e polipeptídios também estão sujeitos aos efeitos lesivos das EROs como fragmentação, agregação e suscetibilidade à digestão proteolítica. Finalmente, ácidos nucleicos são oxidados, resultando em estruturas de DNA alteradas e em mutagênese. Portanto, o evento inicial da toxicidade por hiperóxia nos pulmões é a formação excessiva de ERO, sendo a OH^- e o O_2^- os mais freqüentemente relacionados à lesão pulmonar⁵.

Existem sistemas de defesa contra o estresse oxidativo que são denominados antioxidantes e pode ser de origem enzimática e não enzimática. Os antioxidantes não enzimáticos incluem, dentre outros, as vitaminas A, C, E e o ácido úrico. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona (GPX) são exemplos de antioxidantes enzimáticos^{5, 21}. A exposição prévia a concentrações subletais de oxigênio pode aumentar a tolerância ao mesmo, provavelmente pelo aumento dessas defesas enzimáticas e não enzimáticas ou por alterações anatômicas na estrutura celular. Além disso, Ward et al.²², demonstraram que as citocinas como IL-11 e IL-6 conferem proteção em lesão pulmonar aguda causada por hiperóxia e que esta resposta é resultado da habilidade da IL-11 em inibir a indução de morte celular causada pelo excesso de oxigênio, sem, no entanto, causar maiores alterações nos antioxidantes pulmonares. Ainda descrevendo sobre a importância da ação antioxidante biológica, Russell et al.²³ pesquisaram a expressão da SOD na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Os resultados apresentados mostraram confirmação da hipótese de atenuação da lesão pulmonar e que a SOD extracelular se configura um importante redutor na magnitude da lesão pulmonar induzida pelas ERO em decorrência da administração de bleomicina.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da alta concentração de oxigênio em tempo de exposição de 72 horas no tecido pulmonar de ratos *wistar*.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar morfometricamente os achados pulmonares decorrentes das situações de exposição a altas concentrações de oxigênio.

Detectar as alterações celulares após a exposição, pela avaliação da expressão das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas.

4 MÉTODO

A pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), conforme certificado nº 127/2006 (Anexo).

4.1 LOCAL E PERÍODO

O estudo experimental foi realizado no setor de Técnica Cirúrgica II do Hospital Veterinário da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), em Campo Grande - MS no mês de junho de 2007.

4.2 AMOSTRA

Foram estudados 12 ratos machos adultos *norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério da UNIDERP, com peso corporal médio de $210 \pm 15,9$ gramas, com idade entre 60 e 90 dias.

Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura em seis animais por caixa de polipropileno com dimensões de 33x40x17 cm, com grades de aço inoxidável, com alimentação padrão* e água *ad libitum*. Essas condições foram utilizadas como base para adaptação inicial.

Procedeu-se a distribuição dos animais de forma aleatória em dois grupos com 6 animais cada, permanecendo o grupo CONTROLE nas mesmas condições da fase de adaptação e o grupo HIPERÓXIA, colocados em caixa de vidro desenvolvida para o

* Ração da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes.

estudo nas dimensões 33x40x30 cm, com fechamento hermético, proporcionado pela adesão tampa/caixa com adesivo de silicone e suplemento de oxigênio ofertado por um total de 6 cilindros com capacidade cada de 10 m³ (10.000 litros)*.

O gás foi distribuído para a caixa por válvula de pressão graduada de 0 a 300 Kgf/cm² e fluxômetro graduado de 1 a 15 L/min[†], umidificado por um umidificador de passagem, também da mesma marca, com o fluxo de gás de entrada e saída do interior da caixa ocorrendo por dois orifícios nas laterais da caixa com diâmetro de 2 cm, reduzidos para 1 cm de forma a proporcionar adaptação ao sistema de umidificação, mantendo as medidas de entrada e saída do gás com o mesmo diâmetro garantindo fluxo contínuo aferido no orifício de saída por ventilômetro[‡], certificando os valores gerados pelo fluxômetro, com manutenção de 12 L/min, e prevenindo a alteração de pressão no ambiente interno.

Da mesma forma que o grupo CONTROLE, o grupo HIPERÓXIA teve acesso a oferta de água e ração *ad libitum* por todo o período.

4.3 EXPOSIÇÃO À HIPERÓXIA

O oxigênio umidificado foi administrado de forma contínua em um total de 12 L/min por 72 horas seguidas. Este fluxo contínuo foi utilizado para prevenir o acúmulo de CO₂ e manter uma concentração constante de 100% de O₂[§].

* Adquiridos da Empresa Oxinal Oxigênio Nacional Ltda (Campo Grande – MS).

† Marca White Martins®.

‡ Marca Ferraris, modelo Mark 8.

§ Calibragem do fluxo adequado – Aparelho Portal DX 2020 (Dixtal Biomédica Indústria e Comércio Ltda, Manaus, Brasil).

4.4 EUTANÁSIA E PREPARO DAS PEÇAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

A eutanásia foi realizada com dose letal via injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (65 mg/Kg)*. Os pulmões foram removidos do tórax com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, por incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide. O acesso à cavidade torácica foi feito por incisão sub-xifóidea e osteotomia costal paraesternal. Procedeu-se a pleurotomia e, após cuidadosa ressecção, os pulmões foram retirados e separadamente submersos em solução de formol tamponado a 10%.

As peças foram processadas e incluídas em blocos de parafina com cortes de 4 µm de espessura para confecção das lâminas. Foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) e AgNOR (Apêndice A).

Os cortes foram analisados em microscopia óptica de luz[†] com captura de imagem por câmera analógica própria acoplada ao microscópio. Para cada lâmina foram fotografados 10 campos diferentes obtidos de forma aleatória em objetiva de aumento final de 400x para HE e objetiva de imersão em 1000x para AgNOR. Os campos foram analisados por profissional patologista com análise quanti-qualitativa para ambos os preparos.

Para avaliação da hipótese de edema pulmonar foram avaliadas duas variáveis: congestão de vasos e capilares e espessura dos septos alveolares. Foi realizada a contagem em cruzes (+) do nível de congestão de vasos e capilares no tecido pulmonar, aceitando-se como parâmetro a relação do número de vasos e capilares congestionados em análise comparativa lâmina a lâmina entre as amostras.

* Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda – Campinas, SP.

† Olympus BX 41 Trinocular Microscope.

Para determinação da espessura do septo alveolar de cada lâmina foram obtidos 10 campos fotográficos de forma aleatória. Em cada campo fotográfico foi realizada mensuração de três septos, com escolha do maior valor para cada campo, a partir do qual se calculou a média do valor da espessura dos septos por animal, a seguir cálculo da média por grupo e ao final, realização de comparação entre os grupos. Outros possíveis achados também foram investigados para descrição.

As lâminas para observação das regiões organizadoras nucleolares foram submetidas à análise quantitativa com escolha aleatória de células pulmonares por campo fotográfico com obtenção do número de pontos NORs em cada célula, obtendo-se ao final um valor médio \pm dp para cada grupo experimental*.

A técnica de AgNOR não constitui uma reação imunohistoquímica, porém, pode ser uma medida da atividade de proliferação nuclear. As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são constituídas por segmentos de DNA que contém os genes para a produção do ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) e representam os nucléolos celulares. Usando-se a técnica de impregnação com prata, estas estruturas são visualizadas à microscopia óptica como pontos escuros. O número e a área de NORs no núcleo são relacionadas com a síntese de proteínas^{37, 38}.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos da avaliação microscópica das lâminas preparadas em HE e AgNOR foram tabulados e analisados[†] com obtenção das medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão). Para a observação quanto à distribuição dos valores foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk aplicado para a

* Para a mensuração e contagem foi utilizado o Software Image Pro Plus[®], Media Cybernetics INC[™], EUA.

† Software Microsoft Excel 2003 e Software BioEstat 3.0.

avaliação da espessura dos septos alveolares, congestão de vasos e capilares pulmonares e contagem de pontos NORs por célula. Foi testada a hipótese de nulidade, com distribuição normal dos valores e a hipótese alternativa com distribuição não normal. O nível de decisão estabelecido foi de $p < 0,05$. Em relação às variáveis espessura do septo alveolar e pontos NORs por célula aceita-se a hipótese de nulidade com distribuição normal dos valores ($p > 0,05$). Para a variável congestão de vasos e capilares aceita-se a hipótese alternativa com distribuição não normal dos dados ($p < 0,05$).

Para as variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste paramétrico de t de Student para amostras não pareadas. Para as variáveis com distribuição não normal foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os tecidos pulmonares de todos os animais foram avaliados quanto à presença de achados decorrentes de alterações provocadas pela exposição a altas concentrações de O₂ por tempo prolongado (tabela 1).

Em todos os animais submetidos à concentração de 100% O₂ por um período de 72 horas, foi observado ao término da exposição presença de padrão compatível com insuficiência respiratória aguda (aumento do ritmo respiratório, cianose e estado de hipocinesia).

Três dos 6 animais do grupo HIPERÓXIA evoluíram para óbito antes de completadas às 24 horas após o período de exposição e foram imediatamente submetidos à coleta de material para processamento e coloração. Observou-se à abertura da caixa torácica para retirada dos pulmões extenso conteúdo líquido transudativo na cavidade pleural. Os três animais restantes sofreram eutanásia 24 horas* após a exposição (quadro 1).

Quadro 1 – Seqüência de eventos durante e após o período de exposição à concentração de oxigênio a 100% por 72 horas.

Grupo Hiperóxia	Período de exposição Hiperóxia	72 horas de exposição		24 horas após a exposição
6 animais	1 óbito Entre 60 ^a – 72 ^a hora	Presença Insuficiência respiratória em todos os animais restantes	2 óbitos Imediatamente após as 72 horas	Eutanásia dos 3 animais restantes

O achado mais expressivo nas secções preparadas em HE foi o aumento da espessura dos septos alveolares (figura 1), indicando presença de espessamento

* Crapo JD, Morphologic Changes in Pulmonary Oxygen Toxicity. Ann. Rev. Physiol 1986, 48:721-731.

das paredes alveolares ($p < 0,0001$). Não foram observados níveis significantes de congestão capilar e de vasos ($p = 0,1998$) (tabela 1).

