

Alterações morfológicas induzidas pelo ácido oléico em pulmões de ratos*

THAIS HELENA A.T. QUELUZ¹, JÚLIO DEFAVERI², SILENE EL-FAKHOURI³

O ácido oléico (AO) tem sido utilizado experimentalmente, devido a suas ações direta e indireta sobre o tecido pulmonar, como modelo de embolia gordurosa e de síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações morfológicas agudas e crônicas causadas nos pulmões pela injeção intravenosa de AO em ratos. Ratos machos da linhagem Wistar foram injetados com 0,05ml de AO e grupos de cinco animais foram sacrificados 2, 24, 48 horas, 5, 10, 30 e 90 dias após a injeção. Os estudos de microscopia óptica revelaram edema alveolar difuso, focos de hemorragia intra-alveolar e focos de necrose isquêmica de 2 a 48 horas após a injeção. Nesse período, a microscopia eletrônica mostrou grave comprometimento endotelial e lesão de pneumócitos do tipo II. A partir do 5º dia após a injeção, observou-se resolução dessas lesões com discretas seqüelas morfológicas. Os pulmões dos ratos sacrificados nos 30º e 90º dias eram iguais aos dos grupos-controles. Este modelo permite a sobrevivência dos animais, sendo adequado para estudos de embolia gordurosa e de SARA.

(J Pneumol 1997;23(5):245-251)

Morphological lesions induced by oleic acid in lungs of rats

Because it has direct and indirect action on lung tissue, oleic acid (OA) has been used experimentally as a model of fat embolism and acute respiratory distress syndrome (ARDS). The aim of this study was to describe acute and chronic pulmonary lesions induced in rats by intravenous injection of OA. Male Wistar rats were injected a 0.05 ml dose of OA. Groups of 5 animals were sacrificed 2, 24, 48 hours, and 5, 10, 30, and 90 days after injection. Diffuse alveolar edema, foci of intra-alveolar hemorrhage, and foci of ischemic necrosis were observed by light microscopic from 2 to 48 hours. At this period of time, severe endothelial injuries and type II alveolar cell lesions were observed on electron microscopy. After the fifth day, no injury was observed and discrete morphological sequelae were found. The lungs of the animals sacrificed at the thirtieth and ninetieth days were identical to those of the control groups. The present model allows animal to survive, being suitable for studies on fat embolism and on ARDS.

Descritores – Ácido oléico. Embolia gordurosa. Síndrome da angústia respiratória aguda, SARA. Modelo experimental.

Key words – Oleic acid. Fat embolism. Acute respiratory distress syndrome, ARDS. Experimental model.

Síglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

AO – Ácido oléico

SARA – Síndrome da angústia respiratória aguda

HE – Hematoxilina-eosina

PMN – Polimorfonucleares

* Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp.

1. Professora Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica, Chefe da Disciplina de Pneumologia
2. Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia.
3. Assistente de Ensino em Terapia Intensiva da Faculdade de Medicina de Marília e aluna do Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Endereço para correspondência – Thais Helena A. Thomaz Queluz, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina – Unesp – 18618-000 – Botucatu, SP. Fax: (014) 822-2238. E-mail:queluz@laser.com.br.

Recebido para publicação em 18/8/97. Reapresentado em 18/11/97. Aprovado, após revisão, em 3/12/97.

INTRODUÇÃO

O ácido oléico (AO) é um ácido graxo insaturado que, ao contrário das gorduras neutras, provoca lesão pulmonar grave, seja na embolia gordurosa humana, seja em seus modelos experimentais. Atua ligando-se ao cálcio constituinte das pontes intercelulares, removendo esse íon e formando sabões, enfraquecendo as junções celulares, com conseqüente aumento da permeabilidade capilar⁽¹⁾. Tem também ação tóxica direta, que provoca necrose parenquimatosa e lesão

endotelial^(1,2). Sua presença na microcirculação desencadeia fenômenos tromboembólicos, mecânicos ou reflexos, que causam diminuição da perfusão e hipóxia⁽³⁻⁶⁾.

