ROBERTA **M**UNHOZ **M**ANZANO

Modelo de lesão pulmonar em coelhos prematuros: influência da idade gestacional e da concentração de oxigênio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Celso Moura Rebello

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Manzano, Roberta Munhoz
Modelo de lesão pulmonar em coelhos prematuros : influência da idade gestacional e da concentração de oxigênio / Roberta Munhoz Manzano. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.
Orientador: Celso Moura Rebello.

Descritores: 1.Displasia broncopulmonar 2.Hiperóxia 3.Lesão pulmonar 4.Coelho 5.Prematuro

USP/FM/DBD-264/11

Aos meus pais e minhas irmãs por todo amor, carinho, dedicação e por me apoiarem a vida inteira.

Ao meu marido pelo amor, carinho, incentivo, paciência e pelo companheirismo na profissão e na vida.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pela minha vida e por todas as pessoas maravilhosas que ele coloca na minha vida, minha família, meu marido, meus amigos, e por chegar até aqui.

Ao meu marido **André** pelo amor, carinho, dedicação, preocupação, por dividir sua vida comigo todos os dias, por tudo que me ensina, pelo ser - humano maravilhoso que é e principalmente por me apoiar em todas as minhas idéias. Companheiro é companheiro. À minha mãe **Rosângela** e meu pai **Beto**, pelo amor, dedicação, carinho, apoio, incentivo e torcida da vida inteira. Tenho muito orgulho de vocês. A minha irmã **Fernanda**, que se foi há muito tempo mas ainda faz parte da minha vida todos os dias. Com certeza sou uma pessoa muito melhor porque você fez parte da minha vida. A minha irmã **Flávia**, por todo amor e pela pessoa linda que é, muitas saudades de você cabeça. A vocês todo meu amor, carinho, admiração e respeito, vocês são minha vida.

Aos meus avós **Antônio** e **Mercedes**, **Diogo** (*in memorian*) e **Dirce** pelo exemplo de família, de amor, de honestidade e de oração, por cuidarem de mim e pelo exemplo de vida que são.

As minhas tias **Leila, Meire, Márcia e Rosimara** cada uma a sua maneira, pela ajuda, apoio, incentivo, torcida e por todas as orações.

Ás minhas amigas, **Ana Cristina e Karina** por me emprestarem suas casas, **Rafaela e Raquel** pelas longas conversas na madrugada, **Fernanda,**

Carine e Aline por dividirem a dança comigo. E a minha amiga **Janaína** pelas longas conversas sobre a vida e pela **Julia**, uma luz em nossas vidas.

À secretária do departamento de Pediatria **Adriana**, pela disposição e ajuda sempre.

Aos **coelhos** que deram suas vidas para que as pesquisas pudessem ser realizadas, todo o meu cuidado e respeito por suas vidas.

A todos do Laboratório de Pesquisa Experimental da Disciplina de Pediatria Neonatal do Departamento de Pediatria da FMUSP, **Luciana Haddad e Marcelo Santos,** pelo apoio, incentivo e ajuda na fase experimental, pelas conversas e risadas tomando café no laboratório e pelas madrugadas dando leite para os coelhos; **Dr. Alexander Precioso, Dra. Ana Margarita Reyes, e Aline Fernandes** pela grande ajuda na fase experimental deste estudo.

A **Valéria Carrer** pela ajuda na fase experimental e com as lâminas, pelas várias vezes que me pegou e me levou, por me emprestar sua casa, pelas conversas e por sua grande amizade, muito obrigada.

Sem vocês este trabalho não seria possível.

A **Dra. Renata Suman Mascaretti** pela ajuda na fase experimental, por tudo que me ensinou e me ajudou, pelo seu grande conhecimento sobre displasia broncopulmonar e pela excelente médica e pessoa que é. Todo meu carinho, admiração e respeito.

Ao meu querido orientador **Dr. Celso Moura Rebello**, que abriu as portas do laboratório pra mim, há muito tempo, um ser – humano maravilhoso, pessoa sábia e sensata que me ensinou e me ensina muito,

com certeza um exemplo a ser seguido. Pela paciência, compreensão, dedicação, por tudo que me ensinou e principalmente por ter confiado em mim. Todo meu carinho, admiração e respeito.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

A todos vocês, muitíssimo obrigada !!!

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 colher

tempo para matar e tempo para sarar

tempo para demolir e tempo para construir

tempo para chorar e tempo para sorrir

tempo para esperar e tempo para dançar

Eclesiastes 3

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. Displasia Broncopulmonar 15

1.2. Fases do Desenvolvimento Pulmonar 17

1.3. O Pulmão Prematuro 19

1.4. Lesão pelo Oxigênio 20

1.5. Modelos Experimentais de Exposição ao Oxigênio e Dano Pulmonar 22

2. OBJETIVOS 26

3. MATERIAL E MÉTODOS 28

3.1. Nascimento dos Animais 29

3.2. Randomização e Formação dos Grupos de Estudo 30

3.3. Protocolo de Experimentação 31

3.3.1. Manutenção dos Animais 31

3.3.2. Alimentação 32

3.3.3. Oxigenioterapia 34

3.3.4. Sacrifício dos Animais 35

3.4. Análise Histológica Pulmonar 35

3.4.1. Análise Morfométrica 36

3.4.1.1. Intercepto Linear Médio (Lm) 37

3.4.1.2. Área de Superfície Interna (ISA) 38

3.4.1.3. Número de Alvéolos 39

3.4.1.4. Espessamento Septal 39

3.4.2. Análise da Proporção de Fibras Elásticas e Colágenas 40

3.4.2.1. Proporção de Fibras Elásticas 40

3.4.2.2. Proporção de Fibras Colágenas 41

3.5. Variáveis de Interesse Estudadas 41

3.6. Análise Estatística 42

3.7. Desenho do Estudo 43

4. RESULTADOS 44

4.1. Sobrevida dos Animais 48

4.2. Análise Morfométrica Pulmonar 48

4.3. Proporção de Fibras Elásticas e Colágenas 54

5. DISCUSSÃO 61

5.1. A Escolha da Hiperoxia como Fator Agressor 62

5.2. A Espécie Animal 63

5.3. Sobrevida 67

5.4. Caracterização do Bloqueio do Desenvolvimento Alveolar 68

5.5. Considerações Finais 76

6. CONCLUSÕES 78

7. REFERÊNCIAS 80

Lista de Abreviaturas

DBP – Displasia Broncopulmonar

RNPT – Recém - nascido prematuro

RN – Recém - nascido

Lm – Intercepto Linear Médio

ISA – Área de Superfície Interna

O_2 – Oxigênio

CO_2 – Dióxido de Carbono

FiO_2 – Fração Inspirada de Oxigênio

Ar 28 – Grupo de estudo com 28 dias de gestação exposto ao ar ambiente

O_2 28 – Grupo de estudo com 28 dias de gestação exposto ao oxigênio ($FiO_2 \geq 95\%$)

Ar 29 – Grupo de estudo com 29 dias de gestação exposto ao ar ambiente

O_2 29 – Grupo de estudo com 29 dias de gestação exposto ao oxigênio ($FiO_2 = 80\%$)

Resumo

Manzano, RM. *Modelo de lesão pulmonar em coelhos prematuros: influência da idade gestacional e da concentração de oxigênio* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: A lesão pulmonar da "nova" displasia broncopulmonar se caracteriza por uma diminuição da septação alveolar e do desenvolvimento vascular, ocorre um bloqueio no desenvolvimento pulmonar e consequentemente uma diminuição da alveolarização. A lesão pulmonar ocorre devido à associação de diversos fatores, incluindo a prematuridade, defesas antioxidantes inadequadas, e a ativação da resposta inflamatória. A exposição prolongada ao oxigênio também resulta em anormalidades na formação e na morfologia dos alvéolos, com redução tanto do volume pulmonar como da área de superfície interna alveolar. O objetivo do presente estudo foi comparar dois modelos de indução de lesão pulmonar através da exposição à hiperoxia prolongada em coelhos. MÉTODOS: Coelhas grávidas da raça New-Zealand-White foram sedadas para realização do parto cesáreo no 28º dia de gestação (termo = 31dias), coelhos prematuros foram expostos ao ar ambiente ou $FiO_2 \geq 95\%$. Outro grupo nasceu no 29º dia de gestação e foi exposto ao ar ambiente ou a uma $FiO_2=80\%$. Os animais foram mantidos em incubadora com controle de temperatura e alimentação e uma fórmula especial de leite similar ao leite de coelha por 11 dias. Desta forma, foram constituídos quatro grupos de estudo: Ar ambiente com 28 dias de gestação (Ar 28); exposição ao oxigênio ($FiO_2 \geq 95\%$) com 28 dias de gestação (O_2 28); ar ambiente com 29 dias de gestação (Ar 29); exposição ao oxigênio ($FiO_2 = 80\%$) com 29 dias de gestação (O_2 29). Após o sacrifício os pulmões foram fixados com 30 cmH_2O de pressão transtraqueal. As lâminas do tecido pulmonar foram submetidas às seguintes colorações: hematoxilina e eosina – para análise morfométrica; Weigert, resorcina-orceína modificado para a análise das fibras elásticas e Picrosirius – para análise do colágeno. Foi realizada a contagem do Intercepto Linear Médio (Lm), determinada a Área de Superfície Interna (ISA), o número de alvéolos por campo microscópico, o espessamento septal e a proporção de fibras elásticas e colágenas. Análise Estatística: As variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA One Way e a análise da sobrevida foi realizada através de uma curva de Kaplan-Meyer. O nível de significância adotado foi de 0.05. RESULTADOS: A sobrevida nos grupos de 29 dias foi melhor quando comparados com o grupo 28 dias. A hiperoxia bloqueou o desenvolvimento normal do pulmão, demonstrado por um aumento no Lm, uma diminuição significativa na ISA, uma diminuição no número de alvéolos, um aumento na espessura do septo interalveolar e também um aumento na proporção de fibras elásticas e uma diminuição na proporção de fibras colágenas nos dois grupos de animais expostos ao oxigênio em relação aos grupos que permaneceram em ar ambiente. CONCLUSÕES: Em coelhos prematuros o uso de uma concentração de

oxigênio menor e um dia a mais de gestação reduziu a taxa de mortalidade mantendo os achados histopatológicos compatíveis aos da displasia broncopulmonar em humanos.