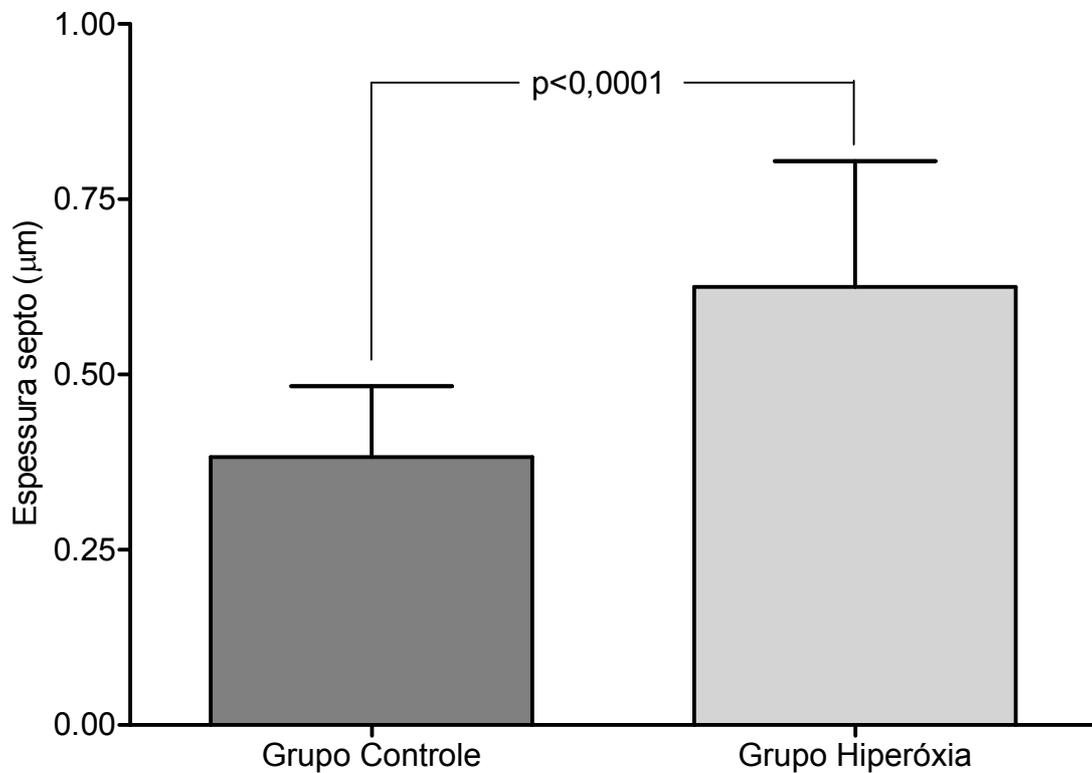
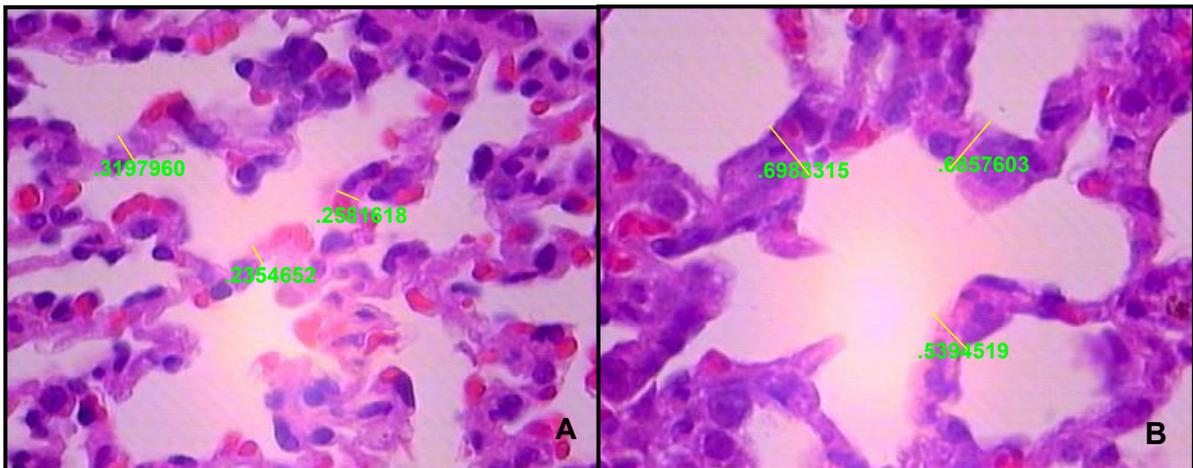
Tabela 1 – Análise histológica das colorações HE e AgNOR em relação a espessura dos septos alveolares, congestão de vasos e capilares e pontos NORs por célula dos grupos CONTROLE e HIPERÓXIA. Valores expressos em média \pm dp. (n=12)

Variáveis	Grupo CONTROLE	Grupo HIPERÓXIA	Valor de “p”
Espessura dos septos alveolares (μm)	0,38 \pm 0,1	0,62 \pm 0,2	* $<0,0001$
Congestão (+)	1,75 \pm 0,5	2,17 \pm 0,8	0,1998
Pontos NOR por célula (dots)	1,0 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4	*0,0064

Nota: (*) Comparações estatisticamente significativas.

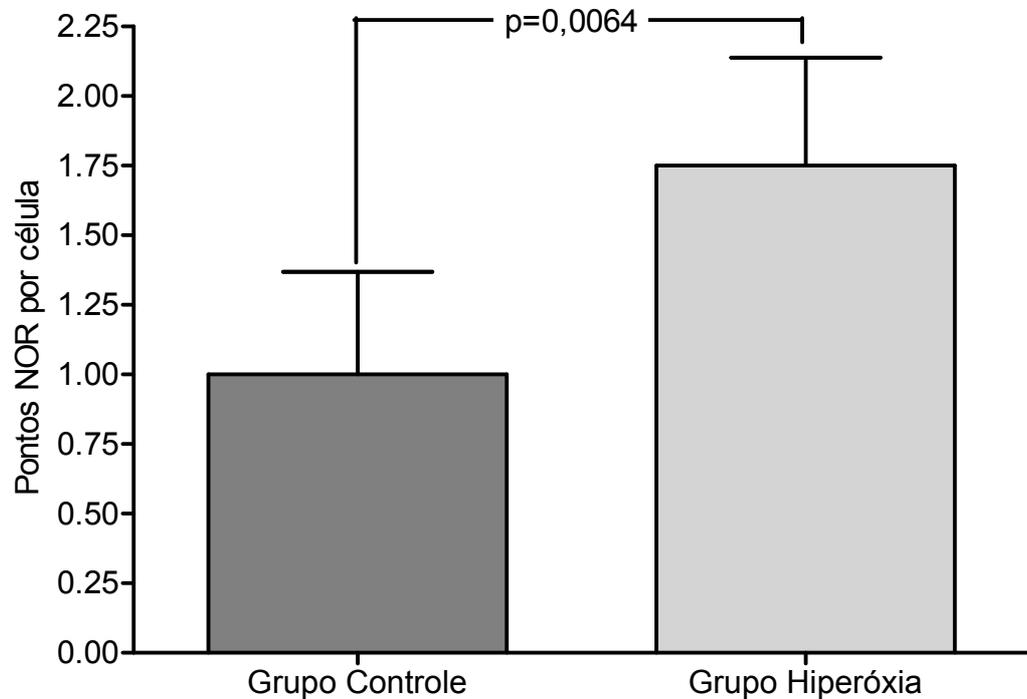
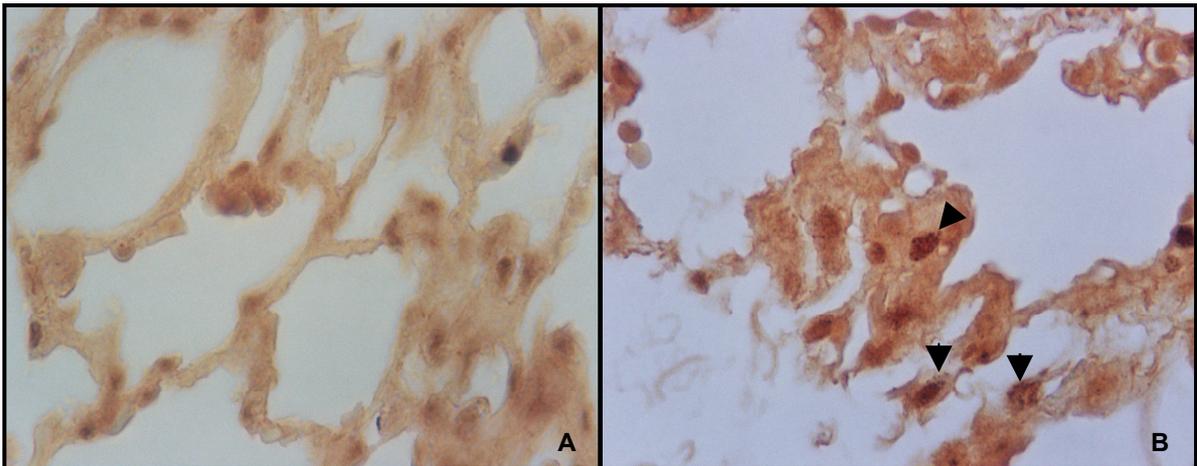
Achados como inflamação aguda, inflamação crônica, edema alveolar, hemorragia alveolar, desnudamento de áreas do epitélio alveolar e atelectasia não foram observados.

Em relação à comparação dos valores de pontos NORs por células, o grupo HIPERÓXIA apresentou um valor de pontos maior que o grupo CONTROLE ($p = 0,0064$) (figura 2).



C

Figura 1. Comparação da espessura dos septos alveolares. Fotomicrografia das secções pulmonares (HE, 400X). (A) Grupo Controle ($0,38 \pm 0,1 \mu\text{m}$), (B) Grupo Hiperóxia ($0,62 \pm 0,2 \mu\text{m}$), submetido à ambiente com 100% O_2 por 72 horas. (C) Valores expressos em média \pm dp. Os valores são estatisticamente diferentes com aumento da espessura de septo alveolar para o grupo hiperóxia, $p < 0,05$ (teste t de Student).



