

Artigo Original

Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar*

Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs

Samuel dos Santos Valença¹, Milena Leonarde Kloss², Frank Silva Bezerra³,
Manuella Lanzetti⁴, Fabiano Leichsenring Silva⁵, Luís Cristóvão Porto⁶

Resumo

Objetivo: Avaliar a repercussão da elevada concentração de oxigênio (hiperóxia) em um curto período de tempo no pulmão de ratos Wistar. **Métodos:** Os animais foram divididos em grupos O10', O30', O90', ou seja, ratos expostos à hiperóxia por 10', 30' e 90', respectivamente, e no grupo controle (GC), exposto ao ar ambiente. Os animais foram sacrificados 24 h após a exposição. O lavado broncoalveolar foi realizado e os pulmões foram retirados para análise histológica e estereológica. **Resultados:** Observamos um aumento do número de macrófagos ($2169,9 \pm 118,0$, $1560,5 \pm 107,0$ e $1467,6 \pm 39,0$) e neutrófilos ($396,3 \pm 35,4$, $338,4 \pm 17,3$ e $388,7 \pm 11,7$), concomitante a um aumento do dano oxidativo ($143,0 \pm 7,8\%$, $180,4 \pm 5,6\%$ e $235,0 \pm 13,7\%$) nos grupos O10', O30' e O90', respectivamente, quando comparados ao GC ($781,3 \pm 78,3\%$, $61,6 \pm 4,2\%$ e $100,6 \pm 1,7\%$). Na análise histológica e estereológica foram observados alvéolos e septos normais no GC ($83,51 \pm 1,20\%$ e $15 \pm 1,21\%$), no grupo O10' ($81,32 \pm 0,51\%$ e $16,64 \pm 0,70\%$) e no grupo O30' ($78,75 \pm 0,54\%$ e $17,73 \pm 0,26\%$). Entretanto, no grupo O90' foi notado um influxo de células inflamatórias nos alvéolos e nos septos alveolares. Hemácias extravasaram do capilar para o alvéolo ($59,06 \pm 1,22\%$), com evidências de congestão, hemorragia e edema de septo ($35,15 \pm 0,69\%$). **Conclusão:** Os resultados indicam que a hiperóxia induziu uma ação lesiva no grupo O90' sobre o parênquima pulmonar, com repercussões de dano oxidativo e infiltrado inflamatório.

Descritores: Hiperóxia; Pulmão/lesões; Estresse oxidativo.

Abstract

Objective: To study the effects of short-term exposure to high oxygen concentrations (hyperoxia) on Wistar rat lungs. **Methods:** Animals were divided into three groups exposed to hyperoxia for 10', 30' and 90' (O10', O30', O90', respectively), together with a control group (exposed to room air). The animals were sacrificed 24 h after exposure. Bronchoalveolar lavage was performed, and the lungs were removed for histological and stereological analysis. **Results:** In the O10', O30', and O90' groups, respectively and in comparison with the controls, we observed an increase in the numbers of macrophages (2169.9 ± 118.0 , 1560.5 ± 107.0 , and 1467.6 ± 39.0 vs. 781.3 ± 78.3) and neutrophils (396.3 ± 35.4 , 338.4 ± 17.3 , and 388.7 ± 11.7 vs. 61.6 ± 4.2), concomitant with an increase in oxidative damage ($143.0 \pm 7.8\%$, $180.4 \pm 5.6\%$, and $235.0 \pm 13.7\%$ vs. $100.6 \pm 1.7\%$). The histological and stereological analyses revealed normal alveoli and alveolar septa in the controls ($83.51 \pm 1.20\%$ and $15 \pm 1.21\%$), in the O10' group ($81.32 \pm 0.51\%$ and $16.64 \pm 0.70\%$), and in the O30' group ($78.75 \pm 0.54\%$ and $17.73 \pm 0.26\%$). However, in the O90' group, inflammatory cell infiltration was observed in the alveoli and alveolar septa. Red blood cells extravasated from capillaries to the alveoli ($59.06 \pm 1.22\%$), with evidence of congestion, hemorrhage, and septal edema ($35.15 \pm 0.69\%$). **Conclusion:** Hyperoxia for 90' caused injury of the lung parenchyma, resulting in oxidative damage and inflammatory cell infiltration.

Keywords: Hyperoxia; Lung/injuries; Oxidative stress.

* Trabalho realizado no Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil e no Núcleo de Pesquisa Experimental da Faculdade Adventista da Bahia, Cachoeira (BA) Brasil.