Descritores: Displasia Broncopulmonar, hiperóxia, lesão pulmonar, coelho, prematuro

Abstract

Manzano, RM. *Model of lung injury in premature rabbits: influence of gestational age and oxygen concentration* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUCTION: The lung injury of the "new" bronchopulmonary dysplasia is characterized by a decrease in alveolar septation and vascular development, resulting in a pulmonary arrest and a decrease in alveolarization. Lung damage occurs due to the association of many factors, including prematurity, inadequate antioxidant defenses and activation of the inflammatory response. Prolonged exposure to oxygen also results in abnormalities in the formation and morphology of the alveoli, with reduced lung volume and alveolar internal surface area. The aim of this study was to compare two models of lung injury induced by prolonged exposure to hyperoxia in rabbits. METHODS: New Zealand-White pregnant rabbits were sedated to perform a cesarean section on day 28 of gestation (term = 31days), premature rabbits were exposed to room air or $FiO_2 \geq 95\%$. Another group of animals was born at day 29 of gestation and was exposed to room air or $FiO_2=80\%$. The animals were kept in an incubator with temperature control and fed with a special milk formula similar to rabbit milk for 11 days. Four study groups were formed: Room air and 28 days of gestation (Air 28); exposure to oxygen ($FiO_2 \geq 95\%$) and 28 days of gestation (O_2 28); room air and 29 days of gestation (Air 29); exposure to oxygen ($FiO_2=80\%$) and 29 days of gestation (O_2 29). For microscopic evaluation, after sacrifice the lungs were fixed in situ at a constant inflation pressure of 30 cm H_20. Lung slices were processed for hematoxylin-eosin staining - for morphometric analysis, Weigert's resorcin-orcein modified for the analysis of elastic fibers and Picrosirius - for analysis of collagen. The mean linear intercept (Lm), the internal surface area (ISA), the number of alveoli, the septal thickness and the proportion of elastic and collagen fibers were quantified. Statistical analysis was by One Way ANOVA for continuous variables, survival analysis was performed using a Kaplan-Meyer plot. The level of significance was 0.05. RESULTS: Survival in both 29 days groups was better when compared with 28 days groups. Hyperoxia impaired the normal development of the lung, demonstrated by an increase in Lm, a significant decrease in ISA, a decrease in the alveoli number, an increase in the septal thickness and an increase in the proportion of fibers elastic and a decrease in the proportion of collagen fibers in oxygen exposed animals. CONCLUSIONS: In premature rabbits using a lower concentration of oxygen and one more day of gestation reduced the mortality rate maintaining the histopathological findings similar to bronchopulmonary dysplasia in humans.

Keywords: Bronchopulmonary dysplasia, hyperoxia, Lung injury, rabbits, premature

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Displasia Broncopulmonar

A displasia broncopulmonar (DBP) é uma das complicações mais comuns associadas ao nascimento prematuro. Foi inicialmente descrita como uma lesão pulmonar em recém-nascidos prematuros (RNPT) submetidos a altas concentrações de oxigênio e à ventilação mecânica agressiva. A lesão pulmonar, nesta época, foi descrita como secundária ao processo de lesão e reparação tecidual, apresentando edema alveolar intersticial precoce, fibrose, e inflamação das vias aérea (Northway et al., 1967). Na descrição original de Northway, os prematuros tinham aproximadamente 34 semanas de gestação e necessitavam de ventilação mecânica e suporte de oxigênio por mais de 28 dias de vida, associado a uma imagem radiológica típica, com alterações císticas e áreas hiperinsufladas (Sweet et al., 2002; Parker e Abman, 2003).

Apesar dos avanços significativos ocorridos nos cuidados intensivos neonatais nas últimas décadas, como a utilização de corticosteroides no período pré-natal, a administração de surfactante, que minimizou a severidade da lesão pulmonar em prematuros, o uso de estratégias protetoras de ventilação mecânica e a melhora da nutrição (Rebello et al., 2002; Speer, 2003; Mataloun et al., 2005), observou-se um aumento na

incidência da DBP em decorrência da maior sobrevida de prematuros cada vez mais extremos (Hack e Fanaroff, 1999; Bancalari et al., 2003; Deakins, 2009). A incidência da DBP é variável, ficando em torno de 20% nos prematuros que necessitam de ventilação mecânica. Em prematuros com peso de nascimento entre 750-1000 g ela atinge 63% e aumenta com a diminuição da idade gestacional e do peso de nascimento, chegando a 85% nos bebês com menos de 750g (Sweet et al., 2002; Jobe, 2003).

O perfil dos recém-nascidos com DBP modificou-se em relação à descrição inicial (Northway et al., 1967). Atualmente a doença ocorre predominantemente entre recém - nascidos (RN) com peso de nascimento inferior a 1000 g e idade gestacional entre 24 e 26 semanas (Bancalari et al., 2003; Coalson, 2003; Parker e Abman, 2003; Thompson e Bhandari, 2008).

Esta mudança de perfil de recém-nascidos com DBP assim como a mudança em sua apresentação clínica resultou na criação do termo “nova” displasia broncopulmonar (Jobe e Bancalari, 2001).

A lesão pulmonar desta “nova” DBP se caracteriza por uma diminuição da septação alveolar e do desenvolvimento vascular, ou seja, ocorre um bloqueio no desenvolvimento pulmonar e consequentemente uma diminuição da alveolarização (Bancalari et al., 2003; Parker e Abman, 2003; Suguihara e Lessa, 2005; Mataloun et al., 2006; Chess et al., 2006; Mascaretti et al., 2009; Haaften et al., 2009; Deakins, 2009 e Vadivel et al., 2010).

A DBP é uma doença multifatorial que leva a diversas alterações histopatológicas no pulmão prematuro. Sua patogênese inclui

prematuridade, ventilação mecânica, defesas antioxidantes inadequadas, ativação da resposta inflamatória por vários mecanismos, sendo que a exposição ao oxigênio é um dos fatores mais importantes (Russell, 1994; Auten et al., 2001; Saugstad, 2003; Saugstad, 2010), incluindo também infecções pré-natais e nosocomiais e a persistência de canal arterial (Speer, 2003).

A resposta inflamatória na DBP é caracterizada por um acúmulo de neutrófilos, macrófagos e de mediadores pró-inflamatórios no tecido pulmonar (Speer, 2003).

Em geral, um desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios podem afetar consideravelmente a alveolização normal e o desenvolvimento vascular pulmonar em prematuros com DBP (Parker e Abman, 2003; Speer, 2003). Atrasos ou alterações no crescimento pulmonar normal resultam em anormalidades arquitetônicas permanentes no desenvolvimento alveolar (Warner et al., 1998; Auten et al., 2001; Bhandari e Bhandari, 2003; Deakins, 2009; Saugstad, 2010).

1.2. Fases do Desenvolvimento Pulmonar

O desenvolvimento pulmonar humano é dividido em cinco fases: embrionária, pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (Jobe, 2002; Coalson, 2003). A fase embrionária começa com o início da gestação e se estende até a sétima semana de vida intrauterina. Nesta fase do desenvolvimento pulmonar a traquéia e o esôfago se separam

(aproximadamente com seis semanas de gestação) e os dois pulmões se distinguem como órgãos separados dentro do tórax. Ocorre a formação dos brônquios, das artérias pulmonares a partir do 6º par de arcos aórticos e a formação das veias pulmonares a partir do átrio esquerdo (Hislop, 2002; Haworth e Hislop, 2003).

Na fase pseudoglandular (5-17 semanas) ocorre o desenvolvimento arterial pulmonar paralelo à ramificação da via aérea, a formação de túbulos acinares na periferia, a diferenciação de algumas células, aparecem os linfáticos pulmonares, acontece o desenvolvimento de cartilagem, das glândulas mucosas e do músculo liso, e também o fechamento da cavidade pleuro-peritoneal. Com 16 semanas há a formação completa da árvore traqueobrônquica (Hislop, 2002; Haworth e Hislop, 2003).

Durante a fase canalicular (16-27 semanas) as células periféricas dos sáculos distais transformam-se em células cuboidais e ocorre a diferenciação do epitélio bronquiolar. As vias aéreas são formadas com 20 semanas de gestação em humanos. Entre 23 e 24 semanas o epitélio fica mais delgado na periferia do pulmão com capilares subjacentes, levando à formação de uma barreira sangue-gás suficiente para sustentar a vida em prematuros extremos (Jobe, 2002; Hislop, 2002; Haworth e Hislop, 2003). Os músculos das vias aéreas de condução estão presentes com 23 semanas de gestação. Com 25 semanas de gestação há uma quantidade de músculo nas vias aéreas semelhantes aos RN a termo (Sward-Comunelli et al., 1997).

No início da fase sacular que se estende de 26-28 semanas a 32-36 semanas de gestação continua o crescimento das vias aéreas distais que crescem e se ramificam, ocorrendo a formação dos sáculos alveolares. As vias de condução desenvolvem células mucosas e ciliadas, as paredes dos septos passam a conter capilares duplos que vão se aproximando das células do tipo I, nesta fase também ocorre o início da deposição de elastina. Ente 28 e 32 semanas as cristas são alongadas para produzir alvéolos primitivos que, neste momento, tem um fornecimento de dois capilares com tecido mesenquimal entre as duas camadas de células epiteliais (Coalson, 2003).

A fase alveolar vai de 32-36 semanas de gestação até dois anos de idade. Ocorre um aumento das cristas secundárias, aumento da complexidade acinar e fusão dos capilares para formar alvéolos. O número de alvéolos aumenta com a idade gestacional. A criança a termo tem cerca de 150 milhões de alvéolos, entre um terço e metade do número de alvéolos nos adultos. A área de superfície alveolar aumenta e mostra uma relação linear com a idade e peso corporal (Jobe, 2002; Coalson, 2003).

O crescimento no número de alvéolos continua após o nascimento e o número de alvéolos do adulto é alcançado entre 2 e 3 anos de idade. O tamanho do alvéolo e a área de superfície alveolar continuam a crescer até a adolescência (Haworth e Hislop, 2003).

1.3. O Pulmão Prematuro

O pulmão de crianças prematuras é diferente tanto do pulmão das crianças a termo como do pulmão adulto, porque ele está submetido a um crescimento e desenvolvimento rápidos, que normalmente acontece intra-útero. Alguns relatos sugerem que a exposição ao oxigênio causa alteração na secreção de fatores de crescimento pulmonar, contribuindo assim para a fisiopatologia da DBP. A exposição ao oxigênio também causa hiperplasia das células neuroedócrinas pulmonares. Como consequência da alteração dos fatores de crescimento pulmonar pela hiperoxia, o desenvolvimento vascular pulmonar é interrompido e toda a síntese de DNA, um marcador de crescimento, é significativamente reduzido (Weinberger et al., 2002).

Também foi relatado que crianças prematuras com doença pulmonar crônica com idade pós-natal de 9 a 29 dias apresentam aumento da musculatura das vias aéreas maiores que 1500 µm (Sward-Comunelli et al., 1997).

1.4. Lesão pelo Oxigênio

Scheele e Priestly descobriram o oxigênio em 1772 e 1774, respectivamente. Logo após sua descoberta o oxigênio foi utilizado com finalidades medicinais. Em 1780 France´s Chaussier experimentou dar oxigênio para crianças recém-nascidas que apresentaram insuficiência respiratória. Em 1928 Flagg descreveu um procedimento detalhado para intubação e insuflação por pressão positiva intermitente usando uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono para ressucitação de recém-nascidos

asfixiados. A oxigenioterapia em crianças recém-nascidas foi introduzida nas décadas de 30 e 40 nos Estados Unidos, no entanto, em 1917 já havia sido recomendada a prática de administração de oxigênio intragástrica, uma prática que continuou por um longo período, até os anos 50. Nas décadas de 1950 e 1960 o uso de elevadas concentrações de oxigênio em incubadoras resultou em um aumento na incidência de retinopatia da prematuridade. Nos anos 70 os eletrodos transcutâneos foram introduzidos, primeiro o eletrodo para a mensuração do oxigênio transcutâneo e, em seguida, para a mensuração do dióxido de carbono. O oxímetro de pulso foi introduzido nas unidades de terapia intensiva neonatais na década de 80 (Saugstad, 2001).

