

PATRÍCIA LIRA BIZERRA

**EFEITOS DA HIPERÓXIA VARIÁVEL NO ESTRESSE OXIDATIVO
E HISTOPATOLOGIA DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS.**

CAMPO GRANDE
2016

PATRÍCIA LIRA BIZERRA

**EFEITOS DA HIPERÓXIA VARIÁVEL NO ESTRESSE OXIDATIVO
E HISTOPATOLOGIA DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

CAMPO GRANDE
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRÍCIA LIRA BIZERRA

**EFEITOS DA HIPERÓXIA VARIÁVEL NO ESTRESSE OXIDATIVO
E HISTOPATOLOGIA DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Dedico o presente trabalho à minha família, aos meus amigos, aos professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste e à minha orientadora, pois sem eles não seria possível chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora, por tantas bênçãos e presença constante em minha vida.

À minha mãe Maria Izaura, por seu amor incondicional, apoio sem medidas, pelos exemplos, e por ser motivo de honra e admiração.

Ao meu esposo, Isaias, por acreditar nos meus sonhos, ser tão especial e presente em minha vida.

Ao meu filho Francisco que com seu primeiro ano de vida me ensinou muito mais do que tudo que aprendi ao longo dos meus 28 anos, seus olhares e sorrisos me inspiram.

À minha orientadora, Professora Doutora Iandara Schettert Silva pelo cuidado, confiança, respeito, carinho, por acreditar na minha capacidade, não desistir de mim e por dividir seus conhecimentos comigo.

Ao Anderson Fernandes da Silva e Elaine Silva de Pádua Melo que foram anjos na minha vida, essenciais pra a execução da pesquisa, ao Carlos Alberto do Nascimento Ramos pela imensa dedicação na realização das análises estatísticas, bem como à professora Dra Márcia Rodrigues Gorisch por me receber em sua casa, e por todo o carinho e paciência em examinar cuidadosamente 144 lâminas!

Enfim, à UFMS e ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, pela oportunidade.

Um tempo para cada coisa

Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:

tempo para nascer, e tempo para morrer;
tempo para plantar, e tempo para arrancar o que foi plantado;
tempo para matar, e tempo para sarar;
tempo para demolir, e tempo para construir;
tempo para chorar, e tempo para rir;
tempo para gemer, e tempo para dançar;
tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;
tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se.
Tempo para procurar, e tempo para perder;
tempo para guardar, e tempo para jogar fora;
tempo para rasgar, e tempo para costurar;
tempo para calar, e tempo para falar;
tempo para amar, e tempo para odiar;
tempo para a guerra, e tempo para a paz.

(Eclesiastes 3:1-15)

RESUMO

BIZERRA PL. Efeitos da hiperóxia variável no estresse oxidativo e histopatologia de ratos recém-desmamados. Campo Grande; 2016. [Dissertação - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste].

Com o objetivo de analisar as alterações em plasma e tecido pulmonar de ratos recém-desmamados submetidos à oxigenoterapia, através da avaliação de MDA e histopatologia pulmonar, foram utilizados 144 ratos da linhagem Wistar, expostos a diferentes concentrações de O₂ (21, 50, 75 e 100%). Cada grupo foi distribuído em subgrupos conforme o tempo de exposição (1, 2 e 3 horas), e redistribuídos conforme o tempo de eutanásia: imediatamente após a exposição, e após 10 dias da última exposição ao O₂, os pulmões foram coletados e fixados em formol para análise histológica onde foram observadas variáveis capazes de demonstrar alteração na histoarquitetura pulmonar. Concentrações elevadas de MDA no plasma de ratos que sofreram eutanásia imediatamente após a exposição ao oxigênio na fração 50% sugere estresse oxidativo independente do tempo. No entanto, não foi observada no presente estudo a relação entre elevação dos níveis de MDA e aumento das concentrações de oxigênio, as alterações pulmonares mais frequentes e significativas presentes nos animais expostos à hiperóxia foram: hemorragia, espessamento de septo e congestão, presentes em todos os grupos dez dias após a exposição ao O₂, mediante a não observação de fibrose progressiva ou restauração da arquitetura alveolar normal, pode-se considerar que não houve remodelamento pulmonar nos animais avaliados.

Palavras-chave: Oxigenoterapia, Lesão pulmonar, Estresse oxidativo, Remodelamento Pulmonar.

ABSTRACT

In order to analyze the changes in plasma and lung tissue of weanling rats with oxygen therapy by evaluating MDA and lung histopathology were used 144 Wistar rats exposed to different concentrations of O₂ (21, 50, 75 and 100%). Each group was distributed into subgroups according to the exposure time (1, 2 and 3 hours), and redistributed according to the euthanasia time: immediately after treatment, and 10 days after the last exposure to O₂, lungs were collected and fixed in formalin for histological analysis where variables were found able to demonstrate changes in lung architecture. High concentrations of MDA in plasma from mice were euthanized immediately after exposure to 50% oxygen fraction in oxidative stress suggests independent of time. However, it was not observed in this study the relationship between elevation of MDA levels and increased oxygen concentrations, the most frequent pulmonary changes and significant present in animals exposed to hyperoxia were hemorrhage, septal thickening and congestion, present in all groups ten days after exposure to O₂, by not observing progressive fibrosis or restoration of normal alveolar architecture, it can be considered that there was no lung remodeling in animals evaluated.

Keywords: Oxygen Therapy, lung injury, oxidative stress, pulmonary remodeling.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição do escore médio \pm desvio padrão da presença de alterações histopatológicas no parênquima pulmonar de ratos ao longo do tempo dentro de cada concentração de O ₂	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Delineamento do estudo..... 28
- FIGURA 2. Distribuição do escore médio de absorbância de Malondialdeído (MDA) encontrados nos pulmões de ratos submetidos a diferentes concentrações de oxigênio comparação do efeito ao longo do tempo dentro de cada concentração..... 33
- FIGURA 3. Distribuição do escore médio de absorbância de Malondialdeído (MDA) encontrados no plasma de ratos submetidos a diferentes concentrações de oxigênio comparação do efeito ao longo do tempo dentro de cada concentração..... 34
- FIGURA 4. Fotomicrografia de pulmão de rato submetido à normóxia (21% O₂), visão panorâmica da arquitetura pulmonar alterada, pulmão de rato submetido à hiperóxia (100% O₂)..... 36
- FIGURA 5. Fotomicrografia de pulmão de rato submetido à hiperóxia (75% O₂) durante 1 hora imediatamente após a exposição e pulmão de rato submetido à hiperóxia (50% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição..... 37
- FIGURA 6. Fotomicrografia de pulmão de rato submetido à hiperóxia (75% O₂) durante 2 horas dez dias após a exposição e pulmão de rato submetido à hiperóxia (75% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição..... 37
- FIGURA 7. Fotomicrografia de pulmão de rato submetido à hiperóxia (100% O₂) durante 2 horas imediatamente após a exposição e pulmão de rato submetido à hiperóxia (50% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CPAP	Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas
DBP	Displasia broncopulmonar
DD	Eutanásia após 10 dias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EOT	Estado Oxidante Total
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂	Frações Inspiradas de Oxigênio
FRAP	Ferric-Reducing Ability of Plasma
GPx-	Glutathione Peroxidase
h	hora
HE	Hematoxilina e eosina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPS	Hipertensão pulmonar secundária
IA	Eutanásia imediatamente após a exposição
IEO	Índice do Estado Oxidante
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
ODP	Oxigenoterapia domiciliar prolongada
OFA	Oxigênio de alto fluxo
ORAC	Oxygen Radical Absorbancy Capacity
P I	Pneumócitos tipo I
P II	Pneumócitos tipo II
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
RN	Recém-nascido
rpm	Rotação por minuto
SatO ₂	Saturação de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric Reactive Substances
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant
TRAP	Trapping Antioxidante Parameter
UFMS	Univesidade Federal do Mato Grosso do Sul
uPA	Uroquinase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VM	Ventilação Mecânica

LISTA DE SÍMBOLOS

*O_2	Superóxido
*OH	Hidroxila
1O_2	<i>Singlet</i> de O_2
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilo
mg	Miligramas
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
O_2	Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	17
2.2 Oxigenoterapia	19
2.3 Peroxidação lipídica e Malondialdeído	21
2.4 Remodelamento pulmonar	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Local e período	27
4.2 Animais de experimentação	27
4.3 Delineamento	27
4.4 Coleta da amostra e armazenamento	29
4.5 Avaliação lipídica Quantificação do malondialdeído do plasma pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) ou ensaio	29
4.6 Quantificação do malondialdeído do tecido pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) ou ensaio	30
4.7 Análise Histopatológica	31
4.8 Análise estatística	31
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio (O_2) é um elemento químico incolor, inodoro e pouco solúvel que constitui 21% do ar que respiramos e é fundamental para o desenvolvimento celular (GULINA, 2015). De todos os fatores que determinam a manutenção da vida, a abstenção ao oxigênio é o que acarreta mais rapidamente à morte. Como consequência, o uso adicional de oxigênio torna-se necessário em diversas ocasiões onde a oxigenação do sangue ou tecidos ficam prejudicadas, o tratamento deve ser feito de forma contínua até a recuperação do doente e a dose ofertada de O_2 deve ser bem calculada para evitar efeitos indesejáveis (CERVAENS et al., 2014).

Oxigenação adequada é aquela que leva O_2 suficiente para o consumo requerido. Evitar a hipóxia é importante, no entanto, manter condições de hiperóxia pode levar ao estresse oxidativo e dano tissular. Para muitos neonatos a oxigenoterapia é fundamental para sua sobrevivência, apesar de seus benefícios, o excesso pode produzir reações tóxicas ao organismo. No pulmão a toxicidade do O_2 depende de três fatores: concentração do gás inspirado, duração da exposição ao oxigênio e susceptibilidade individual que depende do metabolismo e nível de antioxidantes endógenos (LAFUENTE et al., 2011).

A ventilação mecânica é bastante utilizada em casos de hipóxia, utilizando altas concentrações de oxigênio em estado de choque. No entanto, esta abordagem é utilizada de maneira indiscriminada, atendido pela descrença do potencial pró-inflamatório dos efeitos da hiperóxia, mesmo reconhecendo o papel de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo no dano tecidual (BITTERMAN, 2010).