1. Professor Visitante do Departamento de Histologia e Embriologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

2. Graduanda em Fisioterapia pela Faculdade Adventista da Bahia – FAB – Cachoeira (BA) Brasil.

3. Doutorando do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

4. Graduanda em Nutrição pelo Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

5. Professor Assistente do Núcleo de Pesquisa Experimental. Faculdade Adventista da Bahia – FAB – Cachoeira (BA) Brasil.

6. Professor Titular do Departamento de Histologia e Embriologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Samuel dos Santos Valença. Departamento de Histologia e Embriologia, IBRAG-UERJ, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 3º andar, Maracanã, CEP 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel 55 21 2587 6509. Fax 55 21 2587 8164. E-mail: samuelv@hotmail.com

Recebido para publicação em 25/10/2006. Aprovado, após revisão, em 9/3/2007.

Introdução

O oxigênio suplementar é administrado geralmente em indivíduos com doença pulmonar ou cardíaca grave e que necessitam de aumento na oferta de oxigênio para tratamento da hipóxia tecidual.⁽¹⁾ Entretanto, a exposição a altas concentrações de oxigênio (>50%) por períodos prolongados causa lesão pulmonar hiperóxica aguda.⁽²⁾ Essa resposta é caracterizada por danos ao epitélio e endotélio com extravasamento de proteínas.⁽³⁾ Estudos têm mostrado que as espécies reativas do oxigênio são em parte responsáveis por esses efeitos, levando à morte celular por necrose.⁽⁴⁾

O oxigênio suplementar em altas concentrações causa edema pulmonar não cardiogênico,⁽⁵⁾ formação de membrana hialina,⁽⁶⁾ dano ao pneumócito tipo I,⁽⁷⁾ hiperplasia do pneumócito tipo II,⁽⁸⁾ infiltração neutrofílica,⁽⁹⁾ hemorragia alveolar e aumento da espessura do septo alveolar.⁽¹⁰⁾ Essas alterações nos pulmões são mediadas por estresse oxidativo com oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos da membrana e ruptura da fita de DNA.⁽¹¹⁾ Além disso, a hiperóxia causa a liberação de um grande número de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1-beta.⁽¹²⁾ Os mecanismos exatos da toxicidade do oxigênio no pulmão são complexos e as evidências sugerem que as espécies reativas do oxigênio, tais como o anion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio são mediadores importantes de lesão pulmonar.^(13,14)

Entretanto, estudos com variação de tempo mantendo-se uma elevada concentração de oxigênio são escassos e o foco principal tem sido a variação ou concentração do oxigênio suplementar. Neste estudo foram priorizados a cinética das células inflamatórias, o padrão histológico, a análise estereológica e o dano oxidativo induzido através da suplementação de elevada concentração de oxigênio, em diferentes tempos, de forma aguda, em pulmão de ratos Wistar.

Métodos

Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com oito semanas de vida (180-200 g), acondicionados em grupos de cinco animais por caixa, no biotério

do Núcleo de Pesquisa Experimental da Faculdade Adventista da Bahia, com temperatura e umidade controladas (21 ± 2 °C, $50 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19 - 7 h) e exaustão 15 min/h. Os animais foram divididos em:

- Grupo controle - ratos expostos às mesmas condições do grupo experimental ao ar ambiente;
- Grupo O10' - ratos expostos à hiperóxia por 10 min;
- Grupo O30' - ratos expostos à hiperóxia por 30 min; e
- Grupo O90' - ratos expostos à hiperóxia por 90 min.

Durante todo o período do experimento, os animais receberam ração padrão balanceada e água *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela comissão de ética para trabalhos com animais de laboratório do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Exposição ao oxigênio

Para a exposição dos animais à hiperóxia, foi utilizada uma câmara de inalação em acrílico (30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 15 cm de altura). O oxigênio 100% foi adquirido da empresa White Martins® (White Martins Praxair Inc., São Paulo, Brasil). A bala (torpedo) de oxigênio foi acoplada à câmara de inalação através de um conduto de silicone. O gás foi liberado na câmara com fluxo constante de 5 L/min, garantindo, dessa forma, uma oferta de oxigênio que suprisse e saturasse o ambiente. Após um período de preenchimento do espaço pelo oxigênio, todos os grupos (exceto o grupo controle, que inalou ar ambiente) foram colocados na câmara de inalação e retirados nos tempos de 10, 30 e 90 min.