Uma vez que provoca edema pulmonar de origem não cardiogênica, o AO é uma causa de síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)⁽⁷⁾, cujas causas são classificadas em *direta* (quando o mediador inicial é conhecido; por exemplo: embolia gordurosa, aspiração de conteúdo gástrico) e *indireta* (quando a lesão depende da resposta do hospedeiro; por exemplo: septicemia, choque)⁽⁸⁾. Embora o mecanismo exato do dano ao endotélio e ao epitélio pulmonares na SARA – mesmo nas lesões diretas – seja desconhecido, evidências atuais apontam para os neutrófilos como as principais células responsáveis pelo desenvolvimento dessa síndrome, devido à liberação de produtos tóxicos (intermediários reativos do metabolismo do oxigênio, proteases e metabólitos do ácido araquidônico). Por outro lado, pacientes com acentuada neutropenia podem apresentar SARA, sendo provável que outras células, especialmente macrófagos pulmonares, produzam também substâncias tóxicas. Além disso, algumas moléculas, tais como endotoxinas, fator de necrose tumoral, interleucinas e fator agregador de plaquetas, podem, através de mecanismos ainda incertos, lesar diretamente a membrana das células endoteliais e das epiteliais⁽⁸⁾.

Trabalhos mais recentes utilizam a injeção de AO, especialmente em animais de porte médio, como modelo experimental de SARA de causa direta^(7,9-11). Entretanto, esses estudos têm como principal interesse os fenômenos agudos provocados pelo AO, havendo apenas um estudo morfológico sistemático de lesões agudas e crônicas realizado em cães⁽¹²⁾.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo morfológico das alterações pulmonares agudas e crônicas induzidas em ratos pela injeção intravenosa de AO.

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Ratos machos da linhagem Wistar foram mantidos no Biotério Central do *Campus* de Botucatu até atingir peso de aproximadamente 200g, sendo, a seguir, transferidos para gaiolas metálicas individuais do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica. Durante uma semana receberam água *ad libitum* e ração para ratos fornecida pelo Biotério Central do *Campus*.

Após esse período, foram pesados, tendo sido selecionados 50 animais, formando-se 10 grupos de ratos de pesos homogêneos, cada grupo constituído por 5 ratos. Destes, 7 grupos destinaram-se a compor os grupos experimentais (E) de animais tratados com AO; os outros 3 foram grupos-controles (C) constituídos por animais que receberam apenas salina.

Os animais dos grupos E receberam, por via intravenosa, 0,05ml de AO misturado com 0,5ml de salina; 5 animais

foram sacrificados em cada um dos seguintes tempos (T) após a injeção: 2, 24 e 48 horas, 5, 10, 30 e 90 dias. Estes grupos foram assim registrados: T2h, T24h, T48h, T5d, T10d, T30d e T90d.

Os ratos dos grupos C foram sacrificados nos seguintes tempos: T₀, entre o 1º e o 10º dia do experimento, para controle dos animais E sacrificados entre T2h e T10d; T30d e T90d, sacrificados, respectivamente, 30 e 90 dias após o início do experimento, para controle dos ratos E sacrificados tardiamente.

Os animais foram sacrificados sob anestesia com 4mg/100g de peso, por via intraperitoneal, de tionembutal, sendo feitas toracotomia e retirada dos pulmões para posterior exame. O lobo inferior esquerdo foi fixado em formol a 10% para exame de microscopia óptica. O lobo médio esquerdo foi cortado em cubos de 1mm e fixado em glutaraldeído a 2,5% para exame de microscopia eletrônica.

EXAMES REALIZADOS NO MATERIAL COLHIDO

Microscopia óptica: Fragmentos de pulmão foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados na espessura de 4µ e corados pela hematoxilina-eosina (HE). A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, sem o investigador conhecer os grupos de ratos aos quais pertenciam os tecidos examinados. Foram analisadas a presença e as características (intensidade e distribuição) das seguintes alterações: edema, hemorragia e necrose pulmonares. Como critério de graduação da intensidade, usou-se uma escala de 1 a 4: 1 – mínima, 2 – discreta, 3 – moderada, 4 – intensa. Foi também analisada a presença (+) ou não (-) de polimorfonucleares (PMN) e de fibrina.

Microscopia eletrônica: Fragmentos de pulmão foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, por 3 horas, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no tampão por 2 horas. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcool e incluídos em araldite M. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo da *LKB (III-8800)*, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico da *Philips (EM 301)*.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

As fotografias de microscopia óptica foram obtidas em fotomicroscópio automático *Zeiss-Standard RA* com filme *Kodak Plus-X-Pan* 16 DIN e ampliações de 12x8cm. As de microscopia eletrônica foram obtidas com filme *Grain Release-Eastman Kodak* e posteriormente agrupadas em placas e refotografadas.

RESULTADOS

MORTALIDADE

Um rato do grupo ET90d morreu espontaneamente no 68º dia de observação, não tendo sido colhido material para exame.