Episódios frequentes de hipóxia/hiperóxia podem produzir alterações significativas no organismo que poderiam ser evitadas com o manejo correto do O_2 principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo fundamental a monitorização e controle ao ser administrado nos neonatos, visto que, a toxicidade nesta etapa da vida é muito alta (MASIDE, 2014).

As espécies oxidantes originam um processo de várias etapas que é classificado como peroxidação lipídica. Como consequência, existem vários

produtos resultantes desse processo, entre eles o malondialdeído (MDA), que é considerado um potencial agente genotóxico e clastogênico por sua ação lesiva no genoma humano. Neste sentido, a avaliação do MDA em amostras biológicas é considerada um indicador do aumento da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, da lesão oxidativa *in vivo* (CRISTÓVÃO et al., 2013).

O estresse oxidativo pode gerar diversos efeitos desfavoráveis ao funcionamento normal do pulmão, afetando a remodelação da matriz extracelular, a respiração mitocondrial, a proliferação celular, a reparação alveolar e a modulação do sistema imune, bem como os mecanismos de proteção do pulmão, como as telas de surfactante e antiproteases, também é considerado ser um fator determinante em respostas inflamatórias, por meio da ativação de fatores de transcrição, e deste modo à transdução de sinal e expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios (PARK; KIM; LEE, 2009).

O recém-nascido está mais suscetível à injúria oxidativa dessas espécies reativas tóxicas por ter uma defesa antioxidante ainda imatura e não ter proteção suficiente contra as espécies reativas de oxigênio. Embora apresentem um importante papel nos processos biológicos normais, os radicais livres de oxigênio estão associados à origem de diversas patologias no período neonatal (RODRIGUES, 1998). Além disso, apresentam condições clínicas que exigem a administração de altas concentrações de O₂ e ventilação mecânica, o que pode levar a uma lesão permanente do desenvolvimento pulmonar (TEIXEIRA, 2007).

Portanto é de suma importância pesquisas que aprofundem e detalhe o uso correto de O₂, principalmente em neonatos, o que irá contribuir para maiores esclarecimentos culminando em uma melhor utilização da oxigenoterapia.

Dessa forma, o presente estudo tem o intuito de analisar as disfunções em pulmão e plasma e histopatologia pulmonar de ratos recém-desmamados submetidos à oxigenoterapia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica é denominado Radical Livre. No entanto, alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, embora participem das reações de oxirredução aeróbicas. Dessa forma, os termos *reactive oxygen species* (ERO – espécies reativas de oxigênio) e *reactive nitrogen species* (ERN- espécies reativas de nitrogênio) são considerados mais apropriados por descreverem melhor esses agentes químicos (FERREIRA; MATSUBARA, 2014; DE VASCONCELOS et al., 2014).

A principal maneira de o oxigênio ser metabolizado no organismo inclui a sua completa redução à água, de modo que reúna quatro elétrons ao final da cadeia respiratória. Se o oxigênio for reduzido com um número menor de elétrons, ao longo da cadeia respiratória, haverá produção de radicais livres de oxigênio intermediários. Os principais radicais livres de O_2 conhecidos são: *singlet* de O_2 (1O_2), hidroxila (*OH), superóxido ($^*O_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (JUNIOR e tal., 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 2014;).

Em condições fisiológicas normais, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os que restam são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células (ALVES, et al., 2010).

O aumento na produção de ERO está relacionado à alteração no equilíbrio intracelular oxidante/antioxidante, que pode causar resultados deletérios para a homeostase celular. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das

membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID JM; DAVID JP, 2006; VASCONCELOS et al., 2007; CRISTÓVÃO et al., 2013;).

Os radicais livres originam reações com substratos biológicos podendo causar danos às biomoléculas e, dessa forma, afetar a saúde humana. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Quando isso ocorre na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, podendo rompê-la, levando à morte celular (BARREIROS; DAVID JM; DAVID JP, 2006).

Pelo papel desempenhado por essas moléculas em várias situações da prática clínica, o conhecimento acerca dos radicais livres de oxigênio, tem se tornado assunto de grande interesse nas últimas décadas. O fator semelhante a todas essas situações clínicas é a existência de microambientes de hipóxia seguidos por reoxigenação, ou de isquemia seguidos por reperfusão, favorecendo a geração dos ERO. Como os pulmões entram em contato com o oxigênio por duas vias diferentes, perfusão e ventilação, tornam-se alvos frequentes dos ERO e muitas doenças pulmonares parecem ser influenciadas por essas moléculas (JUNIOR et al., 2005).

No entanto, compreende-se que a produção de radicais livres nem sempre é deletéria ao organismo, pelo contrário, é fundamental em muitos processos biológicos, como sinalização celular, contração muscular e sistema imune, pois quando as células são agredidas por algum agente estressor, como forma de defesa acabam produzindo radicais livres para combater esses agentes (PEREIRA; PEREIRA, 2012).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Uma ampla definição de antioxidante seria qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (DE VASCONCELOS et al., 2014).

Em estudo realizado para verificar os efeitos do exercício físico aeróbio sobre os biomarcadores de estresse oxidativo através da peroxidação lipídica em ratos o nível de MDA foi medido a fim de observar a influência de exercício aeróbico na formação de estresse oxidativo em vários tecidos. Não foram

encontrados dados significativos sobre a atividade dos níveis de MDA nos tecidos analisados quando se comparam os grupos controle e exercício. No entanto, o músculo estriado apresentou maior sensibilidade à ação da lipoperoxidação em comparação ao músculo liso (LIMA et al., 2012).

2.2 Oxigenoterapia

A oxigenoterapia é definida como o fornecimento artificial de oxigênio em ar inspirado, o seu principal objetivo é a oxigenação dos tecidos, hoje, esse tipo de tratamento é a ferramenta terapêutica mais utilizada em pacientes com insuficiência respiratória tanto aguda, quanto crônica (PAREDES et al., 2009).

A necessidade de oxigenoterapia é determinada pela mensuração de uma pressão parcial de oxigênio (PaO_2) e/ou saturação de oxigênio ($SatO_2$) inadequada, seja através de métodos invasivos ou não invasivos (SAUGSTAD, 2012).

De acordo com Tamez (2013), o desenvolvimento fetal ocorre em ambiente com concentrações de O_2 mais baixas que a do organismo materno, atingindo níveis superiores a 90% por volta do décimo minuto após o nascimento. A carência de O_2 pode ocasionar hipoxemia severa, afetando as funções vitais e prejudicando o desenvolvimento cerebral. A oxigenoterapia consiste no tratamento da hipóxia por meio da inalação de O_2 , e deve ser umidificado e aquecido conforme o tipo de administração recomendada, variando conforme a eficiência do sistema a ser empregado, a causa e o grau de insuficiência respiratória.

Uns dos principais distúrbios responsáveis pelas admissões nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais são os respiratórios. Desse modo, os neonatos que apresentam distúrbios respiratórios podem necessitar de alguma modalidade oxigenoterápica, exigindo monitorização e procedimentos indispensáveis para um diagnóstico precoce e, conseqüentemente, para manter a vida desses indivíduos (BARBOSA; CARDOSO, 2014).

O aumento da sobrevivência de pacientes muito prematuros só foi possível graças aos avanços que ocorreram na neonatologia e apesar das novas abordagens neonatais, a displasia broncopulmonar (DBP) ainda mantém

importância significativa, sendo que muitos desses pacientes têm alta hospitalar em uso de oxigênio. A oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP) é uma prática cada vez mais frequente, e muitos pacientes têm obtido vantagens com a sua utilização. Além dos diversos benefícios clínicos e fisiológicos proporcionados por ela, ainda gera maior conforto aos pacientes e redução significativa de custos quando comparado à permanência em hospitais (ADDE et al., 2013).

Em seu estudo Munhoz e colaboradores (2011), observaram que a terapia com ODP foi empregada em distintas doenças crônicas para correção da hipoxemia e da hipertensão pulmonar secundária (HPS), com maior frequência em pacientes na faixa etária de lactentes e período pré-escolar, sendo a fibrose cística, a displasia broncopulmonar e a bronquiolite obliterante as doenças predominantes. O tempo de ODP para os pacientes com essas patologias foi relativamente prolongado e a sua presença está associada à necessidade de maiores períodos de tratamento e incremento de fluxos de O₂, sem associação com o tempo de sobrevida.

A utilização de misturador de O₂ e ar comprimido permite oferecer concentrações entre 21-100%. As principais formas de administrar O₂ descritas na literatura são: incubadora, capacete, halo ou hood, máscara facial e funil, cânula nasal, cateter tipo óculos neonatal, Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas (CPAP) e Ventilação Mecânica (VM) invasiva (TAMEZ, 2013).

O oxigênio de alto fluxo (OFA) tem sido descrito como uma alternativa útil para a terapia de oxigênio convencional de pacientes com insuficiência respiratória aguda para obtenção de uma melhora rápida dos sintomas. Em suma, o OFA é uma nova opção de oxigênio que, aquecido e umidificado, permite administração de gás totalmente condicionado a fluxos muito altos (60 l/min). Com as evidências atuais, OFA é uma opção terapêutica atraente e útil para pacientes com insuficiência respiratória aguda, permitindo a melhora da oxigenação, diminuição do trabalho respiratório e aumento do bem estar. No entanto, são necessários mais estudos para determinar seu possível impacto em termos de morbidade e custo-efetividade (MASCLANS; PÉREZ-TERÁN; ROCA, 2015).

Em situações de hiperóxia ocorre um marcado e progressivo aumento na produção de radicais livres de oxigênio. Por exemplo, em condições de 95%

de oxigênio, a cadeia respiratória mitocondrial e as enzimas da cadeia microssômica aumentam a sua produção de radicais livres em 10 ou mais vezes, em comparação com condições de oxigênio a 21% (ROCHA, 2008).

2.3 Peroxidação lipídica e Malondialdeído

O processo de peroxidação lipídica pode iniciar-se na membrana interna da mitocôndria, quando o radical hidroxila, busca retirar o hidrogênio das ligações C³H da cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados. Esse fato trará consequências homeostáticas severas para a membrana, refletindo, principalmente, na sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez. Os produtos formados das oxidações dos lipídeos (malondialdeídos) e proteínas (grupamentos carbonila) podem ser quantificados em espectrofotômetro por técnicas laboratoriais, através de dosagens realizadas tanto em amostras de sanguíneas quanto teciduais (ANTUNES-NETO; SILVA; MACEDO, 2015).