Histologia

Os animais foram sacrificados um dia após o término do experimento através de uma injeção i.p. com 50 mg/kg de tiopental (Eron, C., Habana, Cuba). O pulmão esquerdo foi clampeado e o pulmão direito fixado através de uma cânula inserida no brônquio fonte direito por instilação de formalina (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Brasil) tamponada (10%) com pressão constante controlada por uma bomba (Sykam, Gewerbering,

Alemanha) de 25 cm H₂O. Após a instilação de formalina o brônquio fonte direito foi clampeado. O pulmão direito foi removido em bloco e imerso em solução fixadora por 48 h, processado segundo a rotina do laboratório em concentrações crescentes de álcool, diafinizado em xilol e incluído em parafina de modo a se obter fragmentos do ápice, terço médio e base. Cortes de 5 mm foram corados em hematoxilina e eosina e Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Estereologia

Para obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, 18 campos (seis campos não coincidentes em três lâminas diferentes) foram randomicamente analisados com o uso de um vídeo-microscópio Zeiss-Axioplan, lente objetiva de 20× (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e uma câmara de vídeo (Trinitron; Sony, San Diego, CA, EUA) ligada a um monitor colorido (Trinitron; Sony). Um sistema teste (16 arcos ciclóides e 16 pontos) foi sobreposto ao monitor e o volume de referência foi estimado por contagem de pontos. Os pontos coincidentes ao septo alveolar, alvéolos ou leucócitos (macrófagos, neutrófilos ou linfócitos) foram contados para estimar a densidade de volume dessas estruturas. Uma área total de 1.94 mm² foi analisada para determinar a densidade de volume do septo alveolar e alvéolos nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina e leucócitos nas lâminas coradas com Giemsa. Dois investigadores em tempos diferentes contaram lâminas não identificadas.⁽¹⁵⁾

Lavado broncoalveolar

O pulmão esquerdo foi lavado uma vez com 2 mL de solução salina através de uma cânula inserida no brônquio fonte esquerdo. Logo em seguida, as amostras foram rapidamente colocadas em gelo picado a fim de evitar lise celular. 100 µL do lavado broncoalveolar de cada animal foram adicionados a 10 mL de Isoton (Coulter Electronics, Fullerton, CA, EUA) e contados em citômetro (Coulter Electronics). 250 µL das amostras foram cito-centrifugadas (Shandon, Waltham, MA, EUA) a 800 rpm/min. Após obtenção das lâminas, um kit de coloração para leucócitos (Diff-Quik, Baxter Dade, Dudingen, Suíça) foi utilizado e um total de 200 células por lâmina foi analisado para contagem diferencial.⁽¹⁵⁾

Análise do dano oxidativo

O sobrenadante do lavado broncoalveolar foi utilizado para analisar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecidas como *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) em inglês. O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malondialdeído.⁽¹⁵⁾ Uma alíquota do lavado broncoalveolar (300 µL) foi centrifugada e o sobrenadante recolhido. O sobrenadante foi adicionado de 300 µL de duodecil sulfato de sódio 8,1% (Sigma), agitado e acondicionado em gelo picado durante 15 min. Após centrifugação de 2000 rpm/10 min, o sobrenadante foi então incubado com uma solução de 300 µL de ácido tiobarbitúrico (Sigma) 0,8% + 300 µL de ácido acético 20% pH 3,5 por 1 h a 90 °C. O conteúdo foi lido a 532 nm por espectrofotometria (Beckman Spectrophotometer, modelo DU 640; Coulter Electronics).

Análise estatística

Os dados foram expressos em média ± erro padrão. As diferenças das variáveis entre os grupos para o lavado broncoalveolar e TBARS foram testadas pela análise de variância *one-way*. As diferenças intergrupais foram testadas a partir do pós-teste de Student-Newman-Keuls. As diferenças das variáveis da estereologia foram testadas pelo Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Em ambos os casos, uma diferença significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

Resultados

Histologia

No grupo controle foi possível observar os septos alveolares preservados e capilares íntegros com alvéolos de tamanho normal sem presença de infiltrado inflamatório (Figura 1a). No grupo O10', observamos um padrão histológico muito semelhante ao grupo controle, sem anormalidades evidentes (Figura 1b). Entretanto, no grupo O30' foi possível observar algumas células inflamatórias nos alvéolos e septo alveolar ligeiramente espessado, com infiltrado inflamatório evidente (Figura 1c). Apesar dessas alterações, o padrão de histoarquitetura pulmonar não estava alterado. No grupo O90' foi evidente o extravasamento de hemácias dos capilares, septos túrgidos e grande quantidade de células inflamatórias.

rias nos alvéolos (Figura 1d). A imagem é sugestiva de congestão e hemorragia sem comprometimento da histoarquitetura pulmonar.