O oxigênio é essencial para a vida celular, no entanto, quando administrado em doses excessivas durante terapia e/ou em pacientes com defesas antioxidantes prejudicadas, como os prematuros, o oxigênio pode causar lesão tecidual. Os recém-nascidos prematuros são mais susceptíveis ao estresse oxidativo por várias razões. Primeiramente, eles são frequentemente expostos ao oxigênio após o nascimento em decorrência de sua imaturidade pulmonar estrutural e funcional. A toxicidade direta induzida pela reação acentuada aos radicais livres derivados do oxigênio desencadeia um processo inflamatório que é comum nos pulmões prematuros, resultando em lesão das vias aéreas, no epitélio alveolar e no endotélio capilar, que resulta em edema intersticial e alveolar, acarretando na inativação do surfactante. O estresse oxidativo também é agravado pelo grande afluxo de neutrófilos no tecido pulmonar após o nascimento. Finalmente, os prematuros têm uma defesa antioxidante inadequada, com

uma habilidade deficiente para produzir enzimas antioxidantes nos períodos de toxicidade pelo oxigênio. A toxicidade indireta das respostas fisiológicas inadequadas ao oxigênio é caracterizada pela proliferação de células alveolares tipo II, e após exposição prolongada, fibrose intersticial (Saugstad, 1998; Weinberger et al., 2002).

O efeito deletério da hiperoxia sobre o tecido pulmonar é dose dependente, sendo diretamente proporcional à concentração de oxigênio fornecida e ao tempo de exposição. O grau da lesão também apresenta relação inversa com a idade gestacional em que ocorre a exposição (Bucher e Robert, 1981).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a toxicidade pelo oxigênio é um dos fatores mais importantes envolvidos na fisiopatologia da displasia broncopulmonar (Bonikos et al., 1976; Crapo et al., 1980; Gerdin et al., 1985; Frank e Sosenko, 1987; Hayashibe et al., 1990; Frank e Sosenko, 1991; Russel, 1994; Saugstad, 2003; Saugstad, 2010).

1.5. Modelos Experimentais de Exposição ao Oxigênio e Dano Pulmonar

Alguns modelos de animais foram utilizados para o estudo da DBP, como primatas (Escobedo et al., 1982; Coalson et al., 1999; Altiok et al., 2006), cordeiros (Pierce et al., 1997; Albertine et al., 1999) e ratos (Bucher e Robert, 1981; Gerdin et al., 1985; Bruce et al., 1989; Hayashibe et al., 1990; Chen et al., 1997; Warner et al., 1998; Auten et al., 2001; Choi et al., 2009; Johnson et al., 2009; Klebe et al., 2010). Devido à etiopatogênese

multifatorial da DBP, os modelos animais para o estudo da doença podem utilizar um único fator de lesão pulmonar ou uma associação de fatores, incluindo a imaturidade pulmonar, o barotrauma, o volutrauma, a infecção pré-natal e a exposição ao oxigênio.

O uso do coelho prematuro como modelo animal para estudar os efeitos da hiperoxia sobre o pulmão em desenvolvimento foram limitados a extratos de culturas de pulmão ou macrófagos submetidos à hiperoxia ou a manutenção dos animais após o nascimento por períodos curtos de tempo, de 20 horas a quatro dias (Frank e Sosenko, 1991; Shah et al., 1997; Issa et al., 1999; Kovar et al., 2002; Rozycki et al., 2004). Guen et al. (2008), estudou coelhos prematuros durante oito dias porém utilizou a infecção pré-natal como método para indução da lesão pulmonar. Os estudos em que coelhos prematuros foram submetidos a longos períodos de exposição a altas concentrações de oxigênio foram realizados em nosso meio, utilizando-se animais de 28 dias de gestação expostos a uma $FiO_2 \geq 95\%$. No entanto, nestes estudos a taxa de mortalidade foi elevada (Mascaretti 2004; Mataloun et al., 2006).

Existem várias linhas de pesquisa associada à DBP utilizando modelos experimentais (Warner et al., 1998). Frank e Sosenko (1987), foram os primeiros a demonstrar que o sistema de defesa antioxidante do pulmão se desenvolve mais tarde na gestação. Eles demonstraram em modelos experimentais com fetos de ratos e de coelhos que há um avanço na produção de antioxidante logo após o nascimento a termo, sendo que estes animais podiam aumentar a produção de enzimas antioxidantes em resposta

à hiperoxia. Por outro lado, coelhos prematuros não só apresentaram níveis mais baixos de enzimas antioxidantes como também não aumentaram a sua produção em resposta à hiperoxia (Frank e Sosenko, 1991 e Sweet et al., 2002).

Hallman e Haataja (2003) descreveram em seu estudo que o pulmão pode ser afetada por uma mutação recessiva da proteína B do surfactante pulmonar (SP-B) e uma mutação dominante associada com a proteína C (SP-C). Doenças pulmonares adquiridas, particularmente a DBP, são consideradas doenças multifatoriais com provável envolvimento genético. Bracci (1997), relatou que os lipídeos e as proteínas do surfactante também podem sofrer oxidação e perder sua efetividade na redução da tensão superficial.

Diversos fatores de crescimento são conhecidos, tais como insulina-like (IGF), epidérmico (EGF), derivado de plaquetas (PDGF) e endotelial vascular (Flt-1 e Flt-2), assim como a sua suscetibilidade ao oxigênio e à modulação do desenvolvimento pulmonar (Jankov e Tanswell, 2004).

A resposta inflamatória na DBP é caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos e macrófagos na luz alveolar e no interstício pulmonar, bem como por um arsenal de mediadores pró-inflamatórios. Este acúmulo anormal de, citocinas pró-inflamatórias, radicais livres e proteases são responsáveis pela lesão pulmonar aguda. O fator de crescimento beta (TGFβ) limita algumas reações inflamatórias e desencadeia mediadores de reparo e remodelação celular (Speer, 2003). A interação entre o fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF-1) e o crescimento pulmonar foram estudados através da exposição

dos pulmões a uma concentração de oxigênio de 95%, os autores concluíram que a administração de FGF-1 levou ao crescimento pulmonar compensatório após um estímulo hiperóxico (Jankov et al., 2003).

Ainda em relação a modelos experimentais de exposição ao oxigênio e dano pulmonar, foi demonstrado que as matrix metalloproteinases (MMPs uma família de enzimas que tem função de manter a homeostase da matrix extracelular), são parte integral tanto do dano precoce como do processo de reparo anormal na doença pulmonar crônica, após exposição ao oxigênio. Também foram demonstrados níveis elevados de MMP-8 e MMP-9 em recém-nascidos prematuros com diagnóstico de corioaminionite, assim como níveis elevados de MMP-9 em pulmão de fetos de ovelha com corioaminionite (Sweet et al., 2002).

A restrição nutricional também foi estudada em coelhos prematuros submetidos à hiperoxia e estes fatores associados intensificaram as mudanças na arquitetura pulmonar causadas pela hiperoxia, em particular as alterações relacionadas à alveolização e deposição de colágeno (Mataloun et al., 2006). A suplementação de nutrientes específicos, como o retinol, foi estudada com relação ao bloqueio no desenvolvimento pulmonar e deposição de elastina (Bland et al., 2003).

Mesmo com tantas áreas de pesquisa ainda restam várias lacunas em relação à fisiopatologia e ao tratamento da DBP. Desta forma, os modelos experimentais da DBP são ferramentas essenciais para um entendimento mais aprofundado desta doença (Haalman e Haataja, 2003).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Geral:

- Comparar dois modelos de indução de lesão pulmonar através da exposição à hiperoxia prolongada em coelhos prematuros.

Específico:

- Comparar os efeitos de dois modelos de indução de lesão pulmonar induzida pela exposição prolongada ao oxigênio e idade gestacional de 28 dias com $FiO_2 \geq 95\%$ ou idade gestacional de 29 dias e $FiO_2 = 80\%$) sobre:
    - A sobrevida dos animais;
    - A morfometria pulmonar, incluindo o intercepto linear médio (Lm), a área de superfície interna (ISA), o número total de alvéolos e a espessura do septo alveolar;
    - A proporção de fibras elásticas e colágenas no interstício pulmonar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de experimentação foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq - projeto número 487/07).

A fase de experimentação animal foi realizada no Laboratório de Pesquisa Experimental da Disciplina de Pediatria Neonatal do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A análise histopatológica foi orientada e supervisionada pelo Departamento de Patologia da FMUSP.

3.1. Nascimento dos Animais

Coelhas grávidas da raça New-Zealand-White (Benjamin Fleder® – Mogi das Cruzes, São Paulo), foram sedadas para a realização do parto cesáreo no 29º dia de gestação (termo = 31dias), com ketamina (10 mg/kg - IM) e acepromazina (0,1 mg/kg - IM) seguido da realização de raquianestesia com solução de marcaína-xylocaína a 2% (1:1; vol:vol). A confirmação da gestação foi obtida através do cruzamento em datas programadas, quando duas fêmeas foram colocadas durante um período de

4 horas com um macho, sendo em seguida mantidas em gaiolas individuais até a confirmação da gestação por palpação abdominal.

Após a abertura da parede abdominal e do útero, os fetos foram removidos de acordo com a sua localização nos cornos uterinos (proximal e distal) e, obedecendo à ordem de retirada, foram identificados com caneta marcadora na região dorsal utilizando-se números sequenciais, a fim de minimizar o efeito da posição uterina sobre o peso de nascimento (Karnak et al., 1999). Foram excluídos os óbitos fetais, os coelhos com malformações congênitas grosseiras e com peso de nascimento menor ou igual a 25 gramas. Os menores de 25 g foram excluídos devido à alta mortalidade apresentada no estudo anterior observada nesta faixa de peso (Mascaretti, 2004). Em seguida os animais foram secados, pesados e permaneceram durante um período de adaptação sob estimulação táctil por 30 minutos sobre colchão térmico e sob calor radiante, em baixa concentração de O_2.

3.2. Randomização e Formação dos Grupos de Estudo

Imediatamente após o nascimento os recém-nascidos foram randomizados entre os grupos de estudo de acordo com a ordem de nascimento. Nas diversas ninhadas (filhotes de diferentes fêmeas), foram também alternados os primeiros filhotes entre os grupos de estudo: animais expostos à hiperoxia ou submetidos ao ar ambiente. Os animais foram inicialmente observados imediatamente após o nascimento em relação à

sobrevivência e, após este período, foram colocados dentro das respectivas incubadoras (com exposição ao oxigênio ou ao ar ambiente).