C

Figura 2. Comparação do número de pontos NORs entre o grupo Controle e Grupo Hiperóxia. Fotomicrografia das secções pulmonares (AgNOR, 1000X). (A) Grupo Controle ($1,0 \pm 0,4$ dots), (B) Grupo Hiperóxia ($1,8 \pm 0,4$ dots), submetido à ambiente com 100% O₂ por 72 horas. (C) Valores expressos em média ± DP. Os valores são estatisticamente diferentes com número maior de pontos NORs nas células do grupo hiperóxia, $p < 0,05$ (teste t de Student).

6 DISCUSSÃO

Os animais do grupo HIPERÓXIA, expostos à condição ambiente de concentração de 100% de O₂ por tempo de 72 horas apresentaram sinais e sintomas relacionados à toxicidade do oxigênio. Tal fato pode explicar a causa de óbito em alguns animais do grupo antes mesmo de completado o período total ou imediatamente ao final da exposição. Esta evidência vai de encontro a outros modelos experimentais com a investigação de dose resposta a diferentes concentrações de O₂, que identificaram para a concentração de 100% de O₂ por período de 72 horas situação semelhante, com óbito e lesão pulmonar difusa e menor formação de edema pulmonar quando utilizada baixas doses de O₂^{24, 36}. Estudo clássico da literatura científica também enumera que as altas concentrações de oxigênio por determinados períodos de exposição podem culminar em óbito e levar a quadros pulmonares compatíveis com lesão difusa².

Ao término do período de exposição todos os animais apresentaram padrão de insuficiência respiratória, sendo que 2 dos animais culminaram em óbito imediatamente após a exposição. Durante a abertura da caixa torácica para retirada dos pulmões foi observada grande quantidade de líquido translúcido na cavidade pleural destes animais. Segundo Sinhá et al.²⁵ o aumento do processo de estresse oxidativo pode induzir o aumento da permeabilidade vascular, o que pode levar ao aumento do líquido pleural e de forma associada ao edema pulmonar. O uso de substâncias atenuantes das agressões oxidativas mostrou-se eficaz na diminuição destes efeitos, com redução de até 50% da quantidade de volume pleural em comparação aos grupos que não receberam substância antioxidante.

Em estudo realizado por Clayton et al.³ sobre as lesões pulmonares causadas pela inalação de monóxido de carbono e hiperóxia, observaram em relação ao líquido pleural e edema pulmonar que o volume de líquido pleural aumentou significativamente nos ratos expostos a O₂ e O₂ adicionado de monóxido de carbono (CO). Que tais efeitos se deram em decorrência da hiperóxia porque no grupo com inalação isolada com CO por 3 dias não houve acúmulo de líquido pleural.

Dentre os achados histológicos após análise das secções do tecido pulmonar, o observado com mais expressividade foi o aumento da espessura do septo alveolar no grupo HIPERÓXIA sugerindo o início de processo inflamatório. Tal evidência também foi observada em pesquisa²⁶ com estudo das respostas pulmonares em coelhos prematuros submetidos à restrição nutricional e hiperóxia, constatando o espessamento dos septos alveolares, sugerindo um aumento do processo inflamatório.

A relação entre processo inflamatório e exposição a altas concentrações de gases mostram que a exposição ao CO e ao O₂ pode induzir o processo inflamatório pulmonar. Os estudos revelam altos níveis da atividade nos grupos estudados, indicando a presença do aumento de células inflamatórias³, outros estudos^{21, 27, 28} sobre a exposição à hiperóxia em humanos, também descrevem aumento da concentração de albumina no lavado broncoalveolar como resultante do aumento da permeabilidade vascular causada pelo nível de hiperóxia. Tal situação esta relacionada com o influxo de células inflamatórias. Entretanto, o mesmo não foi observado nessa pesquisa. Ao investigar-se a hipótese de achados inflamatórios não foi encontrada característica de processo inflamatório agudo ou crônico, uma vez que na análise das secções de tecido pulmonar não foram observadas células próprias da instalação de processo inflamatório.

Este fato sugere a hipótese de que não houve tempo hábil para a instalação do processo inflamatório. O estudo de Crapo² descreve a seqüência de estágios que ocorrem durante o processo de lesão celular em decorrência da toxicidade do O₂, sendo o primeiro estágio denominado de fase de iniciação e que a exposição em determinada quantidade da concentração do gás pode ser letal e não revelar evidências morfológicas significantes causadas pela lesão. Esta fase é imediatamente seguida pela fase inflamatória e em seguida pela fase de destruição com extensa lesão das células do parênquima pulmonar suficientes para levar a morte os animais, no entanto o óbito dos animais para este estudo levanta a hipótese da atribuição de causa à insuficiência respiratória aguda causada pelo derrame e congestão.

Vale ressaltar que a oxigenioterapia, modalidade de aplicação suplementar de oxigênio é utilizada em grande escala nos ambientes hospitalares com o objetivo de melhorar a oxigenação sistêmica para se evitar os efeitos da hipóxia ao organismo, e está indicada em várias situações, onde pacientes são acometidos por estados de hipoxemia. O fisioterapeuta atua frequentemente de forma direta com esta modalidade terapêutica.

Os efeitos benéficos da oferta de oxigênio aos pacientes que são acometidos por insuficiência respiratória aguda estão relacionados com a redução e inibição da formação das espécies reativas de oxigênio formadas pela condição de hipóxia inibindo a proliferação e apoptose celular no tecido pulmonar²⁹. Entretanto, há a necessidade de se ter cautela ao submeter o paciente à inalação de altas concentrações de O₂. O procedimento de oxigenioterapia, seja em respiração espontânea, seja em pacientes com suporte ventilatório invasivo implica em riscos próprios e sua indicação deve ser criteriosa.

A associação das lesões provocadas por altas concentrações de O₂ e o estresse oxidativo são descritas em pesquisa sobre o efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos, que constataram, em observação contraditória, melhores resultados no grupo ventilado com oxigênio a 100% e que utilizou o antioxidante. A sugestão de que o efeito deletério da alta concentração de oxigênio associada à ventilação durante a isquemia-reperfusão pulmonar deve-se basicamente ao estresse oxidativo, parecendo que, quando este é bloqueado, o oxigênio em alta concentração tem algum efeito benéfico³⁰.

A utilização de estratégia antioxidante durante condições de exposição à hiperóxia por tempo prolongado pode garantir a manutenção da oxigenação arterial, a diminuição da fração de *shunt* intrapulmonar e diminuir o edema pulmonar, comparando-se a condições de exposição sem o uso de substâncias antioxidantes³¹.

Outro dado encontrado neste estudo foi o aumento dos pontos NORs no grupo HIPERÓXIA em relação ao grupo CONTROLE indicando um aumento da atividade mitótica celular induzida pela condição de exposição a condições de 100% O₂ por 72 horas contínuas.

Utilizar as AgNOR (regiões organizadoras nucleolares argirofílicas) como marcadores de proliferação celular se justifica porque tal técnica marca de forma quantitativa a interferência nos estágios do ciclo celular. A técnica de AgNOR se destina a marcar as regiões organizadoras nucleolares (NOR), que são as regiões cromossômicas que contém o maior número de genes ribossomal (rRNA). Assim, os números de AgNORs refletem o nível de síntese de rRNA, de tal maneira que seu aumento representa um aumento da frequência mitótica^{32, 33}.

O uso das AgNORs mostrou-se útil para avaliação de alterações celulares decorrentes da exposição a concentração de 100% O₂ por 72 horas, tendo suas vantagens caracterizadas por se tratar de uma técnica de baixo custo com avaliação em microscopia óptica de luz. Sugere-se, entretanto estudos adicionais para mais evidências a respeito da aplicação da técnica.

Barazzone et al.³⁴, em estudo da toxicidade do O₂ em pulmão de ratos obtiveram como resultado que ambos, necrose e apoptose contribuem para morte celular durante hiperóxia. Foi realizado teste padrão com eletroforese do DNA pulmonar indicando que fragmentação internucleosomal (características de apoptose) e degradação total (característica de necrose) são induzidas pela hiperóxia e que a hiperóxia produz aumento da síntese de RNA ou nível de proteínas supressoras (p53), que são expressas em certos tipos de apoptose.

Em estudo sobre a reoxigenação após hipóxia grave, El Jamali et al.³⁵, observaram aumento da produção de células e também da expressão da actina α -sarcomérica, bem como os níveis de mRNA foram elevados pela hipóxia/reoxigenação, com conseqüente hipertrofia de cardiomiócitos em vitro. Em conclusão, levantaram a dependência da hipertrofia de cardiomiócitos a espécies reativas de oxigênio.

7 CONCLUSÕES

A exposição à concentração de 100% de O₂ por tempo de 72 horas provocou disfunção respiratória, além de óbito para alguns animais submetidos à hiperóxia.

A avaliação morfométrica revelou alterações histológicas compatíveis com início do processo de inflamação caracterizada nesse estudo pelo aumento da espessura dos septos alveolares no grupo exposto.

Houve aumento da expressão das regiões organizadoras argirofílicas (AgNOR) demonstradas pelo aumento dos pontos NORs na avaliação histológica, caracterizando aumento da atividade celular em decorrência da exposição à hiperóxia.

8. REFERÊNCIAS

1. Kleen M, Messmer K. Toxicity of high PaO₂. *Minerva Anesthesiol.* 1999; 65(6): 3936.
2. Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol.* 1986, 48(1): 72131.
3. Clayton CE, Carraway MS, Suliman HB, Thalmann ED, Thalmann KN, Schmechel DE et al. Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281(4): L94957.
4. AlMehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATPindependent membrane depolarization with ischemia in the oxygenventilated isolated rat lung. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1998, 18(5): 65361.
5. Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos AS, Andrade, DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005, 31(1): 608.
6. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43(1): 618.
7. Martinez GR, Medeiros MHG, Di Mascio P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Quím Nova.* 2000, 23(5): 6869.
8. Bowler RP, Nicks M, Warnick K, Crapo JD. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycininduced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, 282(4): L71926.
9. II Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. *J Bras Pneumol.* 2000, 26(supl 2): S603.
10. Aires MM. *Fisiologia.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999.
11. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
12. West JB. *Fisiologia Respiratória.* 6 ed. São Paulo: Manole; 2002.