Estereologia

Os resultados da estereologia estão apresentados na Tabela 1. Não foram observadas alterações entre a densidade de volume dos alvéolos, septos alveolares e leucócitos entre o grupo controle ($83,51 \pm 1,20\%$, $15 \pm 1,21\%$ e $1,48 \pm 0,22\%$) e os grupos O10' ($81,32 \pm 0,51\%$, $16,64 \pm 0,70\%$ e $2,02 \pm 0,23\%$) e O30' ($78,75 \pm 0,54\%$, $17,73 \pm 0,26\%$ e $3,51 \pm 0,32\%$). Entretanto, no grupo O90' obser-

vamos uma diminuição ($p < 0,01$) na densidade de volume dos alvéolos ($59,06 \pm 1,22\%$) concomitante a um aumento ($p < 0,01$) na densidade de volume dos septos alveolares ($35,15 \pm 0,69\%$) em comparação ao grupo controle, assim como aumentou ($p < 0,01$) também a densidade de volume dos leucócitos ($5,78 \pm 0,68\%$).

Lavado broncoalveolar

Foi observado um aumento no número de macrófagos alveolares ($10^3/\text{mL}$) no grupo O10' ($216,9 \pm 118,7$), que foi reduzido no grupo O30' ($1560,5 \pm 107,4$) e O90' ($1467,6 \pm 39,3$), em