Atualmente, o Malondialdeído (MDA) é considerado boa opção como biomarcador geral de dano oxidativo em plasma. O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA), pois, reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (VASCONCELOS et al., 2007).

Embora haja um esforço mundial para validação de biomarcadores de estresse oxidativo, até o momento, não há consenso sobre qual o método mais útil ou específico para os diferentes tipos de dano oxidativo. O teste de TBARS (*Thiobarbituric Reactive Substances* – Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico), apesar de inespecífico, ainda apresenta ampla aplicação devido, especialmente, à sua facilidade de execução e baixo custo em comparação aos demais métodos. No entanto, outros biomarcadores podem ser utilizados tanto para observar antioxidantes, quanto marcadores de dano oxidativo como TRAP- Parâmetro antioxidante relacionado à captura total de radicais. ORAC- Capacidade de absorvência do radical oxigênio. FRAP- Habilidade plasmática de reduzir o sal férrico. TEAC - Capacidade antioxidante equivalente ao trolox. SOD- Superóxido dismutase. GPx- Glutathiona

Peroxidase. CAT- Catalase. HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (FRANÇA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2007).

A determinação de substâncias envolvidas no contexto antioxidante–pró-oxidante revela-se de grande importância, com perspectivas de aplicação clínica para diagnóstico de doenças e do estado geral de saúde do indivíduo. Além disso, o entendimento dos mecanismos utilizados pelas células para a manutenção do balanço redox do meio é fundamental na identificação de biomarcadores representativos para a avaliação do nível de estresse oxidativo de diferentes indivíduos (VASCONCELOS et al., 2007; FRANÇA et al., 2013).

Ao serem avaliados os níveis de MDA em tecido pulmonar e plasma de ratos submetidos a hiperóxia induzida em diferentes níveis de oxigênio, determinando a concentração de MDA no plasma e no pulmão dos ratos submetidos a hiperóxia em 60% e 24%, com base na reação do MDA com o TBAR, conclui-se que quanto maior a concentração de oxigênio a que os animais foram expostos, maior a concentração de MDA no tecido pulmonar (BERTÉ, 2014).

2.4 Remodelamento pulmonar

Devido à sua conexão com o ambiente, o pulmão é um dos órgãos mais acometidos por lesões oriundas de oxidantes exógenos, como poluentes ambientais, e por espécies reativas de oxigênio endógenas geradas por células inflamatórias. O organismo tem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que neutralizam os efeitos nocivos dos produtos de espécies reativas de oxigênio endógenas (CRISTÓVÃO et al., 2013; PARK; KIM; LEE, 2009).

Provavelmente a primeira linha de defesa pulmonar contra o stress oxidativo é o fluido de revestimento epitelial do trato respiratório, que possui alto poder antioxidante. Na vida intrauterina, o feto e o pulmão estão protegidos dos possíveis efeitos citotóxicos do oxigênio devido à circulação placentária. Estudos em animais demonstraram um período de amadurecimento de sistemas enzimáticos antioxidativos no final da gestação, em período

simultâneo a produção de surfactante pulmonar (SAUGSTAD, 2003; JUNIOR, et al., 2005).

O epitélio brônquico normal é uma estrutura estratificada que consiste em uma camada colunar suportada por células basais e serve como barreira física e química para o ambiente externo. O epitélio brônquico defende as vias aéreas pela secreção de muco e de moléculas que envolvem e inativam substâncias inaladas, que são então removidas pela atividade de batimento ciliar. O mecanismo de apoptose das células epiteliais brônquicas em resposta a agravos é um mecanismo de manutenção da saúde do epitélio. A desregulação da apoptose é uma possível causa de remodelamento epitelial. A sensibilidade intrínseca aos oxidantes pode ser um mecanismo que desencadeia alterações epiteliais, estabelecendo microambiente propício para a persistência da inflamação das vias aéreas, danos crônicos e remodelamento tecidual (RIZZO; FOMIN, 2005).

A indução a uma reação reparativa estereotipada à lesão tecidual é chamada de fibroproliferação, caracterizada pela substituição de células epiteliais lesadas por miofibroblastos e seus produtos do tecido conjuntivo nos espaços aéreos, interstício, bronquíolos respiratórios e paredes da microcirculação intra-acinar. A resposta fibroproliferativa começa quase que imediatamente após o início da lesão, numa tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar. O acúmulo de células inflamatórias e a entrada de plasma nos espaços alveolares alteram o microambiente alveolar, conduzindo a evolução do remodelamento tecidual para a fibrose progressiva ou para a restauração da arquitetura alveolar normal (BARROS et al., 2003).

O processo de reparo deve começar com a reversão do edema e retirada de proteínas solúveis e insolúveis que se acumulam nos espaços intersticial e alveolar. Precocemente, tal processo também envolve reepitalização da barreira alvéolo-capilar, com proliferação de pneumócitos tipo II (P II) e angiogênese. Ao mesmo tempo, há proliferação de fibroblastos associada com deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), que contribui para complacência pulmonar diminuída e perda da arquitetura alveolar normal. A resolução dessa alveolite fibrosante requer mais remodelamento do pulmão com resolução gradual da fibrose pulmonar e restauração das unidades alvéolo-capilares. Exsudatos alveolares, contendo fragmentos de fibrina,

fibronectina e outros componentes da matriz, formam uma cicatriz tridimensional que mantém a arquitetura alveolar e previne a adesão imediata das membranas basais expostas (BARROS et al., 2003).

A superfície epitelial brônquica, além de atuar como barreira física e funcional a agentes externos, quando lesada é capaz de modular o processo de reparação, pela secreção de proteínas na matriz extracelular e pela interação com fibroblastos. O remodelamento inclui danos epiteliais, espessamento da membrana basal reticular, hiperplasia e hipertrofia de musculatura lisa, hiperplasia das células caliciformes epiteliais, neoformação vascular e nervosa e deposição de proteínas na matriz extracelular. Essas alterações têm atraído interesse devido à observação de que são pobremente controladas com estratégias terapêuticas anti-inflamatórias (RIZZO; FOMIN, 2005).

Essa matriz tridimensional fornece, também, um meio para migração de células inflamatórias, epiteliais, mesenquimais e endoteliais. Um fator importante é a existência de uma barreira epitelial intacta, pois o reparo do pulmão lesado envolve interações complexas entre células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento. Além disso, PII intactos são necessários para a produção normal de surfactante e o mecanismo envolvido na retirada do fluido alveolar depende do transporte ativo de sódio, que também requer uma barreira epitelial intacta. Quando a integridade e função do epitélio alveolar são preservadas, a retirada do líquido alveolar pode ser estimulada mesmo na presença de edema intersticial (BARROS et al., 2003).

No pulmão normal, as proteínas da matriz extracelular (MEC) são secretadas localmente por células da própria matriz, de modo mais evidente pelo fibroblasto, e organizadas em uma rede nos espaços que circundam as células. Contudo, a matriz ocupa um volume significativo no tecido e não representa massa inerte que somente proporciona suporte estrutural, visto que possui informações que orientam a migração, ligação, diferenciação e organização das células, modulando, assim, uma série de processos (RAGHOW, 1994).

O tipo de célula epitelial que recobre a superfície alveolar depende, em parte, da extensão da lesão. PII proliferam e se diferenciam em PI em áreas

pouco lesadas do pulmão, enquanto que células epiteliais brônquicas recobrem áreas onde nenhum PII sobrevive. O espaço alveolar normal possui atividade fibrinolítica, que se deve à presença de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), de forma que o espaço alveolar elimina eficientemente sua fibrina intra-alveolar (RIZZO; FOMIN, 2005).

Durante a lesão pulmonar aguda, a atividade pró-coagulante alveolar aumenta na mesma proporção que a deposição de fibrina. A remoção da fibrina intra-alveolar é importante para a resolução da doença. Se a fibrina extravascular for removida, torna-se possível a reconstituição do espaço alveolar normal. Se a fibrina permanece, fibroblastos migram para a matriz de fibrina e secretam colágeno intersticial. Serão formados cicatrizes fibróticas, paredes alveolares espessas ou espaços aéreos obliterados, dependendo da localização e extensão do exsudato residual (BARROS et al., 2003).

Embora o processo de remodelamento desenvolva-se em paralelo ao processo inflamatório, biópsias de vias aéreas em crianças tem evidenciado reestruturação tecidual até quatro anos antes do aparecimento dos sintomas. Isto indica que o remodelamento inicia-se precocemente e pode ser um pré-requisito para o estabelecimento da inflamação persistente. Baseado nestas evidências surge a suspeita de que o processo de remodelamento possa ser um evento primário na história natural da asma (RIZZO; FOMIN, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as alterações em plasma e tecido pulmonar de ratos recém-desmamados submetidos à oxigenoterapia, através da avaliação de MDA e histopatologia pulmonar.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma de ratos submetidos a 21%, 50%, 75% e 100% de O₂, durante 1, 2 e 3 horas com base na reação do MDA com TBA.
- Avaliar a concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão de ratos submetidos a 21%, 50%, 75% e 100% de O₂ durante 1, 2 e 3 horas com base na reação do MDA com TBA.
- Identificar o surgimento de alterações pulmonares através de análise histopatológica, segundo a concentração de O₂ e o tempo de exposição;
- Analisar a arquitetura pulmonar e observar presença de remodelamento no tecido;

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local e período

O estudo foi realizado no setor Experimentação do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande- MS no período compreendido entre os meses de Março a Junho de 2014.

4.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 144 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, recém-desmamados, com 21 dias de idade da linhagem Wistar provenientes do Biotério – UT / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande- MS.

Os animais foram mantidos em grupos de 12 em caixas de polipropileno, com tampa/ grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água e condições controladas de luminosidade (ciclo dia e noite) e temperatura (24,1±1,2°C; 40 a 60% de umidade relativa), em estante ventilada. Os locais de alojamento dos animais eram isolados de focos de ruídos fortes, evitando assim transtornos no comportamento e fisiologia dos animais.