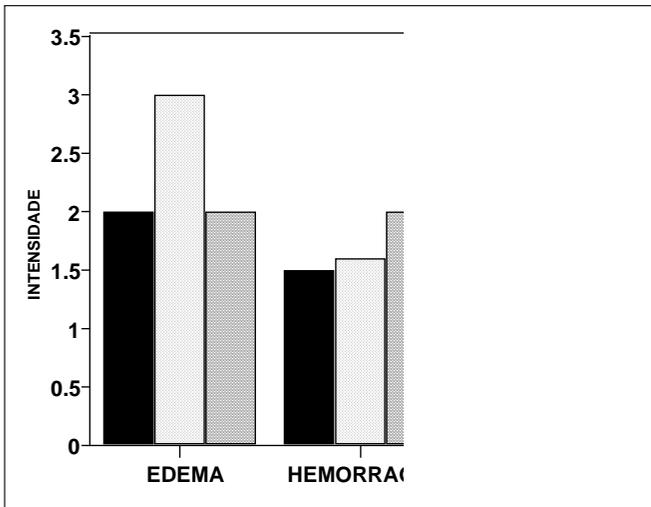


Figura 1 - Média da intensidade das alterações pulmonares observadas, à microscopia óptica, nos animais experimentais sacrificados de 2 a 48 horas (1, mínima; 2, discreta; 3, moderada; 4, intensa)

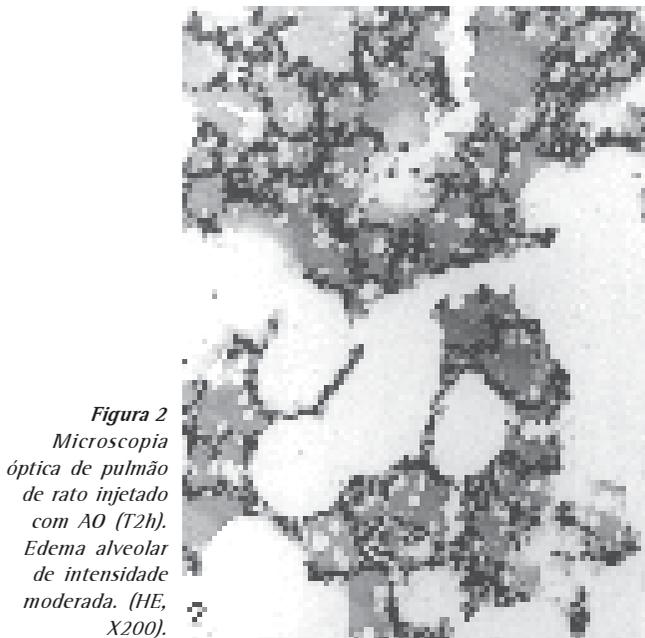


Figura 2
Microscopia
óptica de pulmão
de rato injetado
com AO (T2h).
Edema alveolar
de intensidade
moderada. (HE,
X200).



Figura 3
Microscopia
óptica de pulmão
de rato injetado
com AO (T24h).
Edema e
hemorragia
moderados (seta)
e discreto
acúmulo
intra-alveolar
de fibrina
(asterisco).
(HE, X125).



Figura 4
Microscopia
óptica de pulmão
de rato injetado
com AO (T24h).
Focos de necrose
incompleta de
septos alveolares
subpleurais
(setas). (HE, X20).

EXAME HISTOLÓGICO

Microscopia óptica: A intensidade das alterações histológicas pulmonares provocadas pelo AO de 2 a 48 horas após a injeção está expressa na figura 1.

Duas horas após a injeção de AO, havia edema alveolar difuso, predominantemente de intensidade discreta, associado a focos hemorrágicos mínimos ou discretos. Observaram-se múltiplos focos de necrose isquêmica recente comprometendo grupos de alvéolos mais ou menos extensos e de localização freqüentemente subpleural (figuras 2 a 6). Foram encontrados poucos PMN e raramente fibrina.

Em 24 horas, o padrão era similar ao anterior, observando-se, entretanto, tendência à intensificação do edema, exsudação de PMN em quantidade variável e presença de fibrina.

Em 48 horas, o edema mostrou tendência à redução e a hemorragia tinha graus semelhantes aos observados nos ratos sacrificados em 24 horas. A exsudação neutrofílica era de mesma intensidade da observada nos ratos sacrificados após 24 horas, mas os PMN apresentavam cariorréxis evidente.

A partir do 5º dia, não foram observadas as alterações descritas nas primeiras 48 horas. Nos ratos sacrificados nos

Figura 5
Microscopia
óptica de pulmão
de rato injetado
com AO (T48h).
Foco necrótico
mal delimitado.
Observam-se
picnose nuclear,
cariorréxis e
desaparecimento
dos núcleos. A
estrutura septal
está preservada e
tem aspecto
coagulativo. Há
poucos
neutrófilos. (HE,
X320).