Os resultados foram comparados com os dados obtidos em um projeto de pesquisa realizado anteriormente, em que foram estudados animais nascidos com 28 dias de gestação e expostos a uma concentração de oxigênio $\geq$ 95% ou ar ambiente, utilizando-se exatamente a mesma técnica de manipulação, incluindo alimentação, temperatura, controle de peso, uso de antibióticos e de vitamina K, (Mascaretti, 2004). Desta forma, foram constituídos quatro grupos de estudo: 28 dias de gestação expostos ao ar ambiente (Ar 28); 28 dias de gestação com exposição ao oxigênio em concentração ≥ 95% (O_2 28); 29 dias de gestação expostos ao ar ambiente (Ar 29); 29 dias de gestação com exposição ao oxigênio em concentração igual a 80% (O_2 29). Embora realizados em momentos diferentes, todos os procedimentos realizados nos quatro grupos de estudo seguiram exatamente a mesma técnica de manipulação.

3.3. Protocolo de Experimentação

3.3.1. Manutenção dos Animais

Os animais foram mantidos em incubadoras para prematuros (C-86, Fanem LTDA®, São Paulo, Brasil), em bandejas revestidas com serragem de flocos finos autoclavada (maravalha estéril), sendo realizadas duas trocas por dia, com a finalidade de manter os animais em ambiente seco e limpo. A

temperatura no interior da incubadora foi mantida constante entre 30 e 32°C, controlada através de termômetro eletrônico. O peso dos animais foi controlado diariamente, antes da primeira alimentação do dia (balança TR 403, Denver Instrument Company®, Estados Unidos).

A partir do terceiro dia de vida foi iniciada antibioticoterapia profilática (Shah et al., 1997) com penicilina cristalina (20.000 UI/kg - IM) e estreptomicina (20 mg/kg.dia – IM) uma vez ao dia, associado à administração de vitamina K (0,002 mg/kg/dia - IM) com o objetivo de prevenir quadros hemorrágicos.

3.3.2. Alimentação

Os animais foram alimentados com fórmula láctea semelhante ao leite natural de coelha (Sogorb et al., 1991), constituída por 5 g de Neocate (Support®), 5 g de caseical (Support®) e 15 g de trigiceril CM AGE (Support®) para 100 ml de leite. A partir do terceiro dia de vida foi adicionado à fórmula uma gota de complexo vitamínico Vitanove®. A composição da dieta é resumida no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição média da dieta de manutenção e do leite de coelha (por 100ml de fórmula reconstituída)

	Dieta de Manutenção	Leite de Coelha
Proteínas (g)	5,3	10,7 – 15,0
Aminoácidos livres/caseína	12 / 88	-
Gorduras (g)	16,2	10,8 – 14,9
Gordura láctea (%)	8	-
Lecitina de soja (%)	1	-
Óleo de milho (%)	21	-
TCM (%)	70	-
Glicídeos (g)	2,8	1,8
Dextrino-maltose (%)	100	0
Lactose (%)	0	100
Sódio (mg)	8,5	-
Potássio (mg)	30	-
Cálcio (mg)	24	-
Fósforo (mg)	15	-
Vitamina A (UI)	115	-
Cobre (mg)	0,015	-
Energia (kcal)	155	150 – 200

O volume administrado de dieta no primeiro dia de vida foi de 100 ml/kg, no segundo dia foi de 150 ml/kg e do terceiro ao décimo - primeiro dia de vida foi administrado um volume de 200 ml/kg.

O leite foi preparado diariamente, aquecido em banho-maria a uma temperatura de 37 °C e administrado duas vezes ao dia de maneira lenta e cuidadosa, utilizando-se sonda orogástrica nº 4, adaptada a uma seringa de 3 ml graduada em intervalos de 0,1 ml. A primeira alimentação ocorreu a partir da quarta hora de vida.

Durante o processo de alimentação foram adotadas regras rigorosas de assepsia, incluindo a utilização de luvas de látex para a manipulação tanto dos animais como das sondas gástricas, as quais eram limpas com gaze embebida em álcool 70% seguido de água destilada autoclavada, após a utilização em cada animal.

3.3.3. Oxigenioterapia

Com o auxílio de nebulizadores neonatais (Intermed®, São Paulo, Brasil), oxigênio aquecido e umidificado foi fornecido em uma concentração de 80% para os animais do grupo O_2 29, e em uma concentração ≥ 95% para os animais do grupo O_2 28, através de uma câmara de acrílico selada e multiperfurada para evitar acúmulo de dióxido de carbono (CO_2). O controle da concentração de O_2 foi realizado através de analisador de oxigênio ambiente (Dixtal®, São Paulo, Brasil).

3.3.4. Sacrifício dos Animais

Os animais foram sacrificados por secção da aorta abdominal, após sedação profunda com pentobarbital (25 mg/kg - intraperitoneal) no 11º dia após o nascimento**.** A opção por esta técnica de sacrifício se deu para evitar a hemorragia pulmonar, que poderia prejudicar a leitura das lâminas na análise histológica pulmonar.

3.4. Análise Histológica Pulmonar

Para a análise histológica pulmonar, imediatamente após o sacrifício foi realizada traqueostomia com passagem de uma cânula de metal de 1 mm de diâmetro. Os pulmões foram inflados a uma pressão de 30 cmH_20 (Hislop et al., 1986; Lum e Mitzner, 1987) e a traquéia foi ligada com fio de algodão 0-0, seguindo-se da dissecção e retirada dos pulmões, que foram removidos em monobloco junto com o coração e mergulhados em formol tamponado a 10% durante um período mínimo de 24 horas. Após este período o coração foi removido, os pulmões foram pesados em balança analítica (TR 403, Denver Instrument Company®, Estados Unidos) e o seu volume foi medido através da técnica do deslocamento de água (Scherle, 1970). Para este fim foi utilizada uma seringa de vidro de 30 ml, conectada através de um tubo flexível a uma pipeta graduada de 2 ml com intervalos de 0,01 ml (Bruce et al., 1989).

3.4.1. Análise Morfométrica

Foram obtidos cortes sagitais de 1 mm de espessura da porção distal do lobo inferior direito de maneira sistemática e padronizada. O lobo inferior direito foi destinado à análise histopatológica tanto por apresentar maiores dimensões nesta espécie e também devido ao amadurecimento histológico mais tardio em relação às outras áreas do tecido pulmonar (Kikkawa et al., 1971; Coalson et al., 1995).

Os pulmões foram conservados em álcool etílico a 70% até seu embebimento em parafina, seguido do processamento em cortes seriados de 5 μm de espessura e confecções de lâminas, as quais foram submetidas às colorações de hematoxilina-eosina para análise morfométrica, weigert resorcina-orceína modificado para a análise das fibras elásticas e picrosirius para análise das fibras colágenas.

Os blocos de lâminas dos grupos Ar 28 e O_2 28 foram recuperados e os blocos dos quatro grupos de estudo (Ar 28; O_2 28; Ar 29 e O_2 29) foram cortados e corados simultaneamente (utilizando-se hematoxilina-eosina, resorcina-orceína e picrosirius) com o objetivo de evitar qualquer diferença nas técnicas de coloração que pudesse interferir na leitura dos resultados.

Para a análise morfométrica foi utilizado o microscópio Nikkon E600, acoplado a uma grade de 100 pontos e 50 retas de área, sendo examinados um mínimo de 10 campos microscópicos por animal no aumento de 100x. A

análise morfométrica das lâminas dos quatro grupos de estudo foi realizada de maneira cega por dois investigadores.

O desenvolvimento pulmonar foi avaliado através da determinação do intercepto linear médio (Lm), da Área de Superfície Interna (ISA), do número de alvéolos, do espessamento do septo interalveolar e da proporção das fibras elásticas e colágenas.

Dos dados obtidos no projeto de pesquisa realizado anteriormente (Mascaretti, 2004), foram utilizados neste projeto de pesquisa, apenas as informações relativas à sobrevida dos animais e aos volumes pulmonares. Todas as avaliações histopatológicas dos grupos Ar 28 e O_2 28 foram realizadas após novo corte dos blocos de parafina, novo preparo das lâminas e novas colorações (realizadas simultaneamente nos quatro grupos de estudo), sendo que e o mesmo examinador realizou as análises nos quatro grupos de estudo.

O Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo orientou e supervisionou todo o processo de preparo e análise das lâminas, sob orientação da Profª Dra. Thaís Mauad, do Prof° Dr. Luis Fernando Ferraz da Silva e da Dra. Tatiana Lanças.

3.4.1.1. Intercepto Linear Médio (Lm)

O intercepto linear médio (Lm) reflete o tamanho alveolar e a insuflação pulmonar, por representar a distância entre as paredes alveolares. Quanto maior o Lm mais distantes as paredes alveolares estão

entre si, seja por dimensões alveolares maiores ou devido ao espessamento da membrana alvéolo-capilar. Seu cálculo foi baseado em um método desenvolvido por Dunnil em 1962, para encontrar a área de superfície de pequenos objetos através de sua área de projeção (Dunnil, 1962).

Utilizando-se uma grade composta por 100 pontos e 50 retas, e considerando-se como intercepto o cruzamento da linha de cada uma das 50 retas da grade com uma parede alveolar, o intercepto linear médio foi calculado através da fórmula: Lm = comprimento total das retas/ número de interceptos alveolares.

3.4.1.2. Área de Superfície Interna (ISA)

O cálculo da ISA representa a superfície de troca gasosa e foi realizado segundo a fórmula, **ISA = 4V/Lm**, onde V = volume pulmão fixado sob pressão transtraqueal de 30 cmH_2O multiplicado pela fração de parênquima (Thurlbeck, 1967). A fração de parênquima foi calculada utilizando-se a mesma grade, onde foram contados os pontos que caíram sobre o tecido pulmonar, excluindo-se os que caíram sobre vasos sanguíneos e brônquios maiores do que 2 mm de diâmetro. O número de pontos foi dividido por 100. Para isto foi utilizada a fórmula: **V = (volume pulmonar total x média do número de pontos)/100**.

3.4.1.3. Número de Alvéolos

A contagem do número total de alvéolos foi realizada utilizando-se o analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um investigador. Em cortes pulmonares corados com hematoxilina-eosina, fotografados em aumento de 100x, foram utilizados 10 campos (fotos) por lâmina.

Ao iniciar o programa o arquivo com a foto a ser analisada era carregado, a foto calibrada no aumento de 100x, a ferramenta *Irregular AOI* era selecionada e, em cada campo, os alvéolos foram selecionados um a um e contados manualmente.

3.4.1.4. Espessamento Septal

A medida da espessura do septo interalveolar foi realizada manualmente com auxílio do analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um investigador. Foi utilizada uma lâmina por animal corada com picrosirius sendo realizadas 4 fotografias por lâmina em aumento de 200x, avaliando-se de 4 a 8 septos por foto.