A alimentação/ hidratação se manteve *ad libitum* substituídos a cada dois dias. A ração ofertada foi da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes ®. Essas condições foram utilizadas com base para adaptação inicial.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais/CEUA/UFMS conforme protocolo nº 524/2013 (ANEXO A).

4.3 Delineamento

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, cada um com 36 animais, expostos a diferentes concentrações de O₂ (21,50,75 e 100%), cada grupo foi distribuído em subgrupos com 12 animais cada, conforme o tempo de exposição (60, 120 e 180 minutos), desses, 6 animais foram submetidos à eutanásia imediatamente após a exposição (IA), para posterior coleta de sangue e remoção dos pulmões para análise do estresse oxidativo e histologia,

os demais grupos também com 6 animais cada, foram mantidos em ambiente controlado (estante ventilada) e avaliados após 10 dias (DD) da última exposição ao O₂ (31 dias) como demonstrado na Figura 1.

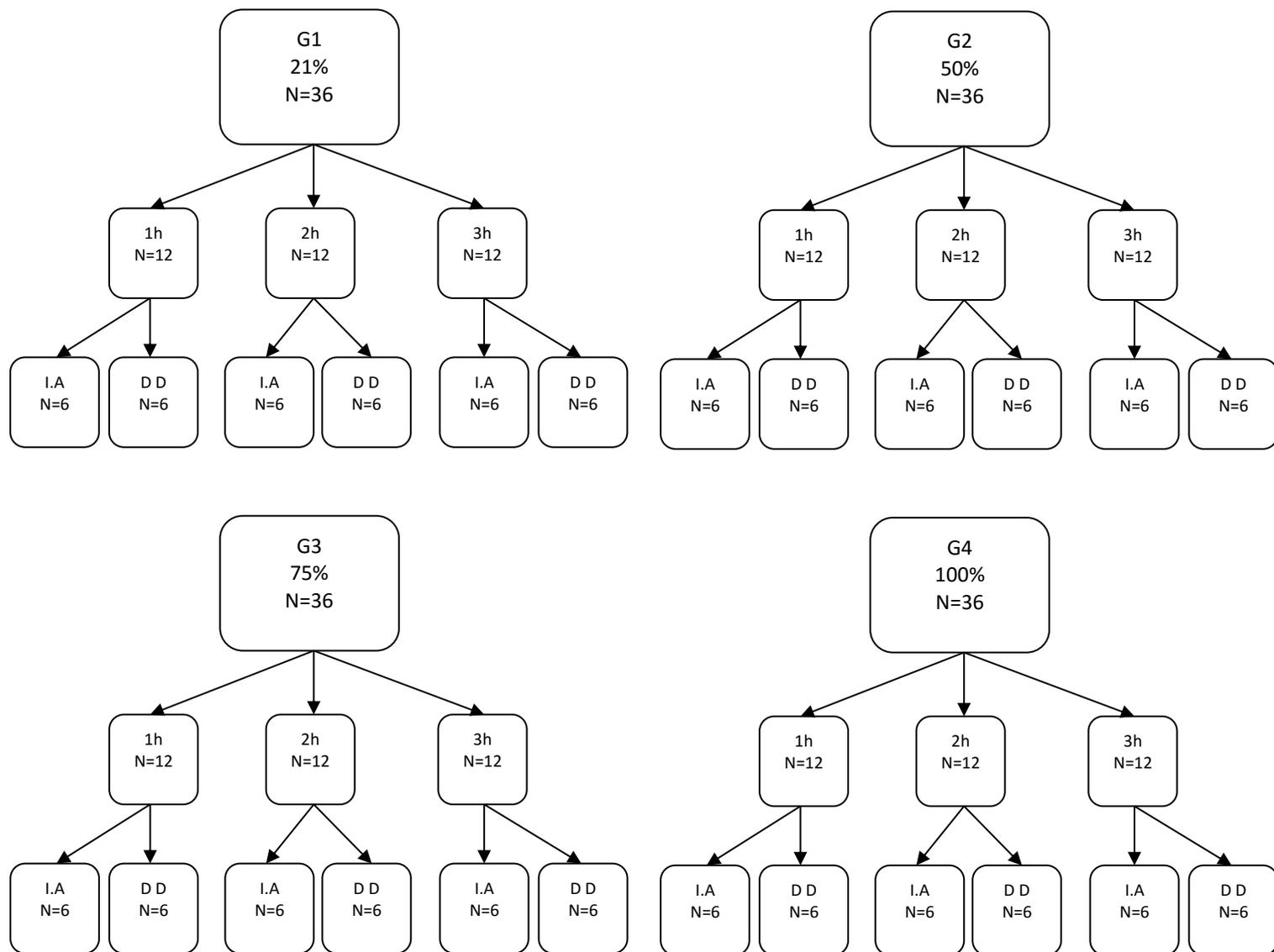


FIGURA 1. Delineamento do estudo. I.A – Eutanásia imediatamente após a exposição ao O₂, DD – Eutanásia 10 dias após exposição ao O₂.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória, permanecendo o grupo 21% nas mesmas condições da fase de adaptação e grupo Fluxo de Oxigênio a ser avaliado (50%, 75% e 100%) colocado em caixas desenvolvidas para o estudo nas dimensões 30x40x30 cm com fechamento hermético proporcionado pela adesão tampa/caixa com adesivo de silicone e suplemento de oxigênio.

O Oxigênio umidificado foi administrado em um único momento de forma

contínua nas concentrações pré-estabelecidas, por 1, 2 ou 3 horas seguidas, conforme o subgrupo. Esse fluxo contínuo foi utilizado para prevenir o acúmulo de dióxido de carbono e manter a concentração constante de Oxigênio desejada em ambos os subgrupos.

4.4 Coleta da amostra e armazenamento

Imediatamente após o término da exposição ao oxigênio, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (60mg/kg) e xilazina (10mg/kg), associadas em uma única seringa, na proporção de 1 ml de quetamina para 0,5 ml de xilazina e administrado 0,05 ml da mistura para cada 100g de peso vivo do animal. Amostras de sangue foram coletadas através da punção cardíaca

O plasma foi separado por centrifugação a 3500 rpm durante cinco minutos. Em seguida, foi armazenado para análise posterior. Após as amostras de sangue foram recolhidas, os animais foram submetidos a eutanásia através de uma dose letal de tiopental sódico (150 mg / kg). Posteriormente, a tricotomia da região torácica foi realizada a toracotomia para dissecação do pulmão, que foram lavados em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, armazenado em Eppendorf, identificado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise.

4.5 Quantificação do malondialdeído do plasma pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) ou ensaio

As amostras séricas de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e adicionada a tubos de ensaio identificados. 250 micro litros de TBA foram adicionados para cada 125 micro litros de plasma. Após a pipetagem da amostra em todos os tubos foram fechados com uma tampa de rosca e aquecido num banho de água a 94 ° C durante uma hora. Subseqüentemente, as amostras foram aclimatadas a temperatura ambiente por descansando sobre um contador à temperatura ambiente durante 15 minutos, 1 ml de reagente de álcool n-butílico foi adicionado a cada tubo de ensaio. Em seguida,

cada tubo foi misturado individualmente no agitador de vórtice, de modo a alcançar a extração máxima de MDA para a fase orgânica. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos e dividido em duas fases, 3 ml do sobrenadante colorido foi colocado em cuvets para a leitura espectrofotômetro a 535 nm.

4.6 Quantificação do malondialdeído do tecido pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) ou ensaio

O processo de homogeneização do tecido começou com o descongelamento da amostra à temperatura ambiente, seguido por lavagem na mesma solução KCl 1,15%. A amostra foi, então, removida da solução de lavagem, secou-se cuidadosamente com gaze e pesada numa balança analítica. Usando uma pipeta descartável, a solução de KCl 1,15% foi adicionado numa proporção de 10: 1 em massa. A amostra foi imersa em solução KCl 1,15% e seccionada em pequenas porções. Em seguida, o Becker contendo o material foi levado para o moinho (Turrtec TE-102) para homogeneização.

No final, o material homogeneizado foi colocado num tubo de ensaio. Subsequentemente, foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos. 500 micro litros de sobrenadante foram pipetadas e 1 ml de TBA foi adicionado, e aquecida em banho-maria durante uma hora. Em seguida, as amostras foram aclimatadas à temperatura ambiente durante 15 minutos, foi adicionado a cada tubo de ensaio 1 ml de reagente de álcool n-butílico. Posteriormente, cada tubo foi misturado individualmente no agitador de vórtice (QL-901) durante 40 segundos e centrifugou-se a 3.500 rpm durante 10 minutos. Sobre 3 ml do sobrenadante colorido foi colocado em cuvets para a leitura espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de MDA em cada cuvete foi expresso em nmol de MDA / mg de proteína.

Antes de iniciar a leitura de amostra, o espectrofotômetro foi calibrado e ajustado para uma leitura a 535 nm. Em seguida, o equipamento foi zero com uma solução de controlo (branco), e o padrão de controlo de leitura para MDA foi realizada.

Para o cálculo da concentração MDA foi utilizada uma equação obtida a partir da curva padrão da absorvância gerado por concentrações conhecidas como padrão.

4.7 Análise Histopatológica

Os cortes foram analisados por um patologista, sem o conhecimento da origem das lâminas, através da microscopia óptica de luz (Microscópio binocular Nikon Eclipse E200), desde a visão panorâmica até a objetiva de aumento final de 400x, em campos aleatórios e sobre dois cortes seriados e transformados em scores numéricos, os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Ao final da observação das lâminas foi obtida uma média aritmética dos scores e transformados em valores numéricos respectivamente: 0 – ausente; 1 – pouco; 2 – moderada; 3 – intensa, para as alterações relacionadas com hemorragia, espessamento de septo, processo inflamatório, edema, congestão vascular e atelectasia.

Especificamente para a contagem de macrófagos e arquitetura pulmonar foram utilizados os scores: 1 – normal e 2 –alterado. Para as células macrofágicas considera-se alterada a presença de mais de quatro células em um único alvéolo ou mais de oito macrófagos nas áreas de atelectasia e inflamação, observados com a utilização da objetiva de 40x.