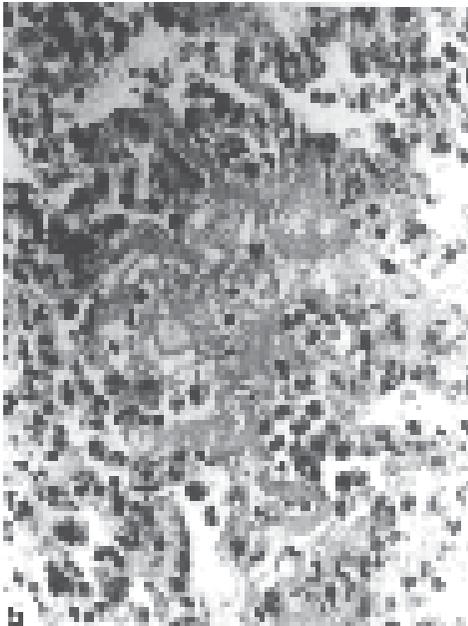
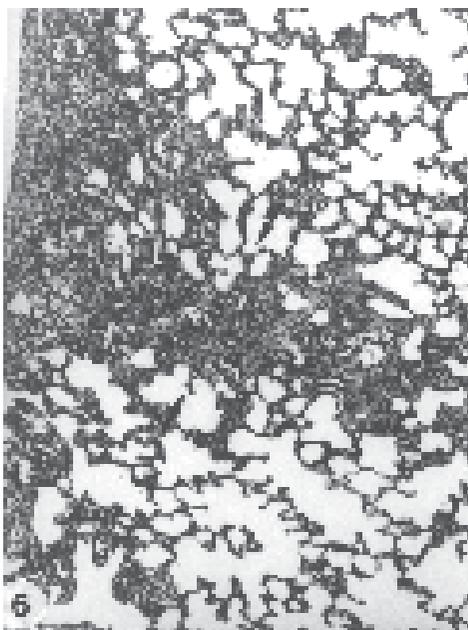


Figura 6
Microscopia
óptica de pulmão
de rato injetado
com AO (T10d).
Lesão cicatricial,
fibrótica,
subpleural,
estendendo-se em
forma de cunha
para o
parênquima
pulmonar (setas).
(HE, X125).



dias 5 e 10, havia pequenas lesões subpleurais, com discreta fibrose, sugestivas de resolução do processo anterior (figura 7).

Os pulmões dos ratos sacrificados nos dias 30 e 90 eram idênticos aos do grupo-controle. Nos pulmões dos animais experimentais e controles, durante todo o período de estudo, foi freqüente o encontro de pneumonite intersticial crônica, caracterizada por infiltração de monócitos, espessamento dos septos alveolares, hiperplasia de pneumócitos descamados para a luz alveolar e hiperplasia linfóide peribrônquica de intensidade variável. Além disso, nos ratos



Figura 7
Microscopia
óptica de pulmão
de rato normal
(T30d).
Pneumonite
intersticial, com
discreto
espessamento
inflamatório dos
septos (seta) e
agregados
linfóides
peribrônquicos
(dupla seta).
Nota-se enfisema
pan-acinar. (HE,
X80).

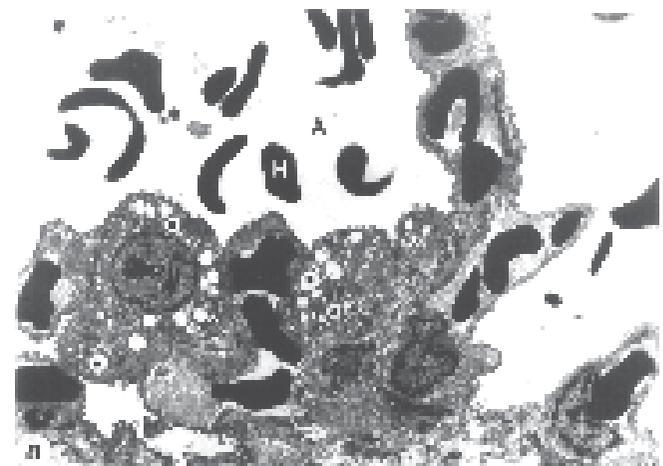


Figura 8 – Eletron-micrografia de pulmão de rato injetado com AO (T2h). Hemácias (H) e restos celulares na luz alveolar (A). Pneumócitos do tipo II (PII) hiperplásicos com corpúsculos lamelares (asterisco) vazios de surfactante. (X 4.700).

experimentais e controles sacrificados em T30d e T90d, observaram-se, também, áreas enfisematosas de extensão variável (figura 7). Esses achados foram abstraídos da avaliação dos grupos experimentais.