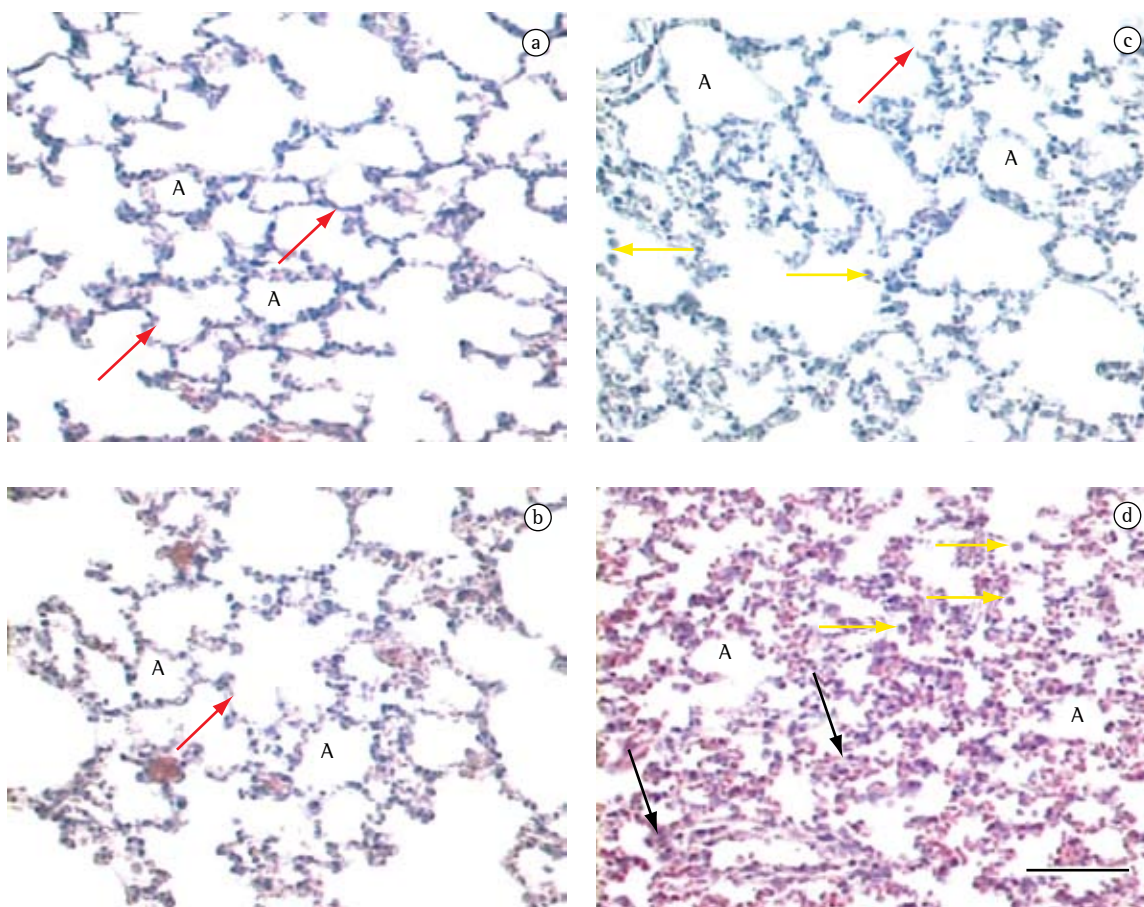


Figura 1 – Histologia: a) grupo controle com septos alveolares preservados (setas vermelhas), capilares íntegros e alvéolos de tamanho normal (A) sem presença de infiltrado inflamatório (H&E, 400x); b) grupo O10' com padrão histológico semelhante ao grupo controle sem anormalidades evidentes (H&E, 400x); c) grupo O30' com pequeno infiltrado inflamatório nos alvéolos (setas amarelas) e septo alveolar ligeiramente espessado (seta vermelha) com infiltrado inflamatório evidente (H&E, 400x); e d) grupo O90' com extravasamento de hemácias dos capilares, septos túrgidos (setas pretas) e células inflamatórias nos alvéolos (setas amarelas) com imagem sugestiva de congestão e hemorragia, sem comprometimento da histoarquitetura pulmonar. (H&E, 400x). Barra - 100 μm .

Tabela 1 – Análise estereológica dos alvéolos, septos alveolares e leucócitos no grupo controle e nos grupos expostos ao oxigênio em diferentes tempos.

Grupos	Estereologia		
	Vva (%)	Vvsa (%)	Vvl (%)
Controle	83,51 ± 1,20	15,00 ± 1,21	1,48 ± 0,22
O10'	81,32 ± 0,51	16,64 ± 0,70	2,02 ± 0,23
O30'	78,75 ± 0,54	17,73 ± 0,26	3,51 ± 0,32
O90'	59,06 ± 1,22 ^a	35,15 ± 0,69 ^a	5,78 ± 0,68 ^a

Vva: alvéolos; Vvsa: septos alveolares; Vvl: leucócitos; O10': expostos a hiperóxia por 10 min; O30': expostos a hiperóxia por 30 min; e O90': expostos a hiperóxia por 90 min; e ^ap < 0,01 vs. o grupo controle.

comparação ao grupo controle (781,32 ± 78,3). Além disso, os grupos expostos ao oxigênio foram estatisticamente diferentes do grupo controle com p < 0,001 (Figura 2). Quanto ao número de neutrófilos, verificou-se que um aumento constante nos grupos O10' (396,3 ± 35,4), O30' (338,4 ± 17,6) e O90' (388,7 ± 11,7) em comparação ao grupo controle (61,6 ± 4,2) com p < 0,001 para todos os grupos expostos ao oxigênio (Figura 2).

Análise do dano oxidativo

O dano oxidativo foi avaliado pelo TBARS (Figura 3). O grupo controle foi considerado como 100% e os outros grupos como variação do grupo controle. Observamos um aumento progressivo da detecção de TBARS no grupo O10' (143 ± 7,8, p < 0,05), O30' (180,4 ± 5,6, p < 0,001) e O90' (235 ± 13,7, p < 0,001) em comparação ao grupo controle (100,6 ± 1,7).

Discussão

O oxigênio é largamente prescrito por profissionais da unidade de terapia intensiva. Quando administrado corretamente ele pode salvar vidas, mas o oxigênio é freqüentemente ofertado sem uma cuidadosa avaliação de seus potenciais benefícios e de seus efeitos colaterais. Como qualquer outra droga, existem claras indicações para tratamento com oxigênio e métodos apropriados de administração. Uma dose inadequada e a falha da monitorização desse tipo de tratamento podem gerar graves conseqüências. A monitorização cuidadosa para detectar e corrigir os efeitos adversos de forma rápida é essencial. Os resultados deste

estudo demonstraram uma ação não desejável do oxigênio ofertado em elevada concentração através de parâmetros como histologia, estereologia, lavado broncoalveolar e dano oxidativo. Apesar do influxo de células inflamatórias e do dano oxidativo serem observados em um estudo experimental agudo, a possível implicação de distúrbio na histoarquitetura pulmonar induzido por concentrações elevadas de oxigênio em humanos não deveria ser descartada.