Ao iniciar o programa o arquivo com a foto a ser analisada era carregado, cada foto foi calibrada no aumento de 200x, e foi selecionado a ferramenta do programa *manual measurements*, dentro desta ferramenta foi selecionado a ferramenta *create click and drag line feature,* com esta

ferramenta foi medido manualmente cada septo interalveolar até totalizar de 4 a 8 septos por foto. Nos pulmões com maior homogeneidade do septo interalveolar foram avaliados quatro septos por foto, nos pulmões que apresentavam maior heterogeneidade do septo interalveolar foram avaliados oito septos por foto.

3.4.2. Análise da Proporção de Fibras Elásticas e Colágenas

3.4.2.1. Proporção de Fibras Elásticas

A avaliação da proporção das fibras elásticas no tecido pulmonar foi realizada utilizando-se o analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um único investigador. Em cortes pulmonares corados com ressorcína-orceína, fotografados em aumento de 200x, sendo utilizados 20 campos (fotos) em cada lâmina.

Ao iniciar o programa, o arquivo com a foto a ser analisada foi carregado e a imagem foi calibrada sob um aumento de 200x. A ferramenta do programa *Rectangular* AO*I* foi selecionada e, através dela, foi calculada a área total da fotografia, a área correspondente ao espaço aéreo, a área correspondente ao total do parênquima pulmonar (área total menos área do espaço aéreo), e a área correspondente às fibras elásticas. A proporção das fibras elásticas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Proporção de Fibras Elásticas} = \frac{\text{Área de Fibra Elástica}}{\text{Área Total} - \text{Área do espaço aéreo}}$$

3.4.2.2. Proporção de Fibras Colágenas

A avaliação da proporção das fibras colágenas no tecido pulmonar foi realizada utilizando-se o analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um único investigador. Em cortes pulmonares corados com picrosirius, fotografados em aumento de 200x, sendo utilizados 20 campos (fotos) em cada lâmina.

Ao iniciar o programa, o arquivo com a foto a ser analisada foi carregado e a imagem foi calibrada sob um aumento de 200x. A ferramenta do programa *Rectangular* AO*I* foi selecionada e, através dela, foi calculada a área total da fotografia, a área correspondente ao espaço aéreo, a área correspondente ao total do parênquima pulmonar (área total menos área do espaço aéreo), e a área correspondente às fibras colágenas. A proporção das fibras colágenas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Proporção de Fibras Colágenas} = \frac{\text{Área de Fibra Colágena}}{\text{Área Total} - \text{Área Espaço Aéreo}}$$

3.5. Variáveis de Interesse Estudadas

Foram analisadas as seguintes variáveis de interesse: Sobrevida, Intercepto Linear Médio, Área de Superfície Interna, Número de Alvéolos,

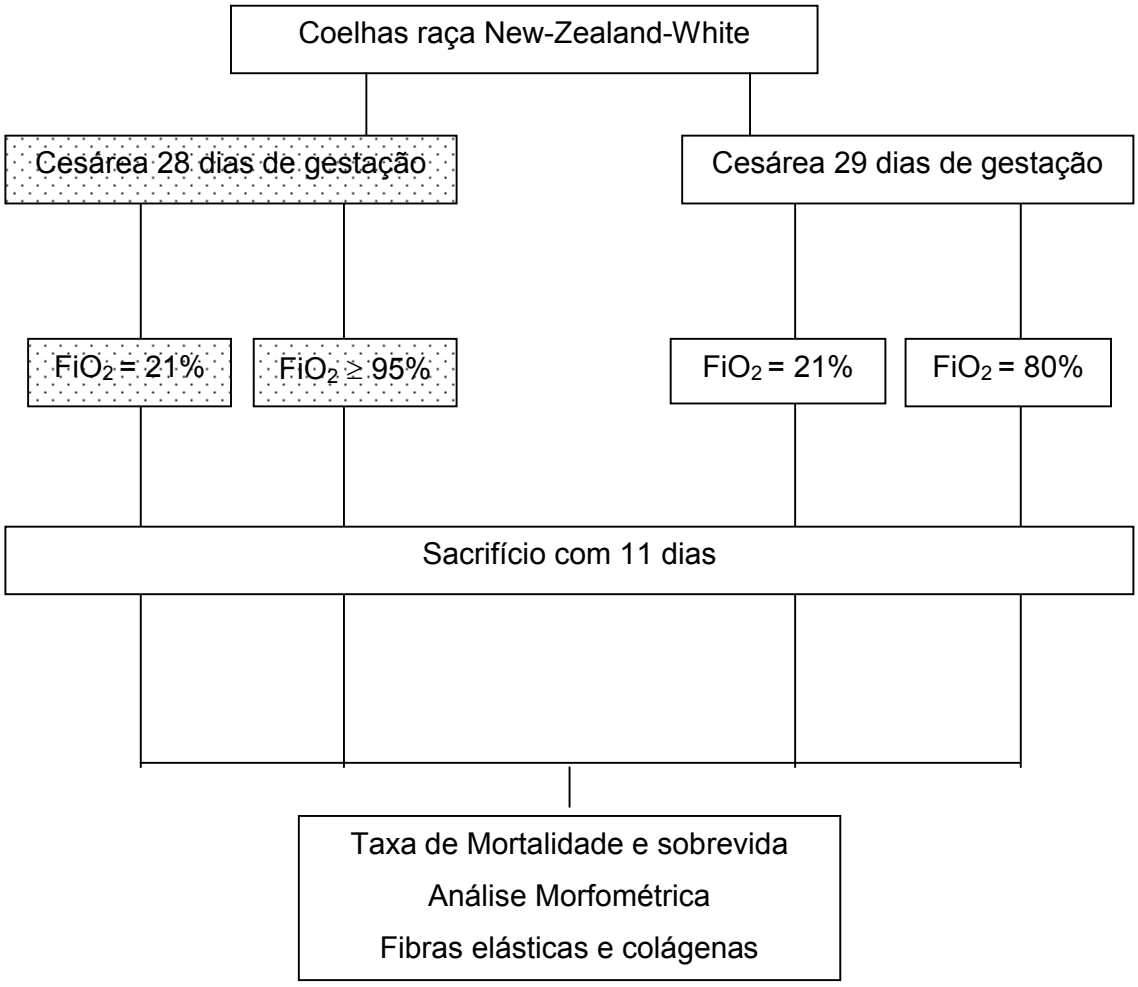
Espessamento Septal, Proporção de Fibras Elásticas, Proporção de Fibras Colágenas.

3.6. Análise Estatística

A análise da sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meyer. As variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA One-Way, utilizando-se Student-Newman-Keuls como pós teste discriminatório. Quando os dados não apresentaram os pré-requisitos de distribuição normal e mesma variância, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis Análise de Variância One-Way em Ranks como teste para dados não paramétricos, utilizando-se o método de Dunn como pós-teste discriminatório. O nível de significância adotado foi de 0.05.

O tamanho da amostra foi definido como um mínimo de 8 animais em cada um dos quatro grupos de estudo, considerando-se o necessário para se detectar uma diferença no número de alvéolos entre os grupos da ordem de 4,0 (por campo histológico analisado); com um desvio padrão esperado de 2,5 (Mascaretti, 2004), a um nível de significância de 0,05 e um poder de teste de 0,80.

3.7. Desenho do Estudo



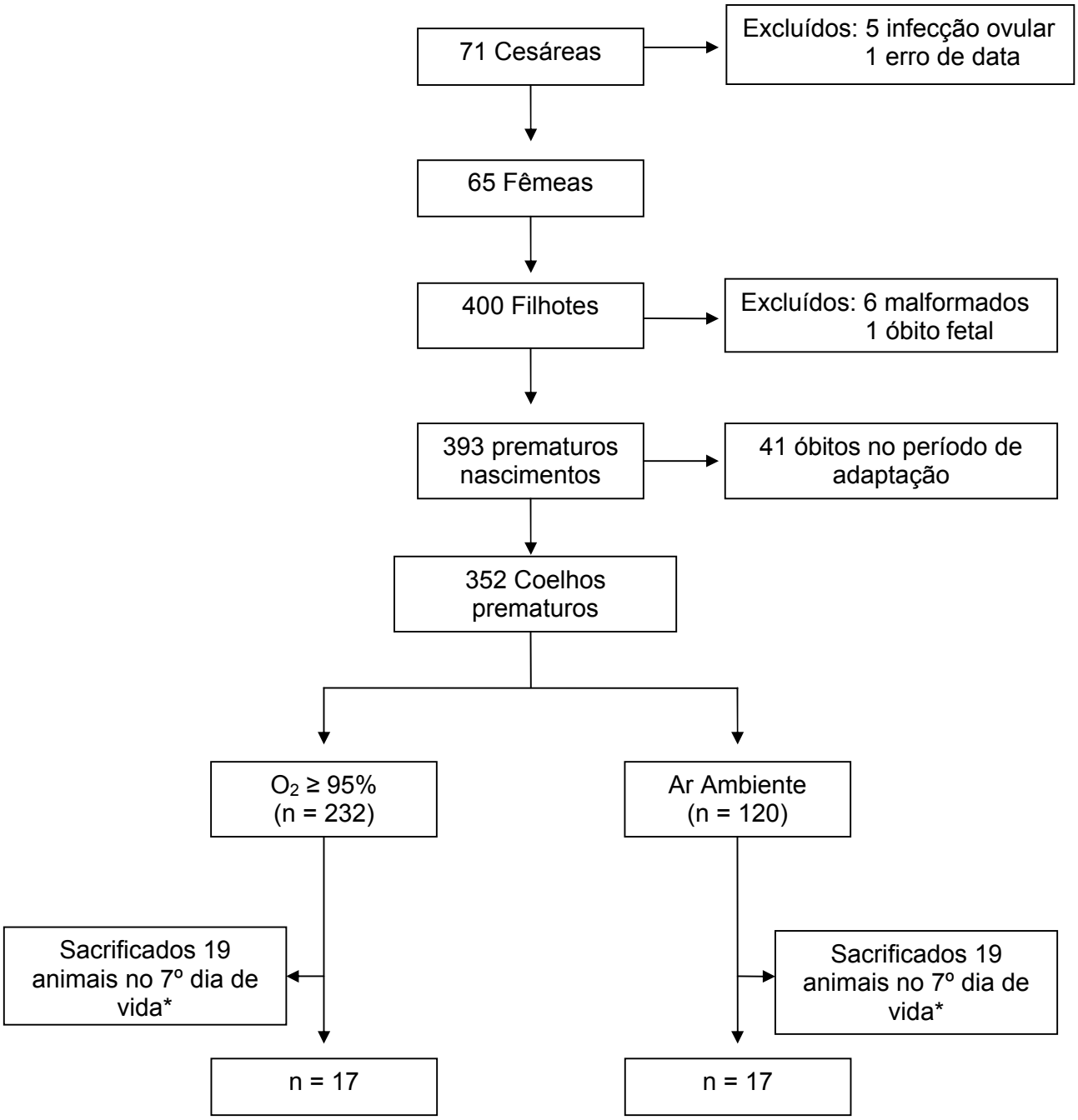
Grupo com dados já coletados. Foram utilizados os dados de mortalidade e de volume pulmonar.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