Microscopia eletrônica: As lesões pulmonares observadas ao microscópio eletrônico nos três primeiros tempos de sacrifício foram semelhantes e serão descritas em conjunto.

Observaram-se edema intra-alveolar e intersticial caracterizados, respectivamente, pelo acúmulo de material amorfo finamente granulado e pouco eletrondenso à luz alveolar e pela dissociação das estruturas de sustentação. À luz alveolar, havia inúmeras hemácias, isoladas ou agrupadas, macrófagos com inclusão de gotículas muito densas de lipídios, exsudato amorfo de fibrina e, freqüentemente, mielina tu-

Figura 9
Eletron-
micrografia
de pulmão de rato
injetado com AO
(T24h).
Pneumócito do
tipo I (PI) com
edema
citoplasmático e
inúmeras
vesículas (v).
Célula endotelial
(E) edemaciada
com projeções
(seta) para a luz
capilar (asterisco).
Espaço alveolar
(A) com material
floculado. (X
28.000).

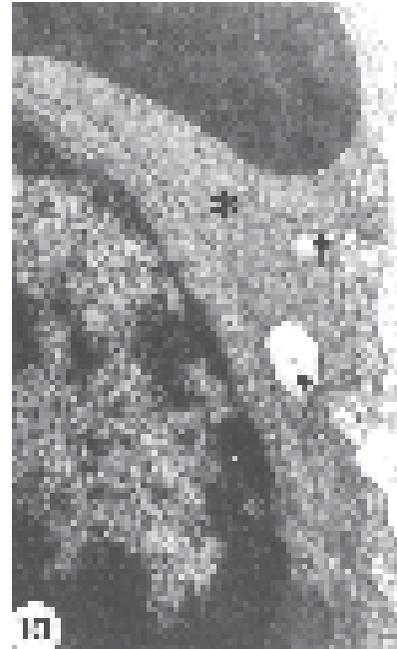


Figura 10
Eletron-
micrografia de
pulmão de rato
injetado com AO
(T2h). Endotélio
descolado da
membrana basal
alveolar formando
projeções (setas)
para a luz capilar
(asterisco). Edema
intra-alveolar (A).
(X 27.300).

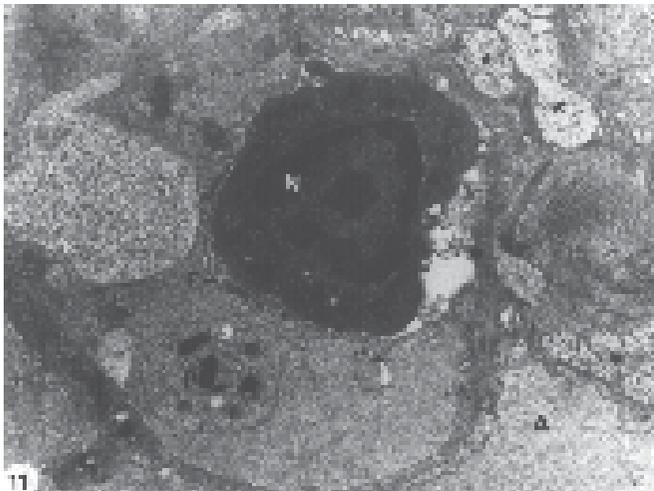


Figura 11 – Eletron-micrografia de pulmão de rato injetado com AO (T48h). Diapedese de neutrófilo (N) que se encontra entre o endotélio (E) e a membrana basal alveolar (seta). Plaqueta (P) na luz capilar. Edema alveolar (A) e intersticial, com dissociação das estruturas de sustentação (asterisco). (X 20.500).

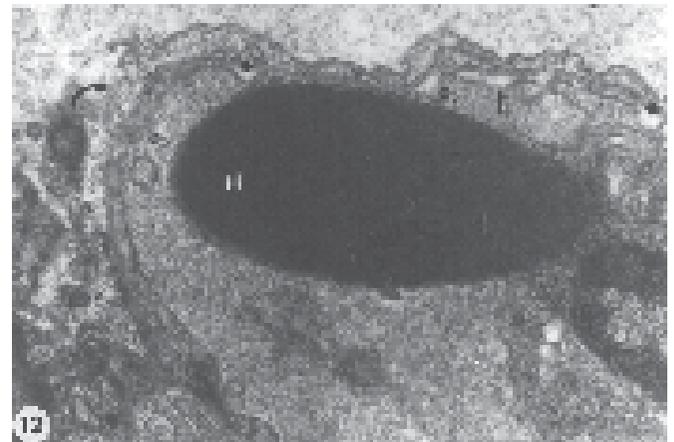


Figura 12 – Eletron-micrografia de pulmão de rato injetado com AO (T2h). Focos de descolamento (seta) e ruptura (dupla seta) endoteliais. Pneumócito do tipo I com áreas de ruptura (seta curva). Hemácia (H) na luz capilar. (X 54.000).

bular (surfactante) e restos celulares (figura 8). O revestimento epitelial alveolar apresentava áreas de solução de continuidade, onde pneumócitos do tipo I estavam rompidos. Próximo a essas regiões, os pneumócitos I mostravam grande número de vesículas e edema citoplasmático intenso.