13. Powers SK, Howley ET. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 13 ed. São Paulo: Manole; 2000.
14. Treacher DF, Leach RM. Oxygen transport-1 Basic principles. *BMJ* 1998; 317:1302-1306.
15. Pryor JA, Webber BA. Fisioterapia para problemas respiratórios e cardíacos. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
16. Roberts DH, Lepore JJ, Maroo A, Semigram MJ, Ginns LC. Oxygen therapy improves cardiac index and pulmonary vascular resistance in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120 (5): 1547-1555.
17. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Oxigenioterapia domiciliar prolongada (ODP). *J Pneumol. (São Paulo)* 2000; 26 (6):1-15.
18. Schneider CD, Oliveria AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10 (4): 308-313.
19. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998; 201: 1203-1209.
20. Kinulla VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human diseases. *Am J Crit Care Med* 2003;167: 1600-1619.
21. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care Med* 2002; 11 (6): 543-553.
22. Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, Mantell LL, Einarsson O, Du Y, Elias JA. Interleukin-6 induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 535-542.
23. Russell P, Bowler MN, Warnick K, Crapo JD. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L719-L726.

24. Silveira RJ, Silva FM, Wilhelm Filho D, Cardoso JJD, Leão LEV. Estudo da fração inspirada de oxigênio na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos. *Acta Cir Bras* 2004, 19 (5): 535-547.
25. Sinha A, Muthiah K, Jiang W, Couroucli X, Barrios R, Moorthy B. Attenuation of hyperoxic lung injury by the CYP1A inducer β -naphthoflavone. *Toxicological Sciences* 2005, 87 (1): 204-212.
26. Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohnnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *Jornal de Pediatria* 2006, 82 (3): 179-185.
27. Griffith DE, Garcia JG, James HL, Callahan KS, Iriana S, Holiday D. Hyperoxic exposure in humans: effects of 50 percent oxygen on alveolar macrophage leukotriene B4 synthesis. *Chest* 1992, 101 (2): 392-397.
28. Weaver LK, Churchill S. Pulmonary edema associated with hyperbaric oxygen therapy. *Chest* 2001, 120 (4): 1407-1409.
29. Helt CE, Rancourt RC, Staversky RJ, O'Reilly MA. P53-Dependent induction of p21^{Cip/WAF1/Sdi1} protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicological Sciences* 2001, 63: 214-222.
30. May Silva F, Silveira RJ, Hallal ALLC, Wilhelm Filho D, Cardoso JJD, Leão LEV. Efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2004, 31(5): 291-298.
31. Simonson SG, Welty-Wolf KE, Huang Y, Taylor DE, Kantrow SP, Carraway MS, Crapo JD, Piantadosi CA. Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates: physiology and biochemistry. *J Appl Physiol* 1997, 83 (2): 550-558.
32. Oliver JR, Mara TW, Cherian MG. Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy. *Exp Biol Med* 2005; 230: 61-67.
33. Kato da Silva BA, Schettert Silva I, Pereira DM, Aydos RD, Carvalho PTC. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions in detection of lung cells alterations after Benzo[a]Pyrene instillation. *Act Cir Bras* 2006, 21 (supl 4): 36-39.

34. Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF. Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19: 573-581.
35. El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW. Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3 β . *FASEB Journal* 2004, 18: 1096-1098.
36. Ferreira MRA, Araújo Silva E, Pereira ALA, Ramos VPR, Paiva AEM, Lopes JAC. Efeitos do oxigênio em pulmões de ratas: estudo experimental. X congresso nacional de cirurgia experimental 2007, P10.
37. Capelozzi VL, Saber AMA, Silva AGP, Gallo CP, Brandão R. Requisitos mínimos para o laudo de anatomia patológica em câncer de pulmão: justificativa na patogênese. *J Pneumol* 2002; 28(4): 201-218.
38. Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest* 1997; 111: 1591-1596.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Descrição das técnicas de preparo das lâminas em HE e AgNOR.

Preparo Histológico – HE

O processamento para análise histológica em HE foi realizado com o pulmão direito iniciado após 24 horas de imersão na solução de formol tamponado a 10%. As peças foram imersas por 01 hora em álcool etílico a 90%, 01 hora de imersão em álcool etílico a 95% e 04 sessões de imersão com 01 hora de duração cada, em álcool etílico absoluto.

Posteriormente as peças foram submersas em 02 sessões de 01 hora cada em xilol, seguida de imersão em parafina I durante 02 horas, parafina II durante 02 horas e emblocamento com parafina histológica acrescida de 20% de cera de abelha em 02 sessões de 2,5 minutos.

Os blocos foram cortados com navalha de 04 μm , os cortes resultantes foram colocados em lâminas e posteriormente em estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas.

Após desparafinização, os cortes sofreram coloração com hematoxilina-eosina (HE). Inicialmente as lâminas foram submersas durante 02 minutos em xilol I seguido de 02 minutos em xilol II, hidratadas com imersão por 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 1,5 minutos em álcool etílico a 70%; 02 minutos em água e imersão em hematoxilina por 1,5 minutos.

O processo de desidratação foi realizado com imersão em água seguido de imersão por 04 minutos em eosina. Foram realizadas sessões de imersão com duração de 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 90%; e 03 sessões em álcool

absoluto. Novamente banho de xilol I durante 01 minuto, banho de xilol II durante 01 minuto e imersão em xilol III durante aproximadamente 20 minutos.

Preparo e Análise Histológica – Região Organizadora Nucleolar Argirofílica (AgNOR)

Os pulmões já previamente emblocados em parafina foram submetidos a cortes longitudinais de 4 μm de espessura estendidos sobre lâminas de microscopia e desparafinizados e rehidratados pela seqüência xilol e etanol, com imersão em xilol, período de 30 minutos em estufa a 57°C, temperatura ambiente por 20 minutos, imersão em etanol por 20 minutos, também em solução de ácido acético/etanol (1:3) por 05 minutos, lavagem por 03 vezes sem intervalo em etanol absoluto.

As lâminas foram imersas em celuidina a 1% diluída em etanol/éter (1:1) durante 01 minuto e submetidas a secagem por 01 hora. O endurecimento da celuidina foi feito por imersão em etanol 70% por 05 minutos, seguido de lavagem das lâminas em água destilada. Em seqüência foi realizado o gotejamento de preparo de 2g/dl de gelatina, 2g/dl de ácido fórmico aquoso, misturado a 50 g/dl de solução aquosa de nitrato de prata (1:2). Os cortes foram mantidos em estufa a 45°C em câmara úmida por 45 minutos.

As lâminas foram retiradas e lavadas vigorosamente com água destilada a 45°C e desidratadas com etanol em concentrações crescentes e clareadas em xilol.

APÊNDICE B – Estrutura física para produção de ambiente de hiperóxia



Figura 3. Estrutura para produção de ambiente de hiperóxia com cilindro de oxigênio com capacidade para 10 m³ (10000 litros), umidificador de passagem. Conexão com caixa de vidro por meio de interface com 1 cm de diâmetro. Orifício de saída de ar e cabo de termômetro digital. Manutenção da oferta de ração e água durante período de exposição à hiperóxia.

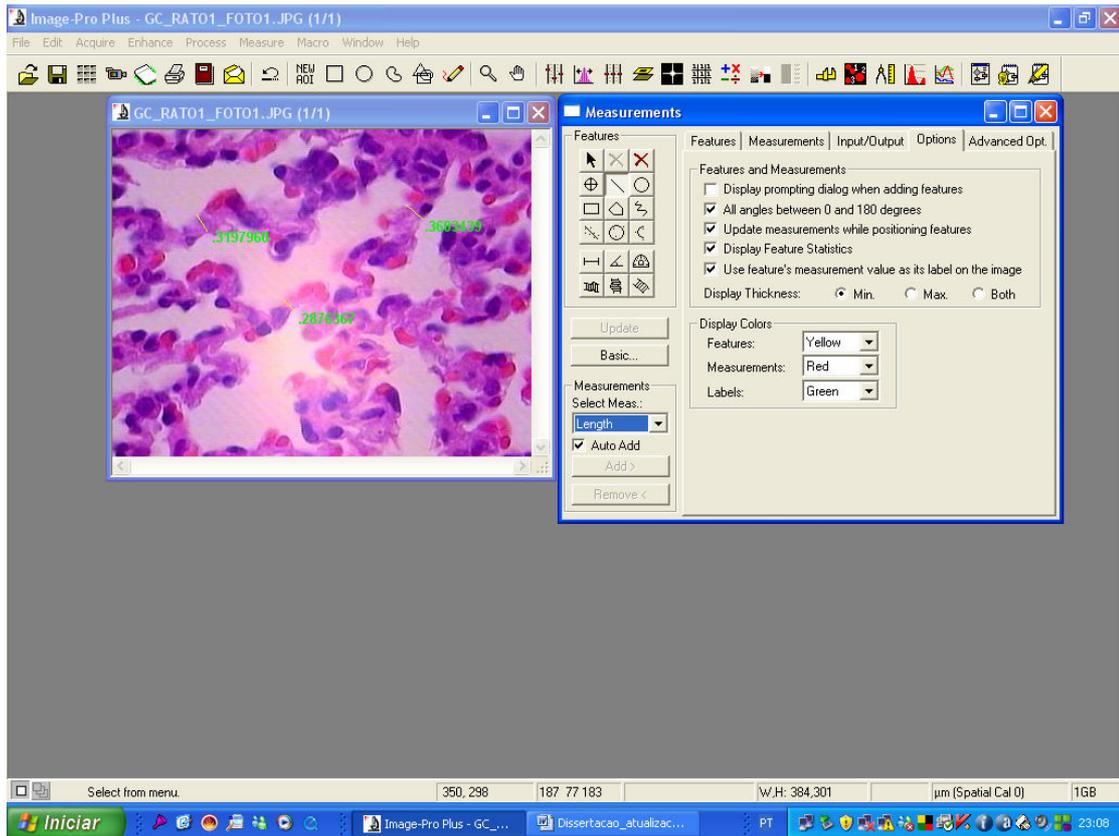


Figura 4. Mensuração dos septos alveolares com uso do Software Image Pro Plus.