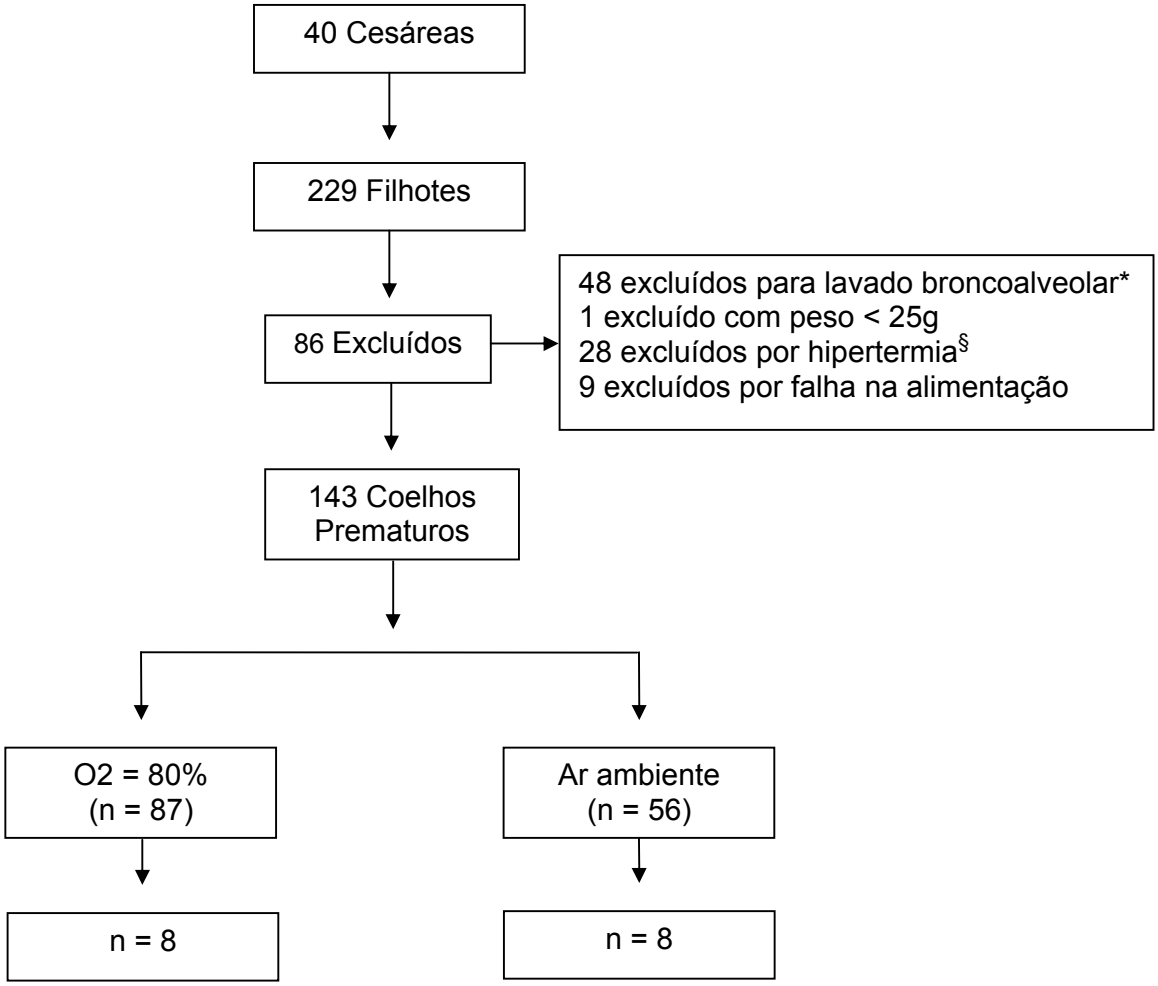
Foram realizados 71 partos cesáreos, deste total foram excluídas do estudo seis coelhas, cinco por infecção ovular e uma por erro de data. As 65 coelhas grávidas restantes geraram um total de 400 filhotes, dos quais seis foram excluídos por apresentarem malformações grosseiras e um por óbito fetal. Outros 41 recém-nascidos foram excluídos por óbito na primeira hora de vida. Dos 352 coelhos prematuros restantes, 120 foram alocados no grupo Ar 28 e 232 no grupo O_2 28. Deste total, 38 animais foram sacrificados no 7º dia de vida (19 em cada grupo) para a realização de outro projeto de pesquisa. Dos 314 animais restantes, 17 animais sobreviveram até o 11º dia de vida e constituíram o grupo Ar 28, 17 animais expostos ao oxigênio sobreviveram até o 11º dia de vida, constituindo o grupo O_2 28 (Figura 1). Em relação aos grupos Ar 29 e O_2 29, foram realizadas 40 partos cesáreos com o nascimento de 228 filhotes. Deste total, 91 recém-nascidos foram alocados para o grupo Ar 29 e 137 foram alocados para o grupo O_2 29. Foram excluídos, no Grupo O_2 29, 60 animais por óbito, sete por falha na alimentação, 26 por hipertermia (falha no controle de temperatura da incubadora) e um por perda da identificação. No grupo Ar 29 foram excluídos 34 animais por óbito e dois por falha na alimentação. Sobreviveram até o 11º dia de vida e constituíram os grupos de estudo oito animais no grupo Ar 29 e oito animais no grupo O_2 29 (Figura 2).

Figura 1. Distribuição e número de animais por grupo de estudo. Grupo Ar 28 e O_2 28



***** Animais utilizados em outro projeto de pesquisa.

Figura 2. Distribuição e número de animais por grupo de estudo. Grupo Ar 29 e O_2 29



***** Lavado broncoalveolar utilizado em outro projeto de pesquisa
§ Falha no controle de temperatura da incubadora

4.1. Sobrevida dos Animais

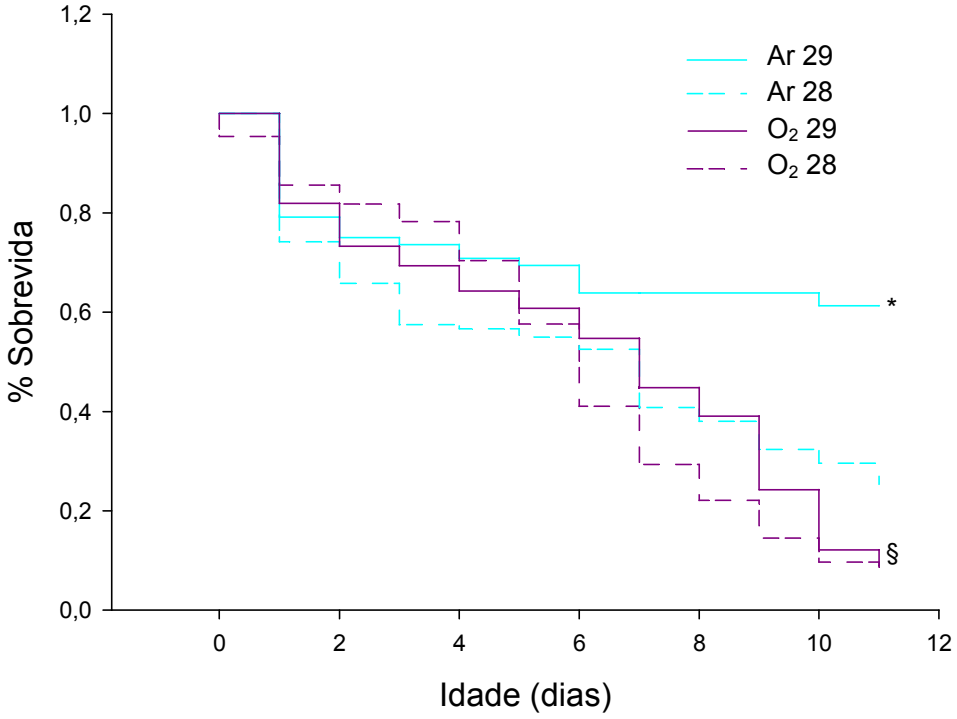
Não foram encontradas diferenças entre os grupos Ar 28 e O_2 28. No entanto o grupo Ar 29 apresentou maior sobrevida em relação aos grupos, Ar 28, O_2 28 e O_2 29. A sobrevida observada entre os animais do grupo O_2 29 foi maior do que a observada entre os animais do grupo O_2 28 (Figura 3).

4.2. Análise Morfométrica Pulmonar

Os dados encontrados para intercepto linear médio, área de superfície interna, número de alvéolos e espessamento septal em cada grupo de estudo são mostrados na Tabela 1.

A hiperoxia bloqueou o desenvolvimento normal do pulmão, demonstrado por um aumento no Lm tanto no grupo O_2 28 quanto no grupo O_2 29, representando um maior tamanho alveolar. Foi encontrada uma diminuição significativa na área de superfície interna alveolar (ISA) em ambos os grupos expostos ao oxigênio (O_2 28 e O_2 29) em relação aos seus correspondentes mantidos em ar ambiente (Ar 28 e Ar 29). Confirmando o bloqueio no desenvolvimento alveolar secundário à exposição ao oxigênio, o número de alvéolos diminuiu significativamente, assim como foi observado um aumento na espessura do septo interalveolar nos grupos submetidos à hiperoxia em relação aos animais mantidos em ar ambiente (Tabela 1).

Figura 3. Curva de sobrevida Kaplan Meyer – Comparação entre os grupos Ar ambiente e Oxigênio nos animais com 28 dias e 29 dias de gestação



* Ar 29 vs todos os grupos ($p < 0,05$)

§ O_2 29 vs O_2 28 ($p < 0,015$)

Tabela 1 - Valores de Lm, ISA, Número de Alvéolos e Espessamento Septal, entre os grupos de estudo, resultados apresentados em média ± desvio – padrão

	Ar 28 (n=17)	**O_2 28** (n=17)	**Ar 29** (n=8)	**O_2 29** (n=8)
Lm (μm)	60,5±18,2*	85,3±27,3	74,3±10,6	86,4±14,9
ISA (μm^2)	0,033±0,014*	0,031±0,014	0,049±0,020	0,044±0,022
Número de Alvéolos (por campo)	32,02±11,29#	17,91±8,73	30,24±8,46#	21,44±4,93
Espessamento Septal (μm)	3,90±1,40#	19,08±16,8§	3,84±1,09	13,59±6,68

Lm – Intercepto Linear Médio; ISA – Área de Superfície Interna

* $p < 0,05$ vs todos os grupos
# $p < 0,05$ vs O_2
§ $p < 0,05$ vs Ar 28 e Ar 29

A representação gráfica do número de alvéolos nos grupos Ar 28, O_2 28, Ar 29, O_2 29 é mostrada na Figura 4; a coloração utilizada foi hematoxilina-eosina no aumento de 100x. O espessamento septal é mostrado na Figura 5 para os grupos Ar 28 e O_2 28 e na Figura 6 para os grupos Ar 29 e O_2 29; a coloração utilizada foi Picrosirius no aumento 200x.