Os pneumócitos do tipo II eram hiperplásicos, com projeções para a luz alveolar e citoplasma com grande quantidade de corpúsculos lamelares, geralmente vazios de surfactante (figura 9). A luz capilar estava, em geral, ocupada por hemácias, plaquetas e/ou PMN. O endotélio era hipertrófico

com edema citoplasmático e descolado, focalmente, da membrana basal, formando pequenas projeções para a luz capilar associadas ao desnudamento focal da membrana basal (figuras 10 a 12). Em todos os tempos precoces do experimento observaram-se áreas com extensas lesões necróticas que impossibilitaram a identificação das estruturas pulmonares.

Os pulmões dos ratos experimentais sacrificados a partir de T5d apresentaram aspecto ultra-estrutural semelhante aos dos grupos-controles.

DISCUSSÃO

A mortalidade observada neste trabalho (2,2%) é significativamente menor que a relatada por Wertzberger e Peltier⁽¹³⁾ que, inoculando 0,04ml de AO intravenoso em ratos da linhagem Holtzman, observaram mortalidade de 47%. Levando-se em conta que a diferença identificável entre esses experimentos consiste na utilização de ratos de linhagens diferentes, pode-se supor que haja diferença de tolerância ao AO entre linhagens de ratos. Em porcos, doses baixas de AO também causam pequena mortalidade⁽⁹⁾.

Observou-se, como outros autores^(1-3,6,10,14-17), que o AO provoca agudamente edema alveolar difuso e focos hemorrágicos intra-alveolares, devidos provavelmente às alterações do endotélio capilar encontradas na microscopia eletrônica e à necrose septal observada nas microscopias óptica e eletrônica.

Embora com variações individuais, o edema mostrou tendência a ser mais intenso até a 24ª hora, com posterior declínio. Esses resultados apóiam os de Wertzberger e Peltier⁽¹³⁾, que demonstraram que o peso dos pulmões de ratos sacrificados após 24 horas da injeção de AO é maior que o dos sacrificados em 48 horas, sugerindo que a lesão é transitória e, uma vez que o animal sobreviva à fase inicial, o processo de reparação é prontamente ativado. Em estudo com AO marcado com radioisótopo foi observado que a lesão pulmonar tem início 10 minutos após a injeção e que 12 horas depois a radioatividade no pulmão diminui, indicando redução na agressão pulmonar⁽¹⁷⁾.

À microscopia óptica, foram observados, em todos os momentos e cortes estudados, até a 48ª hora, focos múltiplos de necrose isquêmica, mais evidentes a partir da 24ª hora, quando adquirem expressão morfológica definida. Derks e Jacobovitz-Derks⁽¹²⁾ descreveram necrose septal 6 horas após a injeção de AO em cães, porém, em outros estudos de microscopia óptica, focos necróticos não foram relatados^(6,14,18-21). Têm sido referidas alterações degenerativas, como as observadas por Bogossian *et al.*⁽²⁰⁾ e Nery *et al.*⁽²¹⁾, nas células de bronquíolos e ductos alveolares de cães injetados com AO. Já em estudos de microscopia eletrônica os relatos de áreas de necrose são mais frequentes^(13,15,20-22). Beilman⁽¹⁷⁾ descreve as alterações de microscopia eletrônica em cortes de pulmão após vários tempos de injeção do AO, não observando necrose focal; porém, deixa evidente a presença, em todos os casos, de separação da membrana basal, achado fortemente sugestivo de lesão da célula endotelial.

A necrose foi denominada isquêmica devido a seu padrão morfológico, isto é, as células se apresentavam como massa opaca acidófila, geralmente com perda dos núcleos, porém com preservação do formato celular básico, permitindo o reconhecimento dos limites celulares e da arquitetura do tecido. Esse padrão de necrose resulta mais comumente de

grave e súbita isquemia, mas pode ocorrer, também, por desnaturação de proteínas imediatamente após a morte celular⁽²³⁾.