4.8 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados da quantificação do malondialdeído no tecido e no plasma foi utilizada ANOVA de um fator para as comparações envolvendo mais de dois grupos, e o teste t de Student para as comparações entre dois grupos experimentais.

Para análise estatística das variáveis observadas na histopatologia foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do nível de absorvância de MDA no pulmão dos animais que sofreram eutanásia logo após a exposição ao oxigênio, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 50%, 75% e 100% de O₂ ($p>0,05$). No entanto, todos os tratamentos apresentaram médias de MDA significativamente inferiores ($p<0,05$) ao grupo 21%.

Com exceção do tratamento 3 horas, as concentrações médias de MDA nos animais tratados com 100% de oxigênio foram significativamente inferiores as observadas nos tratamentos com 21%, 50% e 75% (Figura 2). O que contraria o estudo de Berté (2014), onde ratos da linhagem Wistar submetidos a fluxos de 24 e 60% de O₂ durante uma hora, apresentaram resultados elevados de MDA no plasma e pulmão.

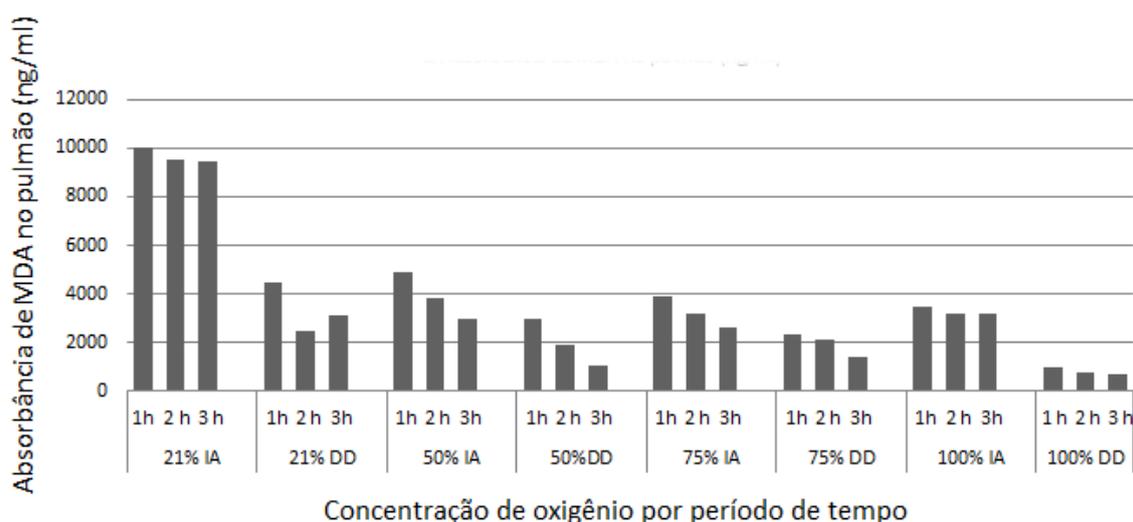


FIGURA 2. Distribuição do escore médio de absorvância de Malondialdeído (MDA) encontrados nos pulmões de ratos submetidos a diferentes concentrações de oxigênio comparação do efeito ao longo do tempo dentro de cada concentração. IA - Grupo de animais que sofreram eutanásia imediatamente após a exposição de O₂, DD - Grupo de animais que sofreram eutanásia 10 dias após a exposição de O₂.

Lima e colaboradores (2012) estudaram os efeitos do exercício físico aeróbico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo através da peroxidação lipídica em camundongos de dois grupos: controle-sedentário e exercício, observaram, que não houve alteração nas análises de malondialdeído tecidual entre os grupos avaliados.

Na avaliação dos níveis de MDA no plasma sanguíneo realizada logo após a exposição dos animais ao oxigênio, não foram observadas diferenças

significativas quanto aos tempos de exposição (1h, 2h e 3h). No entanto, entre as concentrações de oxigênio foram observadas diferenças significativas. O grupo tratado com 50% de oxigênio apresentou níveis de MDA no plasma significativamente superiores ($p < 0,05$) ao grupo 21% e aos tratamentos 75 e 100%. Já na avaliação 10 dias após exposição, os tratamentos com 50% e 100% de oxigênio apresentaram níveis de MDA inferiores ($p < 0,05$) aos observados no grupo 21% e 75% (Figura 3).

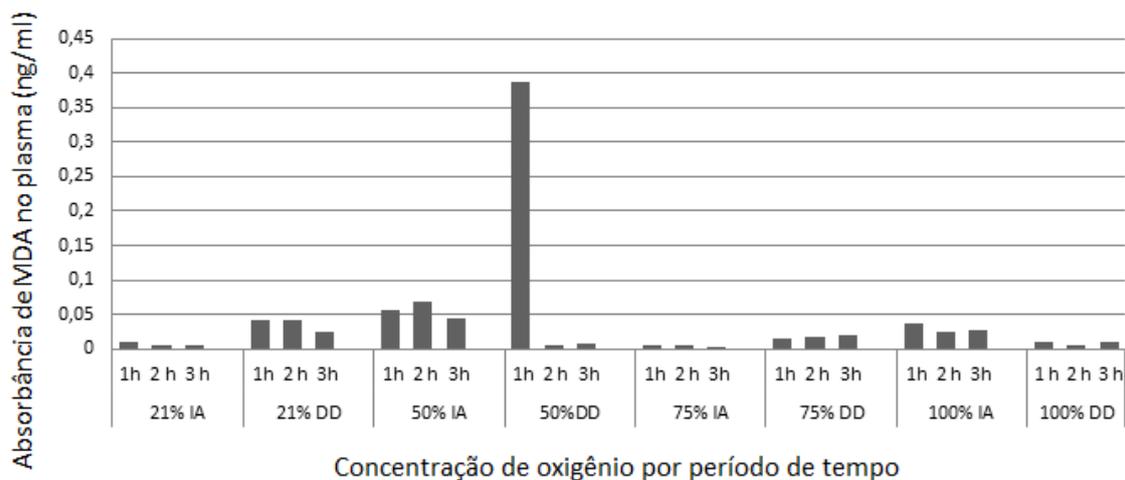


FIGURA 3. Distribuição do escore médio de absorbância de Malondialdeído (MDA) encontrados no plasma de ratos submetidos a diferentes concentrações de oxigênio comparação do efeito ao longo do tempo dentro de cada concentração. IA - Grupo de animais que sofreram eutanásia imediatamente após a exposição de O₂, DD - Grupo de animais que sofreram eutanásia 10 dias após a exposição de O₂.

Com o objetivo de avaliar dano oxidativo induzido através da suplementação de elevada concentração de oxigênio, em diferentes tempos (10', 30', 90') de forma aguda, em pulmão de ratos Wistar. Pesquisadores submeteram animais a hiperóxia, onde o grupo controle foi considerado como 100% e os outros grupos como variação do grupo controle, houve um aumento progressivo da detecção de TBARS no grupo exposto ao O₂ O10', O30' e O90' em comparação ao grupo controle. O dano oxidativo foi avaliado pelo TBARS mensurado no lavado broncoalveolar (VALENÇA, et al., 2007).

Comparando o TBARS inicial e ao final da ventilação mecânica, foi possível observar que pacientes submetidos à ventilação mecânica invasiva podem apresentar alteração do estado redox, marcado pelo aumento no TBARS e redução das enzimas antioxidantes (MAZULLO-FILHO et al., 2012).

Em estudo realizado por da Cunha e seus colaboradores (2013), submeteram 28 ratos da linhagem Wistar a dois meses de exercício físico e, após este período, induziram lesão pulmonar por instilação de lipopolissacárido intratraqueal, com o objetivo de avaliar se um programa de exercício físico moderado seria capaz de prevenir a indução de estresse oxidativo nos pulmões de ratos submetidos a lesão pulmonar experimental. Os resultados revelaram que a lesão pulmonar aumentou a produção de espécies reativas e peroxidação lipídica induzida (tal como observado por TBARS) nos pulmões de ratos, sugerindo que o estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento de lesão pulmonar por ruptura de proteínas e lipídios. O exercício físico foi capaz de impedir totalmente a produção de espécies reativas e de forma parcial o dano de proteína, mas não impede a peroxidação lipídica induzida por lesão pulmonar.

Camundongos neonatos da linhagem Balb/c foram expostos à hiperóxia por 24 h, com fluxo de 2 L/ min. Após a exposição, observou-se uma redução de macrófagos alveolares na luz alveolar, além desses achados, apresentou alterações parenquimatosas de forma difusa com grau de intensidade variando de leve a intenso. A presença de áreas com atelectasias e a presença de hemácias na luz alveolar, foram as alterações mais encontradas e significativamente aumentadas no pulmão desses animais (REIS, et al.,2013).

Esses resultados corroboram como nossos achados, pois indicam que a hiperóxia promoveu alterações na histoarquitetura pulmonar, aumentando áreas de atelectasia e hemorragia alveolar difusa (Figura 4). A arquitetura pulmonar foi observada em visão panorâmica dos dois cortes fixados na lâmina e considerada alterada quanto mais de 50% dos cortes pulmonares perdesse o padrão alveolar, ou seja, mais da metade do lóbulo pulmonar analisado já evidenciava alterações morfológicas relacionadas com atelectasia, infiltração inflamatória e hemorragia, essas alterações forma evidenciadas de forma significativa ($p < 0,05$), apenas no grupo I.A nos animais submetidos à 75% e 100% por 1 hora e 50%, 75% e 100% por 2 horas.