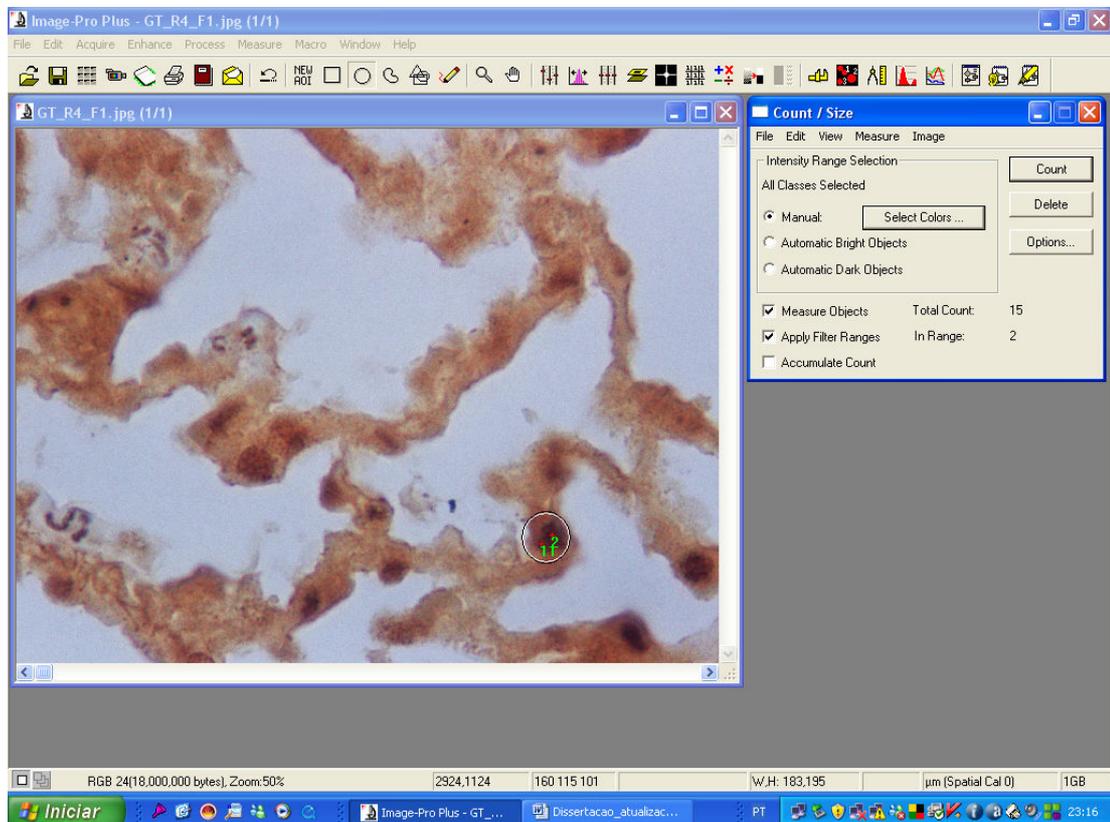
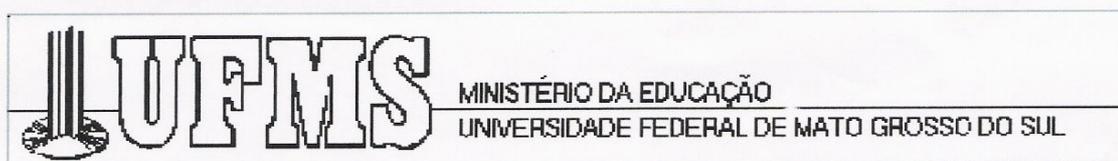


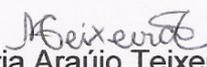
Figura 5. Contagem dos pontos NORs por célula.

ANEXO

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº 127/2006 do Mestrando **Daniel Martins Pereira**, sob a Orientação da Profª Iandara Schettert Silva, referente ao projeto de pesquisa “**Efeitos da hipóxia e hiperóxia em pulmões de ratos**”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 26 de outubro de 2006.

Campo Grande (MS), 27 de outubro de 2006.


Drª Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA

ANEXO B – ARTIGO

Efeitos da Indução de Hiperóxia no Tecido Pulmonar de Ratos *Wistar*

Effect of the Induction of Hyperoxic in the Lung Tissue of Wistar Rats

Daniel Martins Pereira¹

Iandara Schettert Silva²

Baldomero Antonio Kato da Silva³

Ricardo Dutra Aydos⁴

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho⁵

Alexandre Nakao Odashiro⁶

1. Mestrando em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste UFMS; Docente Curso Fisioterapia UNIDERP.
2. Doutora em Cirurgia Experimental pela UNIFESP; Docente do Curso de Medicina Veterinária UNIDERP.
3. Mestre em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação UnB/UFMS/UFG; Professor adjunto da UNIDERP.
4. Doutor em Cirurgia Experimental UNIFESP; Professor de Clínica Cirúrgica UFMS.
5. Doutor em Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação Professor do Curso de Fisioterapia UNIDERP.
6. Médico Patologista; Docente do Curso de Medicina UNIDERP.

RESUMO

Objetivo: avaliar os efeitos da concentração de oxigênio a 100% em tempo de exposição de 72 horas no tecido pulmonar de ratos *wistar*. **Método:** Foram estudados 12 ratos machos com peso médio de $210 \pm 15,9$ g, com idade entre 60 e 90 dias, distribuídos de forma aleatória em dois grupos com 6 animais cada, permanecendo o grupo Controle nas condições da fase de adaptação e o grupo Hiperóxia, submetidos à inalação de oxigênio umidificado na concentração de 100% administrado de forma contínua em um total de 12 L/min por 72 horas. **Resultados:** Ao término da exposição todos os animais apresentaram padrão compatível com insuficiência respiratória aguda (aumento da frequência respiratória, perda da coloração cutânea e manutenção de estado de hipocinesia), com progressão de óbito para três animais antes de completadas 24 horas após a exposição. A análise histológica revelou para o grupo Controle média de espessura dos septos alveolares de $0,38 \pm 0,1$ μm e para o grupo Hiperóxia de $0,62 \pm 0,2$ μm ($p < 0,0001$). Em relação à contagem de pontos NORs por célula o grupo Controle apresentou $1,0 \pm 0,4$ dots e o grupo Hiperóxia $1,8 \pm 0,4$ dots ($p = 0,0064$). Achados como inflamação aguda, inflamação crônica, edema alveolar, hemorragia alveolar, desnudamento de áreas do epitélio alveolar e atelectasia não foram observados. **Conclusão:** A exposição à concentração de 100% por tempo de 72 horas pode causar alterações histológicas compatíveis com início do processo de inflamação e com aumento da atividade celular em decorrência de agressões oxidativas, provocando disfunção respiratória para todo o grupo e óbito para alguns dos animais submetidos à hiperóxia.

Descritores: Oxigênio, hiperóxia, radicais livres, estresse oxidativo, doença pulmonar.

Correspondência: Daniel Martins Pereira, Rua Alzira Alves do Amaral, 107, Bl F, Apt 2, Conjunto Mata do Jacinto, CEP 79033-339, Campo Grande, MS, Brasil.

Introdução

O oxigênio pode causar lesões pulmonares e sistêmicas quando administrado em altas doses ou por um período prolongado de tempo. Desta maneira, os pacientes com doenças respiratórias crônicas que dependem de oxigenioterapia por longo prazo e, aqueles que necessitam de ventilação mecânica prolongada podem estar mais expostos a esses riscos. Considerando-se que o tratamento adequado da hipoxemia depende primeiramente de uma compreensão fisiopatológica satisfatória de todos os mecanismos envolvidos, doses desnecessárias de oxigênio podem ser utilizadas em determinadas situações sem que a real causa da hipoxemia seja efetivamente corrigida¹.

A exposição a altas concentrações de oxigênio produzem conseqüências com alterações do trato respiratório em seres humanos e outros animais. As alterações ocorrem no epitélio pulmonar, na rede arterial pulmonar, nos septos alveolares e também no espaço pleural. Os achados experimentais mostram disfunções como atelectasias, edema alveolar intersticial, derrame pleural e alterações na função e estrutura celular. As alterações morfológicas decorrentes da inalação de concentrações elevadas de oxigênio (O₂) foram descritas inicialmente em 1897-1899 por J. Lorraine Smith, que caracterizou os achados histológicos agudos incluindo, atelectasia, inflamação, congestão vascular e edema alveolar relacionadas à toxicidade do O₂².

Clinicamente o uso de doses suplementares de oxigênio é freqüente, principalmente para o tratamento das condições de disfunções respiratórias. No entanto a falta de monitoragem adequada pode levar a situações de hiperóxia, que por tempo prolongado pode cursar com danos difusos em capilares pulmonares, endotélio e epitélio gerando extensiva inflamação com infiltrados celular e intersticial e edema intra-alveolar. Estas situações patológicas pulmonares estão relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio secundárias à hiperóxia³.

Os mecanismos de lesão tecidual provocados por espécies reativas de oxigênio despertam considerável interesse científico, gerando estudos fisiopatológicos em relação ao envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação⁴.

As espécies reativas de oxigênio são moléculas que apresentam elétrons não pareados em sua órbita externa, sendo capazes de modificarem outras moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos e o ácido desoxirribonucléico

(DNA). São encontradas em todos os sistemas biológicos. Estas espécies reativas se desenvolvem a partir do metabolismo aeróbio do oxigênio que pelo processo de sua redução acaba por formar espécies reativas^{5, 6, 7}.

O pulmão é protegido contra as espécies reativas de oxigênio por enzimas endógenas antioxidantes tal como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase. Mitocôndrias pulmonares são particularmente suscetíveis aos danos oxidativos e a isoforma mitocondrial da SOD (manganese SOD [Mn SOD]), é a maior antagonista da injúria oxidativa pulmonar^{3, 8}.