Defaveri *et al.*⁽²⁴⁾, embolizando pulmões de ratos com partículas de bentonita, não observaram necrose nas áreas irrigadas pelos vasos obstruídos. Entretanto, a bentonita é partícula inerte; quando a embolização é com o AO, além da obstrução mecânica, há o efeito tóxico direto sobre o endotélio capilar e, também, a participação do sistema nervoso simpático, da inervação pulmonar e de substâncias vasoativas na intensificação da vasoconstrição e de sua conseqüente hipóxia^(4,6,25). Além disso, o AO extravasado para o interstício exerce, também nesse local, sua ação tóxica direta⁽¹⁾.

Não foi pesquisada a gênese da necrose focal encontrada no presente trabalho, mas levando-se em consideração os comentários acima, pode-se sugerir que, embora o padrão morfológico da lesão seja isquêmico, ela seja decorrente de pelo menos dois fatores: os fenômenos embólicos, mecânicos e reflexos, e a ação tóxica direta do AO.

A presença de fibrina junto aos focos de necrose é indicador da gravidade da lesão endotelial, a qual permite a passagem de moléculas de alto peso molecular, como o fibrinogênio, para a luz alveolar, onde há precipitação de massas de fibrina⁽²³⁾.

Também próximo às áreas de necrose, observou-se, em 24 horas, exsudação de PMN, células iniciais da resposta inflamatória, as quais, na 48ª hora, apresentavam cariorréxis evidente. A adesão de PMN às células endoteliais foi evidenciada por Beilman⁽¹⁷⁾ 1 hora após injeção de AO. A participação ativa dos macrófagos nessa reação inflamatória é sugerida pela presença de inclusões de lipídios, de restos celulares ou de cristais de hemoglobina nos macrófagos, como observado na microscopia eletrônica.

Microatelectasias têm sido consideradas como substrato anatomopatológico do modelo experimental de lesão pulmonar pelo AO^(20,26). Elas seriam devidas ao edema pulmonar e, principalmente, à diminuição do surfactante por lesão dos pneumócitos do tipo II, seja por ação tóxica direta do AO ou pelo regime de hipóxia a que eles estão submetidos. Entretanto, Bogossian *et al.*⁽²⁰⁾ demonstraram que, quando pulmões de cães embolizados com AO são fixados em expansão, sob pressão de 30cm de água, as microatelectasias são desfeitas facilmente. No presente trabalho, os pulmões foram fixados de maneira clássica e áreas de colapso alveolar foram encontradas nos animais dos grupos experimentais e controles. Essas observações mostram que microatelectasias podem ocorrer inclusive em animais não submetidos a procedimentos que induzem lesões de natureza tóxica. Porém, a microscopia eletrônica revelou pneumócitos II com corpos lamelares praticamente vazios nos grupos experimentais, comprovando a diminuição do surfactante.

No 5º dia após a injeção de A0, a lesão estava resolvida e, em alguns animais, encontraram-se pequenos focos de fibrose subpleural, sugestivos de resolução do processo anterior. Nos demais tempos do experimento, não foram encontradas lesões pulmonares, indicando que, neste modelo, após uma fase aguda de 48 horas que, embora grave, permite a sobrevivência dos animais, o processo é resolvido praticamente sem seqüelas morfológicas.

Em cães, estudos prolongados, de 15 dias⁽¹⁶⁾ a um mês após a injeção de A0⁽¹²⁾, demonstraram, também, que o processo agudo se resolve em 48 horas e que, após a primeira semana, há áreas discretas de fibrose. Lesões fibróticas mais acentuadas foram observadas após múltiplas injeções de A0, sendo este um modelo de fibrose intersticial difusa, proposto por Derks e Jacobovitz-Derks⁽¹²⁾.

Como para este estudo não foram utilizados ratos *germ-free*, a pneumonite intersticial crônica observada nos animais experimentais e controles pode ser devida a infecção intrabiotério. Entretanto, não foram realizados estudos que permitam conclusões a esse respeito. Nos animais experimentais estudados de 2 a 48 horas essa pneumonite foi pouco evidente, provavelmente mascarada pela intensidade das lesões agudas causadas pelo A0.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a injeção de 0,05ml de A0 em ratos da linhagem Wistar provoca edema alveolar difuso, focos de hemorragia intra-alveolar e focos de necrose de padrão morfológico isquêmico, observados de 2 a 48 horas após a injeção. À microscopia eletrônica, há evidente comprometimento endotelial, com focos de ruptura celular e desnudamento da membrana basal alveolar, além de lesão de pneumócito II e diminuição do surfactante. Essas alterações, no 5º dia após a injeção, estão resolvidas praticamente sem seqüelas morfológicas. Nos tempos tardios do estudo (T30d e T90d), os pulmões dos ratos dos grupos experimentais e controles eram semelhantes, apresentando áreas enfisematosas de extensão variável, provavelmente decorrentes do envelhecimento dos animais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Titular Elisa Aparecida Gregório, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências-Unesp, pela cooperação nos estudos de microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