Nossos resultados estão de acordo com um estudo em que a análise histológica do pulmão de ratos submetidos à hiperóxia revelou um aumento no número de macrófagos alveolares e no número de células epiteliais do tipo II.⁽¹⁶⁾ Foram observados moderado exsudato alveolar e espaços aéreos aumentados. Entretanto, as alterações histológicas em nossos animais foram evidenciadas mais precocemente. A exposição prolongada às concentrações elevadas do oxigênio (>50% de O₂) durante um ajuste intensivo de cuidados para manter pressão parcial arterial de oxigênio ideal pode conduzir à lesão progressiva no pulmão.^(17,18) Macrófagos, neutrófilos e linfócitos estão envolvidos nesse processo. Em animais expostos ao oxigênio > 95% durante 72 h foi observada uma diminuição no número de macrófagos alveolares, concomitante a um aumento no número de neutrófilos e linfócitos em comparação com animais expostos ao ar ambiente.⁽¹⁹⁾ Nossos resultados demonstram um aumento de neutrófilos no grupo exposto à hiperóxia 100% em comparação com o grupo controle, porém, não foram observadas significativas diferenças com relação aos linfócitos. Contudo, nós observamos um aumento também no número de macrófagos alveolares no grupo inicial (O10'), que foi reduzindo conforme aumentou o tempo de exposição ao oxigênio. O resultado observado no lavado broncoalveolar não foi idêntico à densidade de volume de leucócitos. Acreditamos que devido ao grupo O90' sofrer alterações patológicas induzidas pela hiperóxia, o resultado do lavado reflete principalmente as condições do influxo de células dos brônquios e bronquíolos. Sugerimos que um tempo maior de hiperóxia (dois a quatro dias) poderia diminuir o número de macrófagos alveolares. Essa especulação pode ser confirmada através do estudo de um autor,⁽²⁰⁾ que também encontrou números elevados de neutrófilos e linfócitos combinados com números diminuídos de macrófagos alveolares nos pulmões de ratos expostos à hiperóxia durante 64 h.

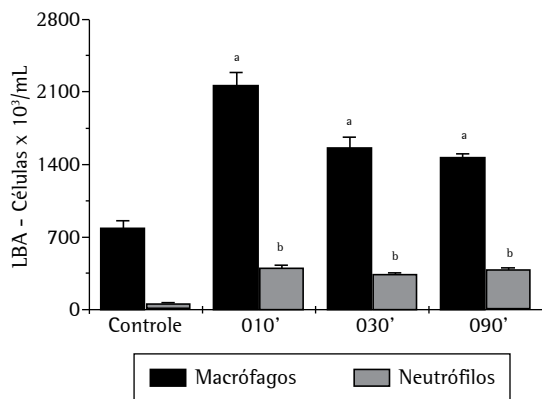


Figura 2 - Análise do lavado broncoalveolar (LBA) mostrando o efeito tempo-dependente da hiperóxia sobre o influxo de células inflamatórias no pulmão de ratos Wistar; ^ap < 0,001 vs. controles; e ^bp < 0,001 vs. controles.

A exposição de macrófagos alveolares ao oxigênio em condições normais é de aproximadamente 13%. Entretanto, sob circunstâncias da exposição suplementar do oxigênio (por exemplo, pacientes com doenças agudas), os macrófagos podem ser expostos a até 90% de oxigênio. Sabe-se que os macrófagos, em condições de estresse oxidativo como fumaça de cigarro, sobrevivem por períodos de tempo prolongados no pulmão.⁽²¹⁾ Em contraste, macrófagos *in vitro* (macrófagos de linhagem RAW) sobrevivem à hiperóxia por um período de tempo prolongado, isto é, associado à ativação celular da quinase regulada por sinais extracelulares, conhecida como *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) em inglês. Como mostrado no estudo de outro autor,⁽²²⁾ a sobrevivência dos macrófagos após 24 h de hiperóxia realizava-se perto de 100%. Em contraste, a sobrevivência do macrófago depois de 24 h de hiperóxia com inibição de ERK foi diminuída significativamente (~60%) (p < 0,05). Esses dados suportam a hipótese de que a hiperóxia leva à ativação de ERK, que é um sinal crucial para manter a vitalidade dos macrófagos.