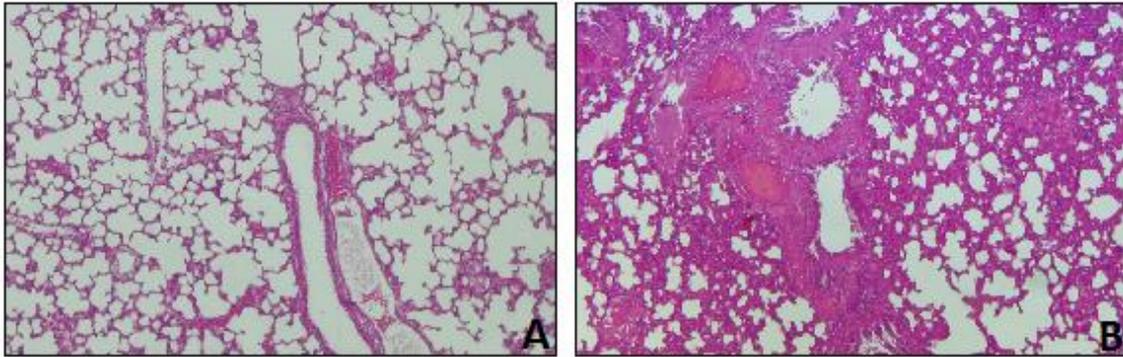


FIGURA 4. **A** Fotomicrografia de pulmão de rato submetido a normóxia (21% O₂), apresentando a visão panorâmica da arquitetura pulmonar normal (presença de vaso sanguíneo, alvéolos e bronquíolos terminais com tamanho dentro da normalidade) e **B** visão panorâmica da arquitetura pulmonar alterada (presença de vasos sanguíneos congestionados, alvéolos atelectasiados e espessamento de septos) pulmão de rato submetido a hiperóxia (100% O₂) por 2 horas dez dias após a exposição. Coloração HE. Objetiva 10x.

A perda do recolhimento elástico e a evidência histológica de dano das fibras elásticas implicam necessariamente em degradação de elastina como um fator chave na patogênese do enfisema. Alguns pesquisadores consideram os neutrófilos como as principais células envolvidas na injúria elastolítica. Entretanto, existem evidências que apontam os macrófagos alveolares como sendo as principais células responsáveis pela perda da histoarquitetura pulmonar (VALENÇA, PORTO; 2008).

Valença e seus colaboradores (2007) perceberam que ao expor os animais a 100% (5l/min) durante 90 minutos foi evidente o extravasamento de hemácias dos capilares, septos túrgidos e grande quantidade de células inflamatórias nos alvéolos a análise histológica sugere congestão e hemorragia sem comprometimento da histoarquitetura pulmonar. Esses resultados se assemelham em partes, ao do presente estudo quando observamos que os animais expostos por 1 hora a 75% e 100% de oxigênio e sofreram eutanásia logo após a exposição também apresentaram hemorragia, congestão e espessamento de septo, no entanto a arquitetura pulmonar já apresentava alterações (Figura 5).

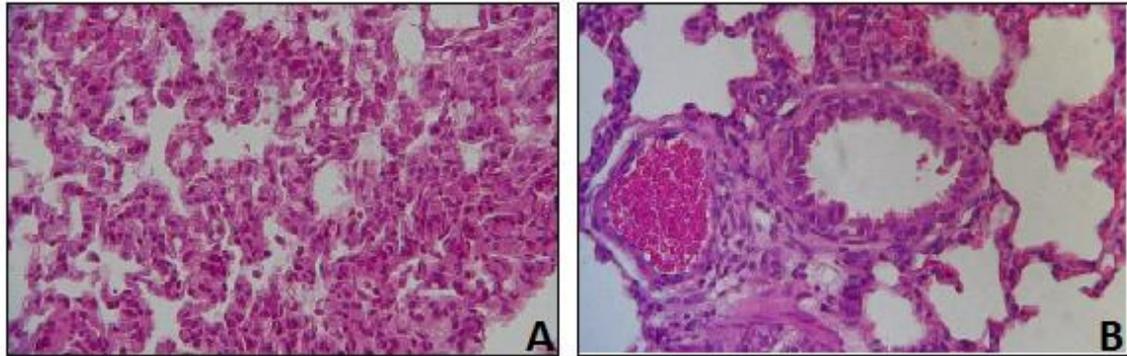


FIGURA 5. A Fotomicrografia de pulmão de rato submetido a hiperóxia (75% O₂) durante 1 hora imediatamente após a exposição. Presença de processo inflamatório com células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), edema, exsudação e pigmentos de hemossiderina. **B** Bronquíolo com hemorragia, vasos sanguíneos congestionados, células inflamatórias e exsudação hemorrágica na região de atelectasia, pulmão de rato submetido a hiperóxia (50% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição. Coloração HE. Objetiva 40x.

O espessamento do septo alveolar foi evidenciado de forma significativa nos grupos 50%,75% e 100% por 1 e 2 horas imediatamente após serem submetidos ao oxigênio, e permaneceram em evidência nos animais submetidos a essas mesmas concentrações de O₂ durante 2 horas, dez dias após a exposição (Figura 6) , culminando com o estudo de Pereira, et al., (2009), que submeteu ratos da linhagem Wistar durante 72 horas a hiperóxia (12l /min), seu achado mais expressivo na análise histológica foi o aumento da espessura dos septos alveolares, sugerindo a ocorrência de agressões provocadas por espécies reativas de oxigênio, causando efeitos deletérios no tecido pulmonar.

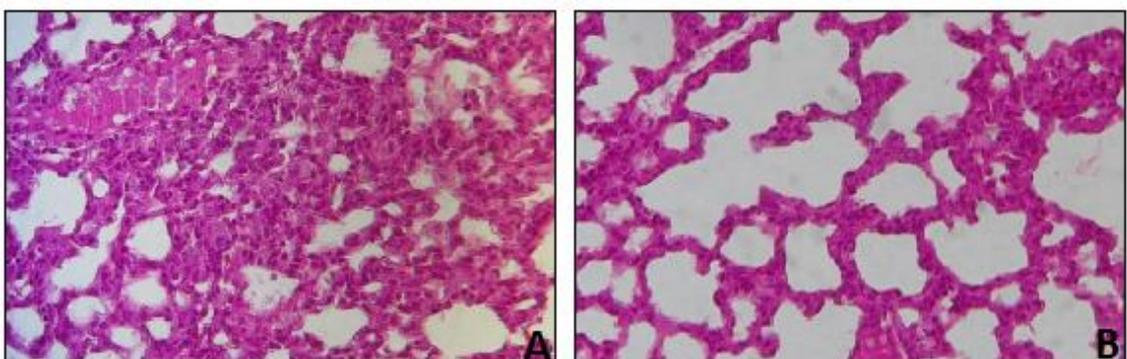


FIGURA 6. A. Fotomicrografia de pulmão de rato submetido a hiperóxia (75% O₂) durante 2 horas dez dias após a exposição. Perda da luz do alvéolo pulmonar (atelectasia), **B** Presença de vasos sanguíneos congestionados e espessamento dos septos devido resposta inflamatória pulmão de rato submetido a hiperóxia (75% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição. Coloração HE. Objetiva 40x.

A prática de usar altas concentrações de oxigênio para promover a "lavagem de nitrogênio" ainda existe em muitos centros. No estudo de Shaireen

e colaboradores (2014) o uso de oxigênio suplementar ($\geq 60\%$ FiO_2) não fez diferença no tempo de resolução clínica de pneumotórax espontâneo entre crianças tratadas com ar ambiente ou diferentes concentrações de oxigênio. Lactentes tratados com ar ambiente mantiveram-se estáveis e não necessitam de oxigênio suplementar em qualquer ponto da sua admissão.

Após estudo Dundaroz et al., (2013), investigaram se o estresse oxidativo poderia desempenhar um papel na gravidade da bronquiolite e perceberam que o Estado Oxidante Total (EOT) foi aumentado na bronquiolite moderada em comparação a casos leves. O aumento no Índice do Estado Oxidante (IEO) também foi significativo na bronquiolite moderada. Os níveis de saturação de oxigênio dos pacientes foram inversamente correlacionados com o EOT.

Camundongos recém-nascidos foram expostos a 65% de O_2 durante 7 dias no estágio sacular, que representa o início do desenvolvimento alveolar pulmonar, apresentando um estágio de desenvolvimento semelhante ao de pulmões de prematuros ao nascimento. A função pulmonar foi avaliada aos 11 meses de idade, o que equivale a idade adulta em camundongos, determinando que a hiperóxia neonatal altera a função pulmonar em meados de vida adulta principalmente em camundongos no sexo masculino. Sugerindo que a função pulmonar e saúde respiratória dos homens nascidos muito prematuros e que foram expostos a hiperóxia precisam ser cuidadosamente monitorizados à medida que envelhecem (SOZO, et al., 2015).

A presença de edema, congestão e atelectasia foi significativa a partir de 1 hora nos animais expostos a 75 e 100% de O_2 , sugerindo ser um evento agudo, por ser evidenciado imediatamente após a exposição ao O_2 , no entanto, o edema permaneceu nos animais expostos a 21%, 50% e 100% por 1 hora, a congestão e atelectasia também persistiram dez dias após a exposição nos animais submetidos por 2 horas a partir de 50% de O_2 .

Para as células macrofágicas considerou-se alterada a presença de mais de quatro células em um único alvéolo ou mais de oito macrófagos nas áreas de atelectasia e inflamação, dessa forma, foi significativa ($p < 0,05$), nos animais expostos à 50%, 75% e 100% de O_2 por 1 hora no grupo IA e 50% e 100% por 2 horas no grupo DD (tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição do escore médio± desvio padrão da presença de alterações histopatológicas no parênquima pulmonar de ratos ao longo do tempo dentro de cada concentração de O₂.