1. Peltier LF. Fat embolism. III: The toxic properties of neutral fats and free acids. *Surgery* 1956;40:665-670.
2. Peltier LF. The mechanics of parenchymatous embolism. *Surg Gynecol* 1955;100:612-618.
3. Peltier LF. Fat embolism current concepts. *Clin Orthop* 1969;66:241-249.
4. Peltier LF. Clinical diagnosis and treatment of fat embolism. *J Kans Med Soc* 1975;75:289-292.
5. Baker PL, Pazell JA, Peltier LF. Free fatty acids, catecholamines and arterial hypoxia in patients with fat embolism. *J Trauma* 1970;1:1026-1030.
6. Moritz E, Border JR, Schueller EF, Schenk W. Experimental pulmonary fat embolism. *Arch Surg* 1972;105:275-279.
7. Shuster DP. ARDS: clinical lesson from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:245-260.
8. Shuster DP, Kollef MH, Bone R. The acute respiratory distress syndrome (ARDS). In: Bone RC, ed. *Pulmonary and critical care medicine*. St. Louis: Mosby-Year Book Inc., 1997;R3:1-17.
9. Grotjohan HP, van der Heijde RMJL, Jansen JRC, Wangervoort CA, Versprille A. A stable model of respiratory distress by small injections of oleic acid in pigs. *Intensive Care Med* 1996;22:336-344.
10. Volpe BT, Winnie L, Tharall RS. Effect of intratracheal dexamethasone on oleic acid-induced lung injury in the rat. *Chest* 1994;106:583-587.
11. Moriuchi H, Arai I, Yuizono T. Tranexamic acid attenuates oleic acid-induced pulmonary extravasation. *Intensive Care Med* 1995;21:1003-1008.
12. Derks CM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol* 1977;87:143-158.
13. Wertzberger JJ, Peltier LF. Fat embolism: the effect of corticosteroids on experimental fat embolism in the rat. *Surgery* 1968;64:143-147.
14. Baker PL, Kuenzig MC, Peltier LF. Experimental fat embolism in dogs. *J Trauma* 1969;9:577-584.
15. Nery LE, Romaldini H, Bogossian M, Santos ML, Ratto OR. Influência dos corticosteróides na evolução da embolia pulmonar provocada pelo ácido oléico. Estudo experimental em cães. *Rev Brasil Med* 1979;36:6-23.
16. Luce JM, Robertson HT, Huang T, Colley PS, Granka R, Nessly ML, Cheney FW. The effects of expiratory positive airway pressure on the resolution of oleic acid induced lung injury in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1982;125:716-722.
17. Beilman G. Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. *Lipids* 1995;30:817-823.
18. Kreis WR, Lindenauer SM, Dent TL. Corticosteroids in experimental fat embolization. *J Surg Respir* 1973;14:238-246.
19. Parker FB, Wax SD, Kusajima K, Webb WR. Hemodynamic and pathological findings in experimental fat embolism. *Arch Surg* 1974;108:70-74.
20. Bogossian M, Santos ML, Furlaneto JA, Sasso WS, Ratto OR. Pathological alterations in pulmonary fat embolism caused by oleic acid. Experimental study in dogs. *Rev Brasil Pesq Med Biol* 1978;11:201-208.
21. Nery LE, Jardim JRB, Santos ML, Pacheco IP, Ratto OR. Influência da respiração com pressão positiva expiratória na evolução da embolia pulmonar provocada pelo ácido oléico. *Rev Assoc Med Brasil* 1979;25:279-287.
22. Bogossian M, Santos ML, Nery LE, Pacheco IP, Ratto OR. Alterações da ultra-estrutura pulmonar provocada pelo ácido oléico. *Rev Assoc Med Brasil* 1978;24:337-340.
23. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Cellular injury and cellular death. In: *Pathologic basis of disease*. 5th ed, Philadelphia: WB Saunders, 1994; 1-34.
24. Defaveri J, Tamanini J, Tonolli L, Franco M. Skin and pulmonary models using coated bentonite particles for the study of the inflammation evoked by *Paracoccidoides brasiliensis* antigens in previously immunized mice. *Sabouraudia* 1984;22:477-486.
25. Benoit PR, Hampson LG, Burgess JH. Value of arterial hypoxemia in the diagnosis of pulmonary fat embolism. *Ann Surg* 1972;175:128-137.
26. Ashbaugh DG, Uzawa J. Respiratory and hemodynamic changes after injection of free acids. *J Surg Respir* 1968;8:417-423.