Mais especificamente relacionados ao ambiente de cuidados intensivos e ao procedimento de suporte ventilatório artificial, o II Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica⁹ descreve que o uso de concentrações de frações inspiradas de oxigênio acima de 60% pode produzir efeitos secundários, como alteração da formação de surfactante, efeitos citotóxicos e traqueobronquites, a síndrome da angústia respiratória aguda e displasia broncopulmonar, dentre outras.

A hipótese de que ambientes que levem a produção de espécies reativas de oxigênio pela hiperóxia e seus efeitos deletérios motiva o esclarecimento e informação, uma vez que no ambiente hospitalar, constantemente nos deparamos com situações clínicas onde um paciente flutua entre estados clínicos de hipóxia e hiperóxia.

Diante do exposto, justifica-se a execução da pesquisa, alicerçados na importância da documentação de efeitos que possam interferir fisiopatologicamente na evolução clínica de situações que envolvam estados relacionados a exposição a altas concentrações de oxigênio por tempo prolongado.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da concentração de 100% de oxigênio em tempo de exposição de 72 horas no tecido pulmonar de ratos *wistar*, caracterizar morfometricamente os achados pulmonares decorrentes das situações de exposição a altas concentrações de oxigênio e detectar as alterações celulares após a exposição pela avaliação da expressão das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR).

Método

A pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), conforme certificado nº 127/2006.

O estudo experimental foi realizado no setor de Técnica Cirúrgica II do Hospital Veterinário da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), em Campo Grande - MS no mês de junho de 2007.

Foram estudados 12 ratos machos adultos *norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério da UNIDERP, com peso corporal médio de $210 \pm 15,9$ gramas, com idade entre 60 e 90 dias.

Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura em seis animais por caixa de polipropileno com dimensões de 33x40x17 cm, com grades de aço inoxidável, com alimentação padrão com ração da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes e água *ad libitum*. Essas condições foram utilizadas como base para adaptação inicial.

Procedeu-se a distribuição dos animais de forma aleatória em dois grupos com 6 animais cada, permanecendo o grupo CONTROLE nas mesmas condições da fase de adaptação e o grupo HIPERÓXIA, colocados em caixa de vidro desenvolvida para o estudo nas dimensões 33x40x30 cm, com fechamento hermético, proporcionado pela adesão tampa/caixa com adesivo de silicone e suplemento de oxigênio ofertado por um total de 6 cilindros com capacidade cada de 10 m^3 (10.000 litros).

O gás foi distribuído para a caixa por válvula de pressão graduada de 0 a 300 Kgf/cm² e fluxômetro graduado de 1 a 15 L/min marca White Martins®, umidificado por um umidificador de passagem, também da mesma marca, com o fluxo de gás de entrada e saída do interior da caixa ocorrendo por dois orifícios nas laterais da caixa com diâmetro de 2 cm, reduzidos para 1 cm de forma a proporcionar adaptação ao sistema de umidificação, mantendo as medidas de entrada e saída do gás com o mesmo diâmetro garantindo fluxo contínuo aferido no orifício de saída por ventilômetro da marca Ferraris, modelo Mark 8, certificando os valores gerados pelo fluxômetro, com manutenção de 12 L/min, e prevenindo a alteração de pressão no ambiente interno.

Da mesma forma que o grupo CONTROLE, o grupo HIPERÓXIA teve acesso a oferta de água e ração *ad libitum* por todo o período.

O oxigênio umidificado foi administrado de forma contínua em um total de 12 L/min por 72 horas seguidas. Este fluxo contínuo foi utilizado para prevenir o acúmulo de CO₂ e manter uma concentração constante de 100% de O₂.

A eutanásia foi realizada com dose letal via injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (65 mg/Kg) (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda – Campinas, SP). Os pulmões foram removidos do tórax com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, por incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide. O acesso à cavidade torácica foi feito por incisão sub-xifóidea e osteotomia costal paraesternal. Procedeu-se a pleurotomia e, após cuidadosa ressecção, os pulmões foram retirados e separadamente submersos em solução de formol tamponado a 10%.

As peças foram processadas e incluídas em blocos de parafina com cortes de 4 µm pra confecção das lâminas. Foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) e AgNOR.

Os cortes foram analisados em microscopia óptica de luz (Olympus BX 41 – Trinocular Microscope) com captura de imagem por câmera analógica própria acoplada ao microscópio. Para cada lâmina foram fotografados 10 campos diferentes obtidos de forma aleatória em objetiva de aumento final de 400x para HE e objetiva de imersão em 1000x para AgNOR. Os campos foram analisados por profissional patologista com análise quanti-qualitativa para ambos os preparos.

Para avaliação da hipótese de edema pulmonar foram avaliadas duas variáveis: congestão de vasos e capilares e espessura dos septos alveolares. Foi realizada a contagem em cruzes (+) do nível de congestão de vasos e capilares no tecido pulmonar, aceitando-se como parâmetro a relação do número de vasos e capilares congestos em análise comparativa lâmina a lâmina entre as amostras.

Para determinação da espessura do septo alveolar de cada lâmina foram obtidos 10 campos fotográficos de forma aleatória. Em cada campo fotográfico foi realizada mensuração de três septos, com escolha do maior valor para cada campo, a partir do qual se calculou a média do valor da espessura dos septos por animal, a seguir cálculo da média por grupo e ao final, realização de comparação entre os grupos. Outros possíveis achados também foram investigados para descrição.

As lâminas para observação das regiões organizadoras nucleolares foram submetidas à análise quantitativa com escolha aleatória de células pulmonares por

campo fotográfico com obtenção do número de pontos NORs em cada célula, obtendo-se ao final um valor médio \pm dp para cada grupo experimental.

Os dados obtidos da avaliação microscópica das lâminas preparadas em HE e AgNOR foram tabulados e analisados com obtenção das medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão). Para a observação quanto à distribuição dos valores foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk aplicado para a avaliação da espessura dos septos alveolares, congestão de vasos e capilares pulmonares e contagem de pontos NORs por célula. Foi testada a hipótese de nulidade, com distribuição normal dos valores e a hipótese alternativa com distribuição não normal. O nível de decisão estabelecido foi de $p < 0,05$. Em relação às variáveis espessura do septo alveolar e pontos NORs por célula aceita-se a hipótese de nulidade com distribuição normal dos valores ($p > 0,05$). Para a variável congestão de vasos e capilares aceita-se a hipótese alternativa com distribuição não normal dos dados ($p < 0,05$).

Para as variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste paramétrico de t de Student para amostras não pareadas. Para as variáveis com distribuição não normal foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

O tecido pulmonar de todos os animais foi avaliado quanto à presença de achados decorrentes de alterações provocadas pela exposição a altas concentrações de O₂ por tempo prolongado (tabela 1).

Em todos os animais submetidos à concentração de 100% O₂ por um período de 72 horas, foi observado ao término da exposição presença de padrão compatível com insuficiência respiratória aguda (aumento da frequência respiratória, cianose estado de hipocinesia).

Três dos 6 animais do grupo HIPERÓXIA evoluíram para óbito antes de completadas às 24 horas após o período de exposição e foram imediatamente submetidos à coleta de material para processamento e coloração. Observou-se à abertura da caixa torácica para retirada dos pulmões extenso conteúdo líquido transudativo na cavidade pleural. Os três animais restantes sofreram eutanásia 24 horas após a exposição (quadro 1).

Quadro 1 – Seqüência de eventos durante e após o período de exposição à concentração de oxigênio a 100% por 72 horas.

Grupo Hiperóxia	Período de exposição Hiperóxia	72 horas de exposição		24 horas após a exposição
6 animais	1 óbito Entre 60 ^a – 72 ^a hora	Presença Insuficiência respiratória em todos os animais restantes	2 óbitos Imediatamente após as 72 horas	Eutanásia dos 3 animais restantes

O achado mais expressivo nas secções preparadas em HE foi o aumento da espessura dos septos alveolares (figura 1), indicando presença de espessamento das paredes alveolares ($p < 0,0001$). Não foram observados níveis significantes de congestão capilar e de vasos ($p = 0,1998$) (tabela 1).