Figura 4. Representação gráfica do número de alvéolos nos quatro grupos de estudo, coloração hematoxilina-eosina aumento 100x

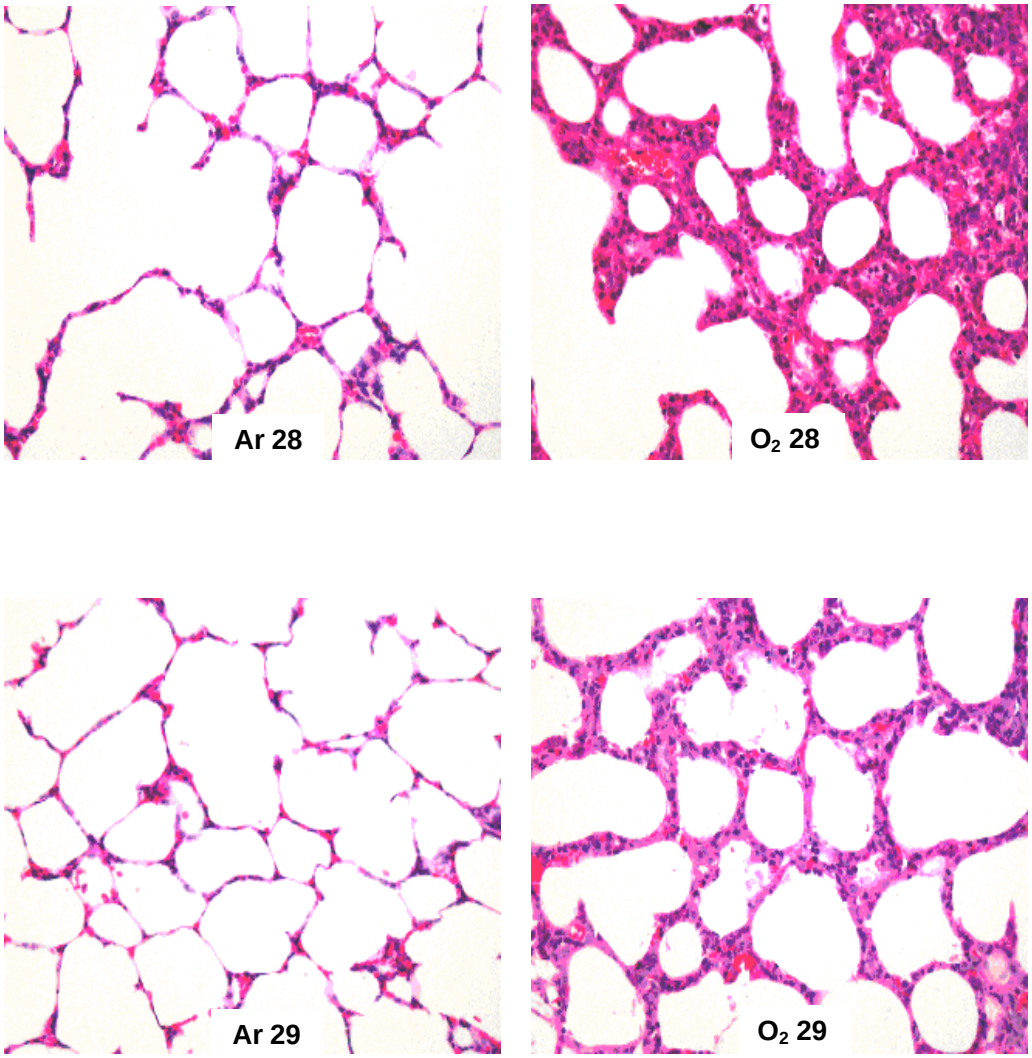
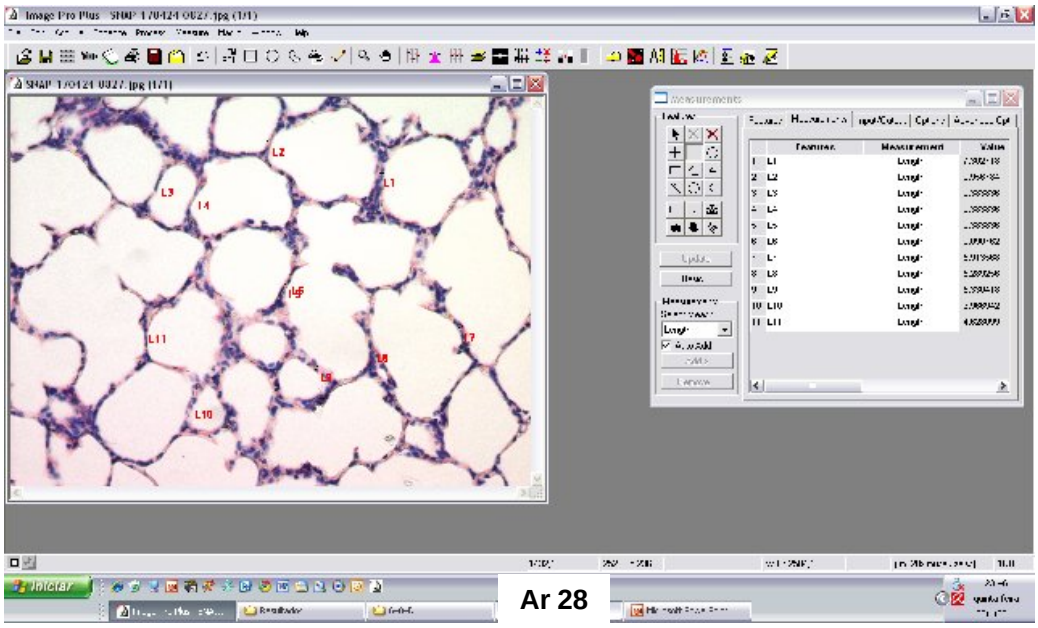


Figura 5. Espessamento septal nos grupos Ar 28 e O_2 28, coloração picrosirius, aumento 200x



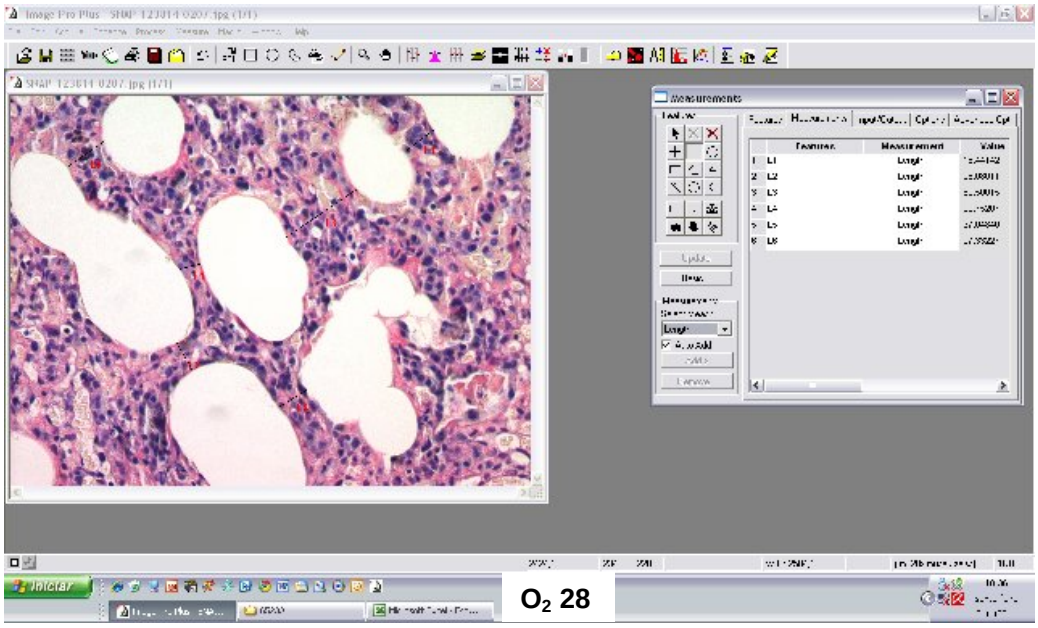
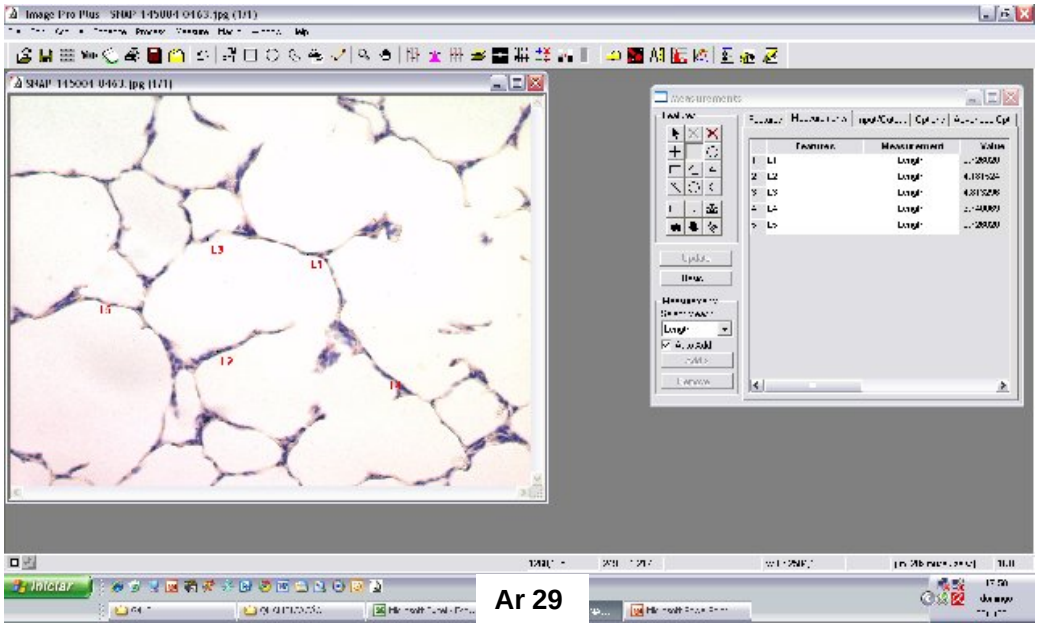
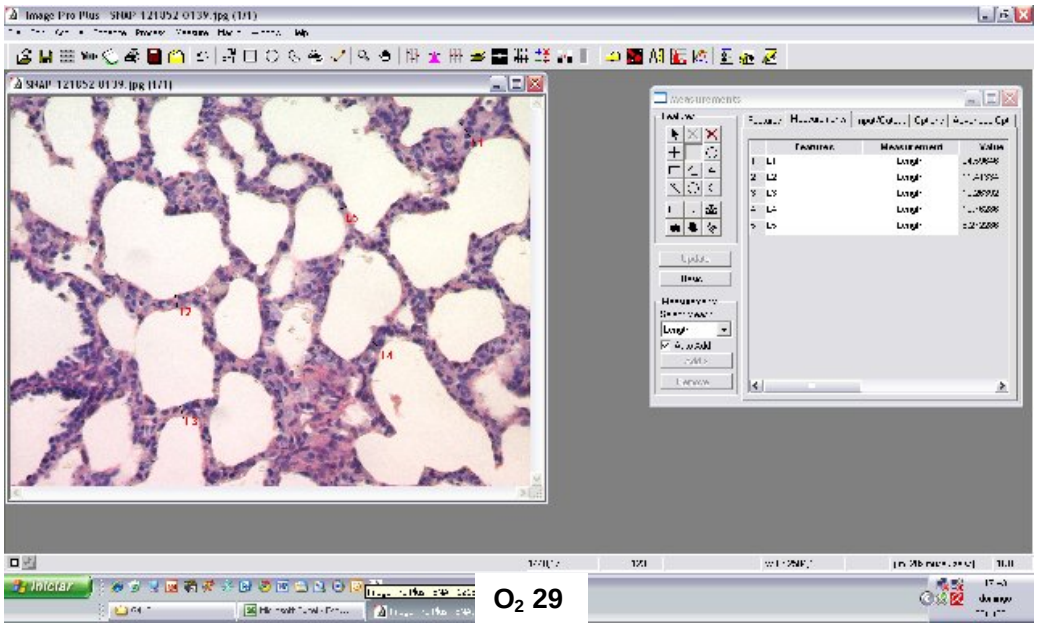