Alterações histopatológicas	21%						50%					
	1h		2h		3h		1h		2h		3h	
	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD
Hemorragia	1,33±0,82	1,83±0,41	0,83±0,75	0,50±0,55	0,83±0,75	0,50±0,55	0,66±0,82	1,66±0,82	0,16±0,41	1,50±0,848*	1,16±0,98	1,50±1,22
Espessamento de septo	0,66±0,52	2,83±0,41	0,66±0,52	2,00±0	2,16±0,75	2,83±0,41	1,33±0,52*	2,66±0,52	2,16±0,75*	2,83±0,41*	2,50±0,55	2,50±0,55
Processo Inflamatório	1,33±0,84	2,50±0,55	1,66±0,84	1,83±0,75	1,83±0,75	2,16±0,41	1,33±0,52	2,00±0,63	1,66±0,52	2,66±0,52	1,83±0,41	2,66±0,52
Edema	1,50±0,55	1,83±0,75*	1,00±0,63	1,00±0,63	1,33±0,52	1,16±0,41	1,16±0,41	2,33±0,52*	1,50±0,55*	1,66±0,52	1,83±0,41	1,83±0,41
Congestão	1,16±0,41	2,00±0,63	1,83±0,41	0,33±0,52	2,16±0,41	2,16±1,16	1,16±0,41	2,50±0,55	1,83±0,41	2,3b±0,52*	2,5±0,84	2,33±0,52
Atelectasia	1,83±0,75	2,83±0,41	1,83±0,41	2,00±0	2,16±0,75	2,66±0,52	1,83±0,41	2,66±0,52	2,33±0,52	2,83±0,41*	2,50±0,55	2,16±0,75
Macrófagos	1,00±0	1,83±0,41	1,16±0,41	1,16±0,41	1,33±0,52*	1,16±0,41	1,33±0,52*	1,50±0,55	1,16±0,41	1,83±0,41*	1,33±0,52*	1,33±0,52*
Arquitetura pulmonar	1,33±0,52	1,83±0,41	1,33±0,52	1,66±0,52	1,66±0,52	2,00±0	1,16±0,41	2,00±0	1,83±0,41*	2,00±0	2,00±0	1,66±0,52
Alterações histopatológicas	75%						100%					
	1h		2h		3h		1h		2h		3h	
	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD	IA	DD
Hemorragia	2,16±0,41	1,00a±0,63	1,16±1,17*	1,33±1,03*	0,83±1,17	1,66±1,03	1,33±1,37	0,66±0,82*	2,33±1,03*	2,00±0,89*	1,66±0,82	2,00±0,63
Espessamento de septo	2,66±0,52*	2,66±0,52	2,83±0,41*	2,83±0,41*	2,83±0,41	2,66±0,52	3,00±0*	3,00±0	3,00±0*	2,50±0,55*	2,66±0,52	3,00±0
Processo Inflamatório	2,66±0,52*	2,16±0,41	2,66±0,52*	2,16±0,75	2,00±0	2,16±0,75	2,50±0,55*	2,00±0	2,33a,	2,33±0,52	2,33±0,52	2,00±0
Edema	2,16b±0,75*	1,00±0	1,00±0	1,33±0,52	1,16±0,41	1,50±0,55	2,33±0,52*	1,50±0,55*	2,00±0*	1,83±0,75*	1,50±0,55	1,83±0,41
Congestão	2,83±0,41*	2,33±0,82	2,00±0,63*	1,6±0,52*	2,00±0	2,16±0,75	2,83±0,41*	1,66±0,52	3,00±0*	1,83±0,41*	2,66±0,52	2,66±0,52
Atelectasia	2,66±0,52*	2,66±0,52	2,50±0,55	2,66±0,52*	2,83±0,41	2,66±0,52	2,83±0,41*	3,00±0	2,66±0,52	2,83±0,41*	2,66±0,52	3,00±0
Macrófagos	1,16±0,41*	1,33±0,52	1,16±0,41	1,16±0,41	1,00±0*	1,33±0,52*	2,00±0*	1,83±0,41	2,00±0*	2,00±0*	1,83±0,41*	2,00±0*
Arquitetura pulmonar	2,00±0*	2,00±0	2,00±0*	1,83±0,41	2,00±0	1,5a±0,55	2,00±0*	2,00±0	2,00±0*	1,83±0,41	1,83±0,41	2,00±0

* nas colunas indicam diferença significativa (p<0,05). IA - Grupo de animais que sofreram eutanásia imediatamente após a exposição ao O₂, DD - Grupo de animais que sofreram eutanásia 10 dias após a exposição ao O₂.

Macrófagos são células derivadas da medula óssea e do monócito sanguíneo. É o tipo celular mais frequente dentre os que residem no pulmão. Possuem várias funções: fagocitam partículas ou antígenos; participam da apresentação de antígenos aos linfócitos T; e são capazes de liberar várias citocinas e metabólitos ativos do ácido araquidônico. Apresentam importante pleomorfismo no pulmão, com tamanhos diferentes, o menor com intensa capacidade de fagocitose e os maiores com grande atividade bioquímica (RUFINO, SILVA; 2006).

A morfologia de cada célula é um reflexo da composição da MEC, já que uma série de “informações” pode ser transmitida para o citoesqueleto, através de interações específicas com receptores de superfície da membrana celular. Em muitas doenças intersticiais agudas e crônicas, observam-se alterações irreversíveis da histoarquitetura pulmonar, que vêm recebendo grande atenção na literatura. Os efeitos destrutivos das células inflamatórias sobre a MEC parecem ser os principais responsáveis por tais agressões, através da liberação não somente de enzimas proteolíticas, como também de agentes oxidantes no espaço intersticial (TASAKA; HASEGAWA; ISHIZAKA, 2002).

O processo inflamatório foi observado de maneira significativa ($p < 0,05$), no grupo IA, expostos ao O_2 por 1h e 2h nas concentrações de 75% e 100%. Quando avaliado o edema pulmonar, evidenciamos diferença significativa ($p < 0,05$), no grupo IA exposto por 1 hora a 75% e 100% de O_2 e por 2 horas quando expostos por 50% e 100%, enquanto o grupo DD, apresentou diferença estatisticamente significativa nos animais expostos por 1h a 21%, 50% e 100% (tabela 2).

Em relação aos resultados relacionados à congestão pulmonar que foi relevante no grupo IA, nos animais expostos a 75% e 100% por 1h e 2h, e no grupo DD nos animais expostos a 50%, 75% e 100% por 2 horas (Figura 7).

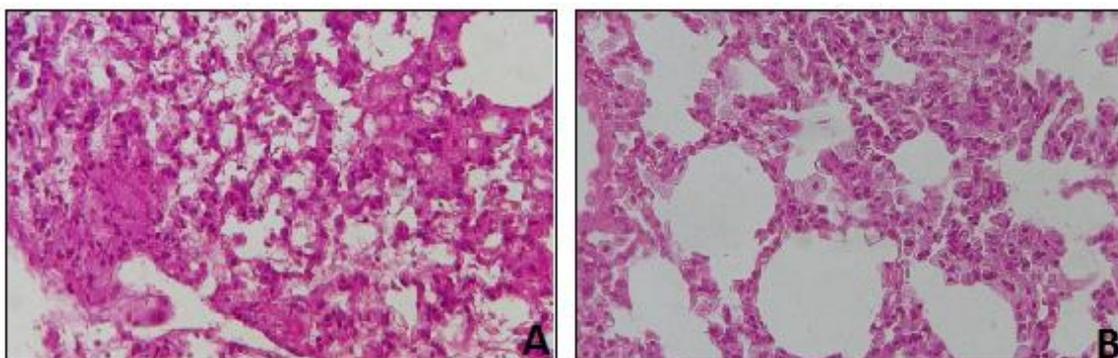


FIGURA 7. A Fotomicrografia de pulmão de rato submetido a hiperóxia (100% O₂) durante 2 horas imediatamente após a exposição . Presença de inflamação acentuada com exsudação edema e grande quantidade de macrófagos. **B** Presença de macrófago xantomatoso inflamatória pulmão de rato submetido a hiperóxia (50% O₂) durante 2 horas, dez dias após a exposição. Coloração HE. Objetiva 40x. Lâminas fotografadas em caixa da exacta.

Objetivando comparar os efeitos imediatos e persistentes de níveis de hiperóxia leve (40% O₂) e moderada (65% O₂) sobre os marcadores de estresse oxidativo pulmonar, inflamação e arquitetura pulmonar, camundongos foram expostos à hiperóxia desde o nascimento até o sétimo dia pós-natal 7 (P7d). Os animais foram mortos após 7 dias para avaliar efeitos imediatos e o outro grupo viveu no ar ambiente até (56 dias) para avaliar os efeitos persistentes . A exposição a 40% de O₂ levou a uma diminuição transitória na percentagem de macrófagos no parênquima pulmonar em P7d. Tanto a exposição neonatal a 40% e 65% de O₂ nas fases iniciais do desenvolvimento alveolar pulmonar levou há um aumento imediato e persistente do estresse oxidativo e persistente no número de células do sistema imunológico pulmonares. Em contraste, apenas a exposição a 65% de O₂ afeta arquitetura pulmonar (BOUCH, et al., 2015).

O stress oxidativo é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de displasia broncopulmonar no recém-nascido de pré-termo. Por outro lado, o stress oxidativo também tem papel no crescimento e desenvolvimento celular. E também necessário um melhor entendimento da relação entre *stress* oxidativo e crescimento e desenvolvimento celular, antes do uso de terapêuticas antioxidantes. Deste modo, o *stress* oxidativo excessivo no recém-nascido pré-termo pode ser minorado prevenindo a prematuridade, a inflamação, usando modalidades de ventilação com volumes correntes otimizados e evitando a hiperóxia desnecessária (ROCHA, 2008).

A presença de hemorragia foi significativa no grupo que sofreu eutanásia imediatamente após tratado por 2 horas quando exposto a 75% e 100% de O₂ . E 10 dias após a exposição os animais expostos a 100% de O₂ por 1 hora, e por 2 horas quando expostos a 50%, 75% e 100% de O₂, também apresentaram moderada presença de hemorragia (p<0,05), (tabela 1).

A administração de O₂ na incubadora é indicada em formas leves de desconforto, que requerem baixas Frações Inspiradas de Oxigênio (FiO₂) e nas

fases finais do processo de retirada gradual do O₂. Entretanto, representa uma prática limitada por ocasionar flutuações na FiO₂ devido à realização de cuidados de rotina com o RN. A concentração de O₂ pode ser verificada por meio de analisadores de O₂ ambiente (TAMEZ, 2013).

Assim, recomenda-se a oxigenoterapia após avaliação rigorosa quanto à real necessidade de sua utilização e, durante seu uso, monitoração contínua de todos os parâmetros do paciente.

É importante destacar que não há possibilidade de se fazer a comparação direta entre os métodos, usando amostras idênticas, daí, a extrema dificuldade de obtenção de valores de referência absolutos para marcadores específicos em sistemas vivos. É de extrema importância notar que o balanço redox de uma dada população “normal” sofre influências genéticas, ambientais, nutricionais e culturais, o que é um complicador adicional. Enquanto os trabalhos de sistematização prosseguem, é útil conhecer os principais marcadores e os métodos mais utilizados para sua quantificação (VASCONCELOS et al., 2007).