A ativação de células inflamatórias causa a liberação de espécies reativas do oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias, tendo por resultado a disfunção endotelial, formação de edema no tecido alveolar e inativação do surfactante.⁽²³⁾ Não foi possível, neste estudo, determinar as citocinas envolvidas no processo inflamatório, tampouco

estudar os fatores nucleares envolvidos na ativação dessas células. Entretanto, as citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e o interferon gama (IFN- γ), podem destruir o processo de injúria pulmonar. Estudos recentes detectaram concentrações aumentadas de TNF- α e IFN- γ em pulmões de animais expostos a hiperóxia antes que o infiltrado de neutrófilos fosse evidente.⁽²⁴⁾ Um outro estudo mostrou que os ratos que não expressam receptor de TNF, o receptor TNF I ou o receptor TNF II, permaneceram suscetíveis à hiperóxia, sugerindo que TNF- α não é uma molécula chave para a lesão pulmonar induzida por hiperóxia.⁽²⁵⁾ O IFN- γ é conhecido por ser liberado pelas células inflamatórias do pulmão, inclusive linfócitos, após a exposição à hiperóxia.⁽²⁶⁾ Diversos estudos mostram que IFN- γ induz a apoptose em diversos tipos de células, inclusive células epiteliais do pulmão, e está envolvido por mediar lesão pulmonar.⁽⁹⁾

A patogênese da lesão induzida por hiperóxia no pulmão não é bem compreendida, mas acredita-se ser mediada pelos danos diretos à célula através da geração de espécies reativas de oxigênio.^(27,28) É geralmente aceito que a produção aumentada das espécies reativas de oxigênio inicia um papel importante na lesão do pulmão durante a exposição à hiperóxia.⁽²⁹⁾ Dano oxidativo pode ser evidenciado por peroxidação de lipídeos no pulmão através das TBARS.⁽³⁰⁾ Um estudo apresentou aumento pronunciado na concentração de TBARS ($146,0 \pm 62,0$ nmol/mL) em ratos expostos à hiperóxia comparado à normóxia ($35,0 \pm 14,0$ nmol/mL) e a oferta de O₂ a 60% ($31,0 \pm 17,0$ nmol/mL).⁽²⁹⁾ Observamos que ratos Wistar expostos à hiperóxia por 10, 30 ou 90 min têm um aumento do dano oxidativo analisado através do TBARS e essa resposta é progressiva de acordo com o tempo de exposição. O dano oxidativo máximo observado no grupo 090' é compatível com a densidade de volume de leucócitos, lembrando que, nesse caso, essa resposta poderia ser explicada também pelo acúmulo de leucócitos no septo alveolar. Não foi possível determinar quais espécies reativas de oxigênio estavam envolvidas na produção do dano oxidativo, mas acreditamos que o O₂ possa ter um papel crucial.

Os resultados deste estudo sugerem que a exposição à hiperóxia é prejudicial e lesiva ao pulmão de ratos Wistar. Não foi possível, neste estudo, afirmar que a hiperóxia foi de 100%, mas acreditamos que a concentração de oxigênio na câmara de exposição

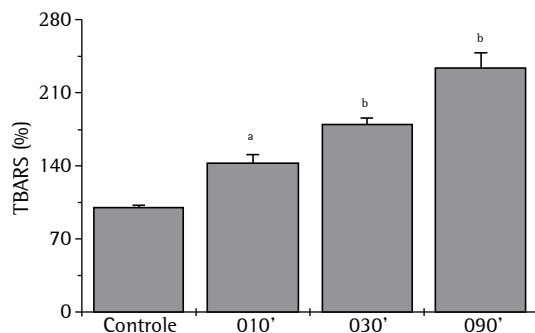


Figura 3 – Efeito tempo-dependente da hiperóxia sobre o dano oxidativo analisado através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); ^ap < 0,05 vs. controles; e ^bp < 0,001 vs. controles.

tenha chegado próxima a esse valor. Sugerimos que o tempo é um fator importante e crucial para o processo de injúria induzida pela hiperóxia. É provável que a observação desse modelo possa ser estendida a seres humanos, embora as introduções das doses e a duração permaneçam pouco esclarecidas. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar induzida por oxigênio são complexos, mas nós sugerimos, mesmo em uma fase aguda, possível efeito deletério para o pulmão.