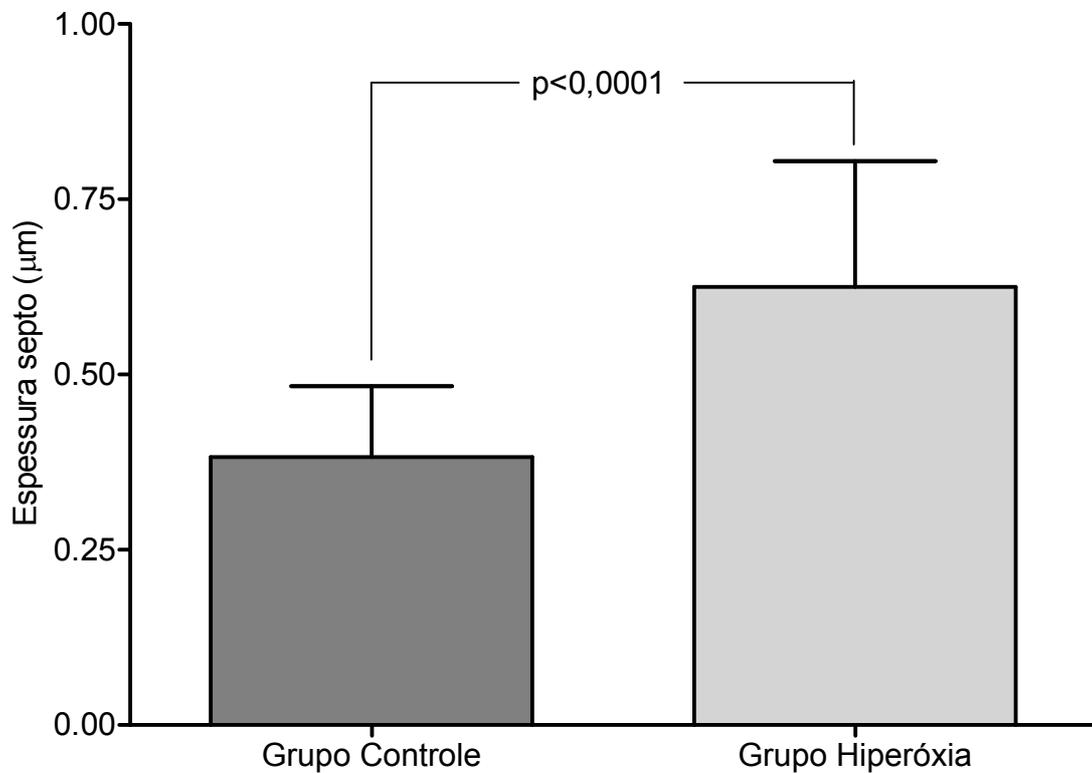
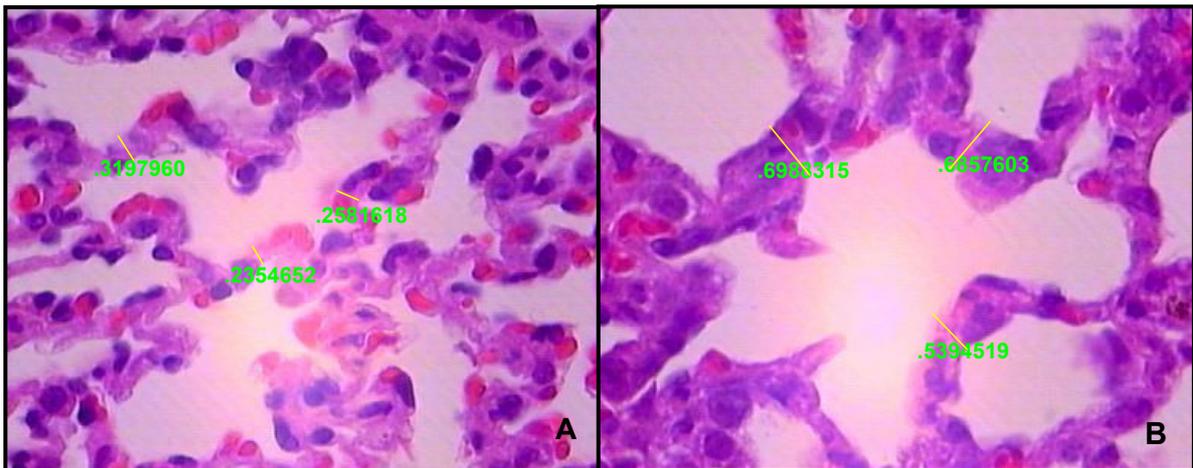
Tabela 1 – Análise histológica das colorações HE e AgNOR em relação a espessura dos septos alveolares, congestão de vasos e capilares e pontos NORs por célula dos grupos CONTROLE e HIPERÓXIA. Valores expressos em média±dp. (n=12)

Variáveis	Grupo CONTROLE	Grupo HIPERÓXIA	Valor de “p”
Espessura dos septos alveolares (μm)	0,38±0,1	0,62±0,2	*<0,0001
Congestão (+)	1,75±0,5	2,17±0,8	0,1998
Pontos NOR por célula (dots)	1,0±0,4	1,8±0,4	*0,0064

Nota: (*) Comparações estatisticamente significativas.

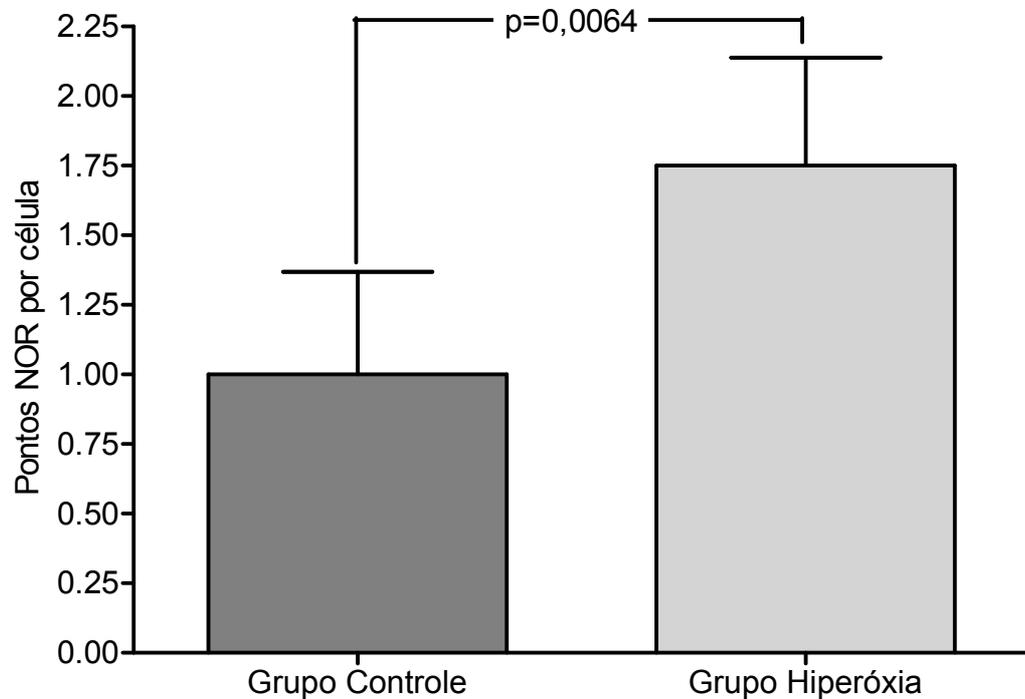
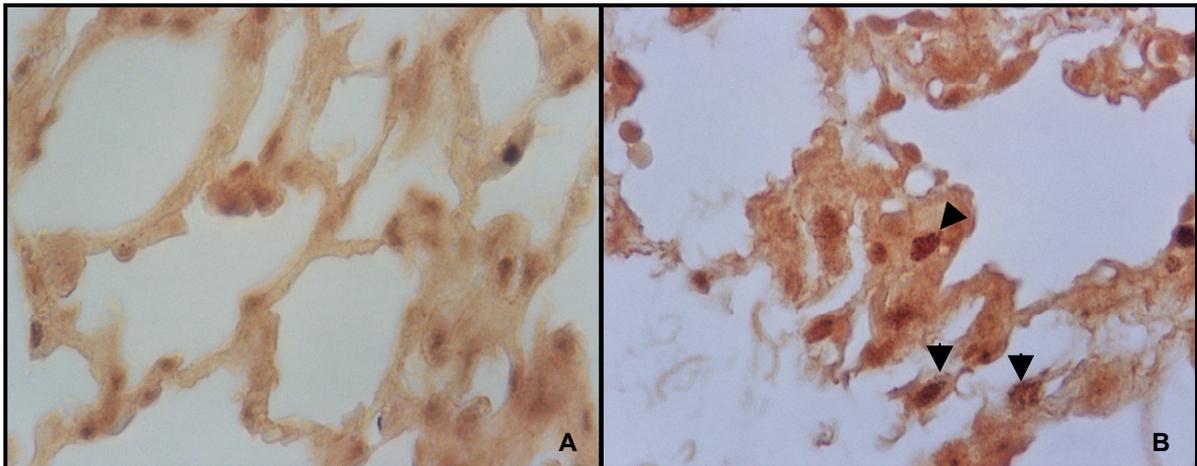
Achados como inflamação aguda, inflamação crônica, edema alveolar, hemorragia alveolar, desnudamento de áreas do epitélio alveolar e atelectasia não foram observados.

Em relação à comparação dos valores de pontos NORs por células, o grupo HIPERÓXIA apresentou um valor de pontos maior que o grupo CONTROLE ($p = 0,0064$) (figura 2).



C

Figura 1. Comparação da espessura dos septos alveolares. Fotomicrografia das secções pulmonares (HE, 400X). (A) Grupo CONTROLE ($0,38 \pm 0,1 \mu\text{m}$), (B) Grupo HIPERÓXIA ($0,62 \pm 0,2 \mu\text{m}$), submetido à ambiente com 100% O_2 por 72 horas. (C) Valores expressos em média \pm dp. Os valores são estatisticamente diferentes com aumento da espessura de septo alveolar para o grupo hiperóxia, $p < 0,05$ (teste t de Student).



C

Figura 2. Comparação do número de pontos NORs entre o grupo Controle e Grupo Hiperóxia. Fotomicrografia das secções pulmonares (AgNOR, 1000X). (A) Grupo CONTROLE (1,0±0,4 dots), (B) Grupo HIPERÓXIA (1,8±0,4 dots), submetido à ambiente com 100% O₂ por 72 horas. (C) Valores expressos em média±DP. Os valores são estatisticamente diferentes com número maior de pontos NORs nas células do grupo hiperóxia, $p < 0,05$ (teste t de Student).

Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que os animais do grupo HIPERÓXIA, expostos à condição ambiente de concentração de 100% de O₂ por tempo de 72 horas apresentaram sinais e sintomas relacionados à toxicidade do oxigênio. Tal fato

pode explicar a causa de óbito em alguns animais do grupo antes mesmo de completado o período total ou imediatamente ao final da exposição. Esta evidência vai de encontro a outros modelos experimentais com a investigação de dose resposta a diferentes concentrações de O₂, que identificaram para a concentração de 100% de O₂ por período de 72 horas situação semelhante, com óbito e lesão pulmonar difusa e menor formação de edema pulmonar quando utilizada baixas doses de O₂^{10, 11}. Estudo clássico da literatura científica também enumera que as altas concentrações de oxigênio por determinados períodos de exposição podem culminar em óbito e levar a quadros pulmonares compatíveis com lesão difusa².

Ao término do período de exposição todos os animais apresentaram padrão de insuficiência respiratória, sendo que 2 dos animais culminaram em óbito imediatamente após a exposição. Durante a abertura da caixa torácica para retirada dos pulmões foi observada grande quantidade de líquido translúcido na cavidade pleural destes animais. O aumento do processo de estresse oxidativo pode induzir o aumento da permeabilidade vascular, o que pode levar ao aumento do líquido pleural e de forma associada ao edema pulmonar. O uso de substâncias atenuantes das agressões oxidativas mostrou-se eficaz na diminuição destes efeitos, com redução de até 50% da quantidade de volume pleural em comparação aos grupos que não receberam substância antioxidante¹².