O que gostaríamos de salientar no presente estudo é a necessidade do uso racional de oxigênio quando realmente houver indicação, pois como ressalta Saugstad (2012) o oxigênio é mais tóxico do que o compreendido até agora. Ainda há uma série de perguntas sem respostas sobre o uso de oxigênio no período neonatal.

O tema se faz importante devido à falta de conhecimento sobre este gás como medicamento, devendo ser utilizado com alguns critérios. Através de capacitação de toda equipe multidisciplinar para o uso racional de oxigênio prioriza-se a formação de uma consciência coletiva na utilização correta dos insumos disponíveis. Entretanto, a visão que deve prevalecer é que os resultados não devem ser medidos simplesmente por ganhos econômicos, mas, pela melhor qualidade no cuidado ao paciente (CASTANHEIRA; VALÉRIO; WEIGERT, 2014).

Dessa forma, o estudo estimula a realização de novas pesquisas experimentais e clínicas com a finalidade de alcançar alternativas terapêuticas para o tratamento da exposição ao oxigênio medicinal em concentrações seguras no uso pediátrico, com o intuito de minimizar efeitos deletérios ao pulmão de recém-nascidos.

6 CONCLUSÃO

Concentrações elevadas de MDA no plasma de ratos que sofreram eutanásia imediatamente após a exposição ao oxigênio na fração 50% sugere estresse oxidativo independente do tempo. No entanto, não foi observada no presente estudo a relação entre elevação dos níveis de MDA e aumento das concentrações de oxigênio.

No pulmão os níveis de MDA não apresentaram diferença significativa em relação aos animais submetidos à hiperóxia. Contudo, foram significativamente inferiores aos animais que se mantiveram em ar ambiente (21%).

Concentrações de oxigênio maiores que 75% por uma hora, manifestam efeitos deletérios no parênquima pulmonar capazes de alterar a arquitetura pulmonar imediatamente após essa exposição.

As alterações pulmonares mais frequentes e significativas presentes nos animais expostos à hiperóxia foram: hemorragia, espessamento de septo e congestão, presentes em todos os grupos dez dias após a exposição ao O₂.

No grupo em que foram expostos por 2 horas ao oxigênio com concentrações a partir de 50% revelam que a arquitetura pulmonar permanece alterada mesmo após dez dias da exposição, no entanto o processo inflamatório e edema não estão mais presentes.

Mediante a não observação de fibrose progressiva ou restauração da arquitetura alveolar normal, pode-se considerar que não houve remodelamento pulmonar nos animais avaliados.

Referências Bibliográficas

- Adde FV, Alvarez AE, Barbisan BN, Guimarães BR. Recommendations for long-term home oxygen therapy in children and adolescents. *Jornal de pediatria*. 2013; 89(1): 06-17.
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*. 2010; 33(10): 2202-2210.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Mamirauá, 2007. Belém, PA. 364 p.
- Barbosa AL, Cardoso MVLML. Alterações nos parâmetros fisiológicos dos recém-nascidos sob oxigenoterapia na coleta de gasometria. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2014; 27(4): 367-372.
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 2010; 23(4): 629-643.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*. 2006; 29(1): 113-123.
- Barros A, Souza FB, Santos E, Negri M, Zin WA, Rocco PRM. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. *Jornal de Pneumologia*. 2003; 29(4), 235-245.
- Berté, BR. Avaliação de níveis de MDA em tecido pulmonar e plasma de ratos submetidos a hiperóxia induzida em diferentes níveis de oxigênio. Campo Grande; 2014. [Dissertação - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste].
- Bitterman H. Therapeutic effects of hyperoxic ventilation during shock. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*. 2009; 11(4): 156-163.
- Bouch S, O'Reilly M, Harding R, Sozo F. Neonatal exposure to mild hyperoxia causes persistent increases in oxidative stress and immune cells in the lungs of mice without altering lung structure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015; 311: 488-496.
- Castanheira NP, Valério MC, Weigert FCDS. Gerenciamento do consumo do oxigênio durante a inaloterapia: oportunidade para redução de custos através da capacitação dos profissionais. *Revista Saúde e Desenvolvimento*. 2014; 5(3): 8-30.
- Cervaens M, Sepodes B, Camacho O, Marques F, Barata, P. Farmacoterapia do Oxigênio normobárico e hiperbárico. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 2014;

3(2), 135-148.

Gulina NA. Guía rápida y póster de dispositivos de oxigenoterapia para enfermería. Universidad Pública de Navarra 2015; 1(1): 1-49.

Cristóvão C, Cristóvão L, Nogueira F, Bicho, M. Avaliação do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na patogênese da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2013; 19(2): 70-75.

da Cunha MJ, da Cunha AA, Ferreira GK, Baladão ME, Savio LE, Reichel CL, Wyse AT. The effect of exercise on the oxidative stress induced by experimental lung injury. *Life sciences*. 2013; 92(3): 218-227.

de Vasconcelos TB, Cardoso ARNR, Josino JB, Macena RHM, Bastos VPD. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014;16(3):213-220.

Dundaroz R, Erenberk U, Turel O, Demir AD, Ozkaya E, Erel O. Oxidative and antioxidative status of children with acute bronchiolitis. *Jornal de Pediatria*. 2013; 89(4): 407-411.

Ferreira AL, Matsubara LS. Freeradicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2014; 43(1): 61-68.

França BK, Alves MRM, Souto FMS, Tiziane L, Boaventura RF, Guimarães A, Alves A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE jornal português de gastroenterologia*. 2013; 20(5): 199-206.

Junior DRA, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2005; 31(Suppl1): 60-68.

Lafuente EP, Navarret RR., Rahal IM, Cócera, VCL. Protocolo del manejo del oxígeno y control de saturación en recién nacido prematuro. *Enfermería integral: Revista científica del Colegio Oficial de ATS de Valencia*. 2011; (94), 37-40.

Lima MC, Marks G, Silva IS, Silva BAK, Cônsolo LZZ, Nogueira GB. Evaluation of oxidative stress in mice subjected to aerobic exercise. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2012; 27(8):544-551.

Maside LL. Oxigenoterapia en el recién nacido prematuro y retinopatía proliferativa. ¿ Se puede optimizar el control de la administración de oxígeno?. *Universidad de A Coruña*. 2013. 59p.

Masclans JR, Pérez-Terán P, Roca O. Papel de la oxigenoterapia de alto flujo en la insuficiencia respiratoria aguda. *Medicina Intensiva*. 2015; 39(8): 505-515.

Mazullo Filho JBR, Bona S, Rosa DP da Silva FG, Forgiarini Junior LA, Dias AS, Marroni NP. Os efeitos da ventilação mecânica no estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2012; 24(1):23-29.

Munhoz AS, Adde FV, Nakaie C, Doria Filho U, Silva Filho LVRF, Rodrigues JC. Oxigenoterapia domiciliar prolongada em crianças e adolescentes: uma análise do uso clínico e de custos de um programa assistencial. *Jornal de Pediatria*. 2011; 87(1):13-18.

Paredes MCL, de la Cruz OA, Aznar IC, Carrasco MM, de Agüero MBG, Ruiz EP, Frías JP. Fundamentos de la oxigenoterapia em situaciones agudas y crónicas: indicaciones, métodos, controles y seguimiento. In *Anales de Pediatría*. ElsevierDoyma. 2009; 71(2): 161-174.

Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology* .2009; 14(1): 27-38.

Pereira DM, Silva IS, da Silva BAK, Aydos RD, de Carvalho PDTC, Odashiro AN, de Oliveira LVF. Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia) por Tempo. *Revista Biociências*. 2009; 14(2):110-116.

Pereira BC, Pereira AKDT. Radicais Livres: Uma nova abordagem. *Revista Saúde Quântica*. 2012;1(1):35-42.

Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB journal*. 1994; 8(11): 823-831.

Reis RB, Nagato AC, Nardeli CR, Matias IC, Lima WG, Bezerra FS. Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia. *Jornal de pediatria*. 2013; 89(3): 300-306.

Rizzo MCF, Fomin AB. Remodelamento das vias aéreas. *Revista Brasileira de alergia e imunopatologia*. 2005; 28(5):230-234.

Rocha G. Stress oxidativo na lesão pulmonar neonatal. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*. 2008; 14(1):113-126.

Rodrigues FPM. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. *Jornal de Pediatria*. 1998; 74(2):91-98.

Rufino R, Silva JRL. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006; 32(3): 241-248.

Saugstad OD. Hyperoxia in the term newborn: more evidence is still needed for optimal oxygen therapy. *Acta Paediatrica*. 2012; 101(s464): 34-38.

Shaireen H, Rabi Y, Metcalfe A, Kamaluddeen M, Amin H, Akierman A, Lodha, A. Impact of oxygen concentration on time to resolution of spontaneous pneumothorax in term infants: a population based cohort study. *BMC pediatrics*. 2014; 14(1): 208-215.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de medicina do esporte*. 2004;10(10):308-313.

Sozo F, Horvat JC, Essilfie AT, O'Reilly M, Hansbro PM, Harding R. Altered lung function at mid-adulthood in mice following neonatal exposure to hyperoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015; 218:21-27.

Tamez RN. Enfermagem na UTI Neonatal: assistência ao recém-nascido de alto risco. *Oxigenoterapia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p.157-165.

Tasaka S, Hasegawa N, Ishizaka A. Pharmacology of acute lung injury. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2002; 15(2): 83-95.

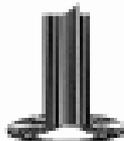
Teixeira AB, Xavier CC, Lamounier JA, Tavares EC. Hiperóxia e risco aumentado de displasia broncopulmonar em prematuros. *Revista Paulista de Pediatria*. 2007; 25(1):47-52.

Valença SDS, Kloss ML, Bezerra FS, Lanzetti M, Silva FL, Porto LC. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33(6):655-662.

Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2008; 34(10), 787-795.

Vasconcelos S ML, Goulart MOF, Moura JDF, Manfredini V, Benfato MDS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 2007; 30(5):1323-1338.

Apêndice 1



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 524/2013 da Pesquisadora Iandara Schettert Silva, referente ao projeto de pesquisa "Efeitos da exposição a diversas concentrações de O₂ em pulmão de ratos recém-nascidos", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), 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 ordinária do dia 10 de dezembro de 2013.

Joice Stein

Vice-coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 11 de dezembro - 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184