Referências

- O'Reilly MA. DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: braking to facilitate repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(2):291-305.
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, Zhu Z, Nedrelov JH, Chupp GL, et al. Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nat Med.* 2006;12(11):1286-93.
- Barazzzone C, White CW. Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22(5):517-9.
- Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, et al. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(4):453-63.
- Song Y, Fukuda N, Bai C, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol.* 2000;525 Pt 3:771-9.
- Matthew E, Kutcher L, Dedman J. Protection of lungs from hyperoxic injury: gene expression analysis of cyclosporin A therapy. *Physiol Genomics.* 2003;14(2):129-38.
- Lian X, Qin Y, Hossain SA, Yang L, White A, Xu H, et al. Overexpression of Stat3C in pulmonary epithelium protects against hyperoxic lung injury. *J Immunol.* 2005; 174(11):7250-6.
- Babu PB, Chidekel A, Shaffer TH. Hyperoxia-induced changes in human airway epithelial cells: the protective effect of perflubron. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(2):188-94.
- Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Sasaki H. Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(5):1042-7.
- Dauger S, Ferdjadj L, Saumon G, Vardon G, Peuchmaur M, Gaultier C, et al. Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice. *Chest.* 2003;123(2):530-8.
- Cotton RB, Sundell HW, Zeldin DC, Morrow JD, Roberts LJ, Hazinski TA, et al. Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic lung injury in lambs. *Pediatr Res.* 2006;59(1):142-6.
- Ben-Ari J, Makhoul IR, Dorio RJ, Buckley S, Warburton D, Walker SM. Cytokine response during hyperoxia: sequential production of pulmonary tumor necrosis factor and interleukin-6 in neonatal rats. *Isr Med Assoc J.* 2000;2(5):365-9.
- Narasaraju TA, Jin N, Narendranath CR, Chen Z, Gou D, Liu L. Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(5):1037-45.
- Lee PJ, Choi AM. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(4):341-50.
- Valencia SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(5):373-81.
- Paine R 3rd, Wilcoxon SE, Morris SB, Sartori C, Baleeiro CE, Matthay MA, et al. Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2397-406.
- Barnikol WK, Pötzschke H. [Haemoglobin hyperpolymers, a new type of artificial oxygen carrier – the concept and current state of development][Article in German]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2005;40(1):46-58.
- Zhu CP, Du J, Li QP, Feng ZC. [Effect of lethal hyperoxia on pulmonary development and lung injury in neonatal rats][Article in Chinese]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2006;26(7):945-8.
- Horinouchi H. [Role of polymorphonuclear leukocytes in experimental lung injury--chemotaxis and active oxygen metabolite production][Article in Japanese]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1990;91(6):741-8.
- Balaan MR, Bowman L, Dedhia HV, Miles PR. Hyperoxia-induced alterations of rat alveolar lavage composition and properties. *Exp Lung Res.* 1995;21(1):141-56.
- Horinouchi H, Wang CC, Shepherd KE, Jones R. TNF alpha gene and protein expression in alveolar macrophages in acute and chronic hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;14(6):548-55.
- Nyunoya T, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Hunninghake GW. Macrophages survive hyperoxia via prolonged ERK activation due to phosphatase down-regulation. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26295-302.
- Hesse AK, Dörger M, Kupatt C, Krombach F. Proinflammatory role of inducible nitric oxide synthase in acute hyperoxic lung injury. *Respir Res.* 2004;5:11.
- Vondráček J. Effects of recombinant rat tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the respiratory burst

- of rat polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Folia Biol (Praha)*. 1997;43(3):115-21.
25. Pryhuber GS, O'Brien DP, Baggs R, Phipps R, Huyck H, Sanz I, et al. Ablation of tumor necrosis factor receptor type 1 (p55) alters oxygen-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(5):1082-90.
26. Granowitz EV, Skulsky EJ, Benson RM, Wright J, Garb JL, Cohen ER, et al. Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon-gamma secretion in whole blood cultures of healthy humans. *Undersea Hyperb Med*. 2002;29(3):216-25.
27. Nagata K, Iwasaki Y, Yamada T, Yuba T, Kono K, Hosogi S, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury. *Respir Med*. 2007;101(4):800-7.
28. Xu D, Guthrie JR, Mabry S, Sack TM, Truog WE. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):966-75.
29. Wang Y, Feinstein SI, Manevich Y, Ho YS, Fisher AB. Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(11):1736-43.
30. Nader-Djalal N, Knight PR 3rd, Thusu K, Davidson BA, Holm BA, Johnson KJ, et al. Reactive oxygen species contribute to oxygen-related lung injury after acid aspiration. *Anesth Analg*. 1998;87(1):127-33.