Em estudo realizado por Clayton et al.³, sobre as lesões pulmonares causadas pela inalação de monóxido de carbono e hiperóxia, observaram em relação ao líquido pleural e edema pulmonar que o volume de líquido pleural aumentou significativamente nos ratos expostos a O₂ e O₂ adicionado de monóxido de carbono (CO). Que tais efeitos se deram em decorrência da hiperóxia porque no grupo com inalação isolada com CO por 3 dias não houve acúmulo de líquido pleural.

Dentre os achados histológicos após análise das secções do tecido pulmonar, o observado com mais expressividade foi o aumento da espessura do septo alveolar no grupo HIPERÓXIA sugerindo o início de processo inflamatório. Tal evidência também foi observada em pesquisa¹³, com estudo das respostas pulmonares em coelhos prematuros submetidos a restrição nutricional e hiperóxia, constatando o espessamento dos septos alveolares, sugerindo um aumento do processo inflamatório.

A relação entre processo inflamatório e exposição a altas concentrações de gases mostram que a exposição ao CO e ao O₂ podem induzir o processo

inflamatório pulmonar, os estudos revelam altos níveis da atividade nos grupos estudados, indicando a presença do aumento de células inflamatórias³, outros estudos^{27, 28} sobre a exposição à hiperóxia em humanos, também descrevem aumento da concentração de albumina no lavado broncoalveolar como resultante do aumento da permeabilidade vascular causada pelo nível de hiperóxia. Tal situação esta relacionada com o influxo de células inflamatórias. Entretanto, nessa pesquisa aqui apresentada ao investigar-se a hipótese de achados inflamatórios não foi encontrada característica de processo inflamatório agudo ou crônico uma vez que na análise das secções de tecido pulmonar não foram observadas células próprias da instalação de processo inflamatório.

Tal fato sugere a hipótese de que não houve tempo hábil para a instalação do processo inflamatório. O estudo de Crapo² descreve a seqüência de estágios que ocorrem durante o processo de lesão celular em decorrência da toxicidade do O₂, sendo o primeiro estágio denominado de fase de iniciação e que a exposição em determinada quantidade da concentração do gás pode ser letal e não revelar evidências morfológicas significantes causadas pela lesão. Esta fase é imediatamente seguida pela fase inflamatória e em seguida pela fase de destruição com extensa lesão das células do parênquima pulmonar suficientes para levar a morte os animais, no entanto o óbito dos animais para este estudo levanta a hipótese da atribuição de causa à insuficiência respiratória aguda causada pelo derrame e congestão.

A associação das lesões provocadas por altas concentrações de O₂ e o estresse oxidativo são descritas em pesquisa sobre o efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos, que constataram, em observação contraditória, melhores resultados no grupo ventilado com oxigênio a 100% e que utilizou o antioxidante. A sugestão de que o efeito deletério da alta concentração de oxigênio associada à ventilação durante a isquemia-reperfusão pulmonar deve-se basicamente ao estresse oxidativo, parecendo que, quando este é bloqueado, o oxigênio em alta concentração tem algum efeito benéfico¹⁴.

A utilização de estratégia antioxidante durante condições de exposição à hiperóxia por tempo prolongado, podem garantir a manutenção da oxigenação arterial, a diminuição da fração de *shunt* intrapulmonar e diminuir o edema pulmonar, comparando-se a condições de exposição sem o uso de substâncias antioxidantes¹⁵.

Outro dado encontrado neste estudo foi o aumento dos pontos NORs no grupo HIPERÓXIA em relação ao grupo CONTROLE indicando um aumento da atividade mitótica celular induzida pela condição de exposição a condições de 100% O₂ por 72 horas contínuas.

O uso das AgNOR (regiões organizadoras nucleolares argirofílicas) como marcadores de proliferação celular se justifica porque tal técnica marca de forma quantitativa a interferência nos estágios do ciclo celular. A técnica de AgNOR se destina a marcar as regiões organizadoras nucleolares (NOR), que são as regiões cromossômicas que contém o maior número de genes ribossomal (rRNA). Assim, os números de AgNORs refletem o nível de síntese de rRNA, de tal maneira que seu aumento representa um aumento da frequência mitótica^{16, 17}.

O uso das AgNORs mostrou-se útil para avaliação de alterações celulares decorrentes da exposição a concentração de 100% O₂ por 72 horas, tendo suas vantagens caracterizadas por se tratar de uma técnica de baixo custo com avaliação em microscopia óptica de luz. Sugere-se, entretanto estudos adicionais para mais evidências a respeito da aplicação da técnica.

Barazzone et al.¹⁸, em estudo da toxicidade do O₂ em pulmão de ratos obtiveram como resultado que ambos, necrose e apoptose contribuem para morte celular durante hiperóxia. Foi realizado teste padrão com eletroforese do DNA pulmonar indicando que fragmentação internucleosomal (características de apoptose) e degradação total (característica de necrose) são induzidas pela hiperóxia e que a hiperóxia produz aumento da síntese de RNA ou nível de proteínas supressoras (p53), que são expressas em certos tipos de apoptose.

Em estudo sobre a reoxigenação após hipóxia grave, El Jamali et al.¹⁹, observaram aumento da produção de células e também da expressão da actina α -sarcomérica, bem como os níveis de mRNA foram elevados pela hipóxia/reoxigenação, com conseqüente hipertrofia de cardiomiócitos em vitro. Em conclusão, levantaram a dependência da hipertrofia de cardiomiócitos a espécies reativas de oxigênio.

Conclusão

A exposição à concentração de 100% por tempo de 72 horas pode causar alterações histológicas compatíveis com início do processo de inflamação e com

aumento da atividade celular em decorrência de agressões oxidativas, provocando disfunção respiratória para todo o grupo e óbito para alguns dos animais submetidos à hiperóxia.

ABSTRACT

Objective: evaluate the 100% oxygen concentration effects in Wistar rats' lung tissue after 72 hours of exposition. **Methods:** Twelve male rats with mean weight $210 \pm 15,9g$, 60 to 90 days of age was studied, at random distributed in two groups with 6 animals. CONTROL group remained in adaption phase conditions, and HYPEROXIC group was submitted to inhalation of 100% humidified oxygen concentration with 12 L/min continuous administration during 72 hours. **Results:** After exposition, all animals presented compatible signals of acute respiratory failure (respiratory rate increase, cyanosis and hypocinetic state), three animals to made death progress before 24 hours exposition. Histological analysis revealed alveolar septa thickness mean of $0,38 \pm 0,1 \mu m$ in CONTROL group, and $0,62 \pm 0,2 \mu m$ in HYPEROXIC group. The mean values of AgNOR dots for the CONTROL group was $1,0 \pm 0,4$ dots, and in HYPEROXIC group $1,8 \pm 0,4$ dots ($p=0,0022$). Acute inflammation, chronic inflammation, alveolar edema, alveolar hemorrhage, alveolar epithelium denuded areas and atelectasis weren't observed. **Conclusion:** That 100% oxygen concentration after 72 hour exposition can cause histological alterations compatible with inflammatory process beginning and cellular activity increase by oxidative aggressions, causing respiratory dysfunction in whole group and death in some animals submitted to hyperoxia.

Key words: Oxygen, hyperoxic, free radicals, oxidative stress, pulmonary disease.

Referências

1. Kleen M, Messmer K. Toxicity of high PaO₂. *Minerva Anesthesiol.* 1999; 65(6): 3936.
2. Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol.* 1986, 48(1): 72131.
3. Clayton CE, Carraway MS, Suliman HB, Thalmann ED, Thalmann KN, Schmechel DE et al. Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281(4): L94957.
4. AlMehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATPindependent membrane depolarization with ischemia in the oxygenventilated isolated rat lung. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1998, 18(5): 65361.

5. Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos AS, Andrade, DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol*. 2005, 31(1): 608.
6. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 43(1): 618.
7. Martinez GR, Medeiros MHG, Di Mascio P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Quím Nova*. 2000, 23(5): 6869.
8. Bowler RP, Nicks M, Warnick K, Crapo JD. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycininduced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002, 282(4): L71926.
9. II Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. *J Bras Pneumol*. 2000, 26(supl 2): S603.
10. Silveira RJ, Silva FM, Wilhelm Filho D, Cardoso JJD, Leão LEV. Estudo da fração inspirada de oxigênio na isquemiareperfusão pulmonar em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004, 19(5): 53547.
11. Ferreira MRA, Araújo Silva E, Pereira ALA, Ramos VPR, Paiva AEM, Lopes JAC. Efeitos do oxigênio em pulmões de ratas: estudo experimental. X congresso nacional de cirurgia experimental. 2007, P10.
12. Sinha A, Muthiah K, Jiang W, Couroucli X, Barrios R, Moorthy B. Attenuation of hyperoxic lung injury by the CYP1A inducer β naphthoflavone. *Toxicol Sci*. 2005, 87(1): 20412.
13. Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohlnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J Pediatr*. 2006, 82(3): 17985.
14. May Silva F, Silveira RJ, Hallal ALLC, Wilhelm Filho D, Cardoso JJD, Leão LEV. Efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemiareperfusão pulmonar em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 2004, 31(5): 2918.
15. Simonson SG, WeltyWolf KE, Huang Y, Taylor DE, Kantrow SP, Carraway MS et al. Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates: physiology and biochemistry. *J Appl Physiol*. 1997, 83 (2): 5508.

16. Oliver JR, Mara TW, Cherian MG. Impaired hepatic regeneration in metallothionein/II knockout mice after partial hepatectomy. *Exp Biol Med.* 2005, 230(1): 617.

17. Kato da Silva BA, Schettert Silva I, Pereira DM, Aydos RD, Carvalho PTC. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions in detection of lung cells alterations after Benzo[a]Pyrene instillation. *Act Cir Bras.* 2006, 21 (supl 4): 369.

18. Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF. Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998, 19(4): 57381.

19. El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW. Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3 β . *FASEB J.* 2004, 18(10): 10968.

Conflito de interesse: não

Entidade financiadora: não