Figura 6. Espessamento septal nos grupos Ar 29 e O_2 29, coloração picrosirius, aumento 200x



Ar 29



O_2 29

4.3. Proporção de Fibras Elásticas e Colágenas

A proporção de fibras elásticas e de fibras colágenas em cada grupo de estudo, assim como as comparações entre os grupos são mostradas nas Figuras 7 e 8.

Houve um aumento na proporção de fibras elásticas nos animais do grupo O_2 28 com relação ao grupo Ar 28 (Figura 7). Nos grupos de 29 dias (Ar e O_2) a proporção de fibras elásticas foram menores que as do grupo 28 dias e todos os grupos se mostraram diferentes entre si. A menor proporção de fibras colágenas foi encontrada nos grupos Ar 28 e Ar 29 quando comparados aos grupos oxigênio com 28 e 29 dias, respectivamente (Figura 8).

A representação gráfica da proporção de fibras elásticas nos grupos Ar 28, O_2 28, Ar 29, O_2 29 é mostrada na Figura 9, a coloração utilizada foi ressorcina-orceína no aumento de 200x. A representação gráfica da proporção de fibras colágenas é mostrada na Figura 10 para os grupos Ar 28 e O_2 28 e na Figura 11 para os grupos Ar 29 e O_2 29, a coloração é Picrosirius e aumento 200x.

Figura 7. Proporção das fibras elásticas encontradas nos grupos de estudo, resultados apresentados em média ± desvio – padrão

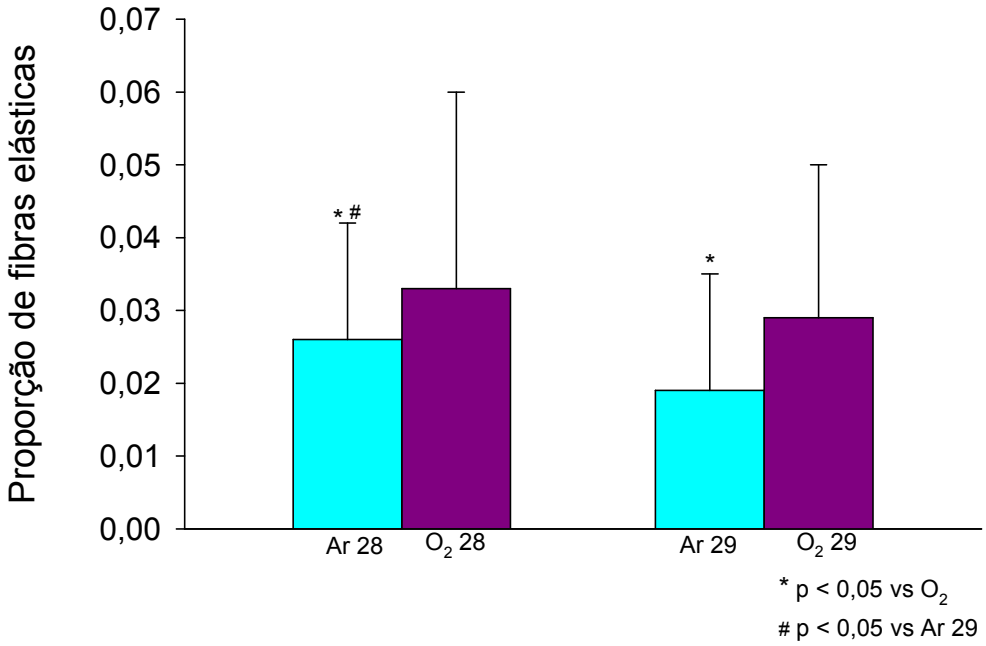


Figura 8. Proporção das fibras colágenas encontradas nos grupos de estudo, resultados apresentados em média ± desvio – padrão

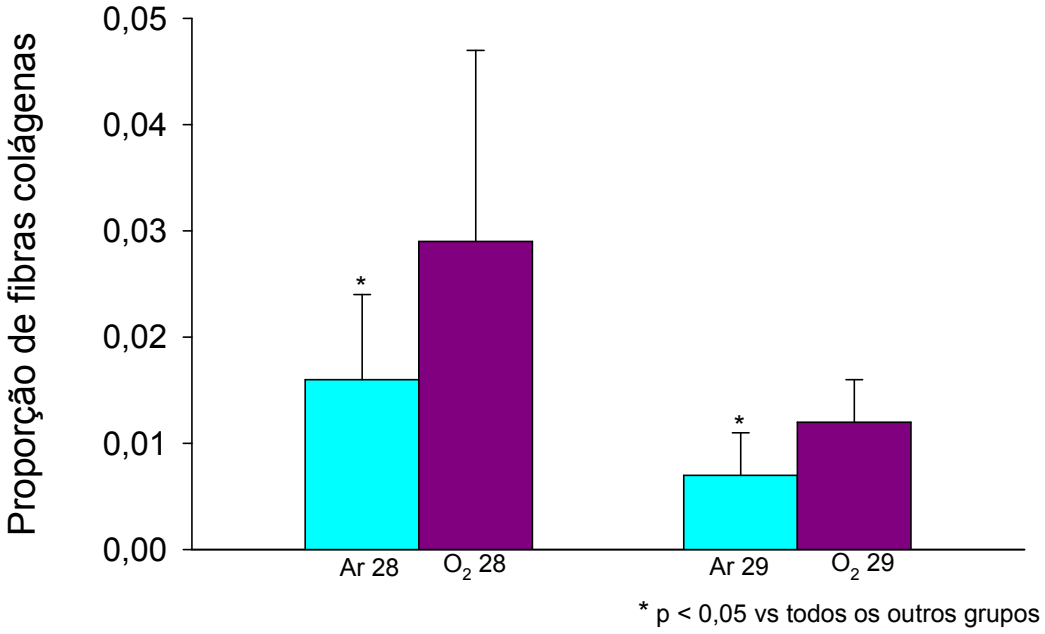


Figura 9. Distribuição das fibras elásticas (setas) nos quatro grupos de estudo, coloração Ressorcína-orseína aumento 200x

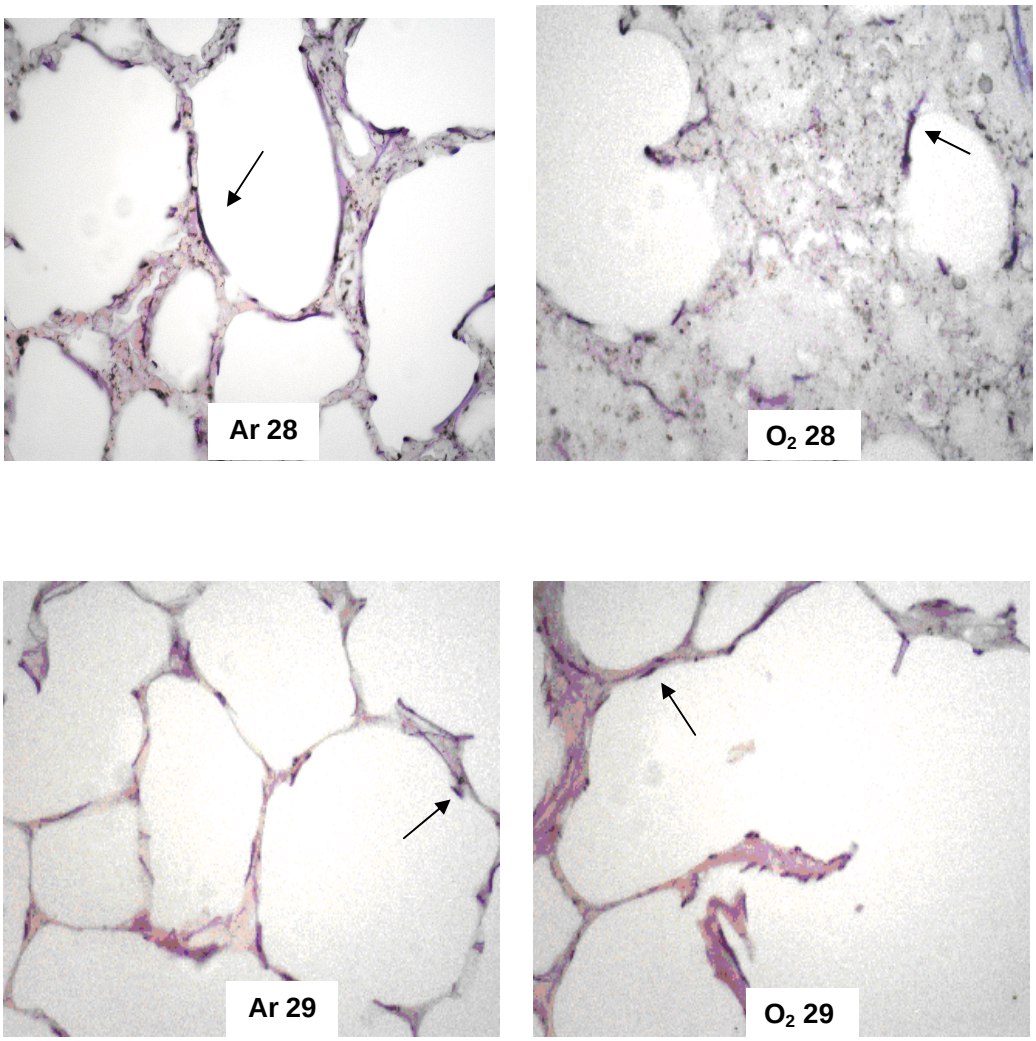


Figura 10. Distribuição das fibras colágenas (setas) nos grupos Ar 28 e O_2 28, coloração Picrosirius, aumento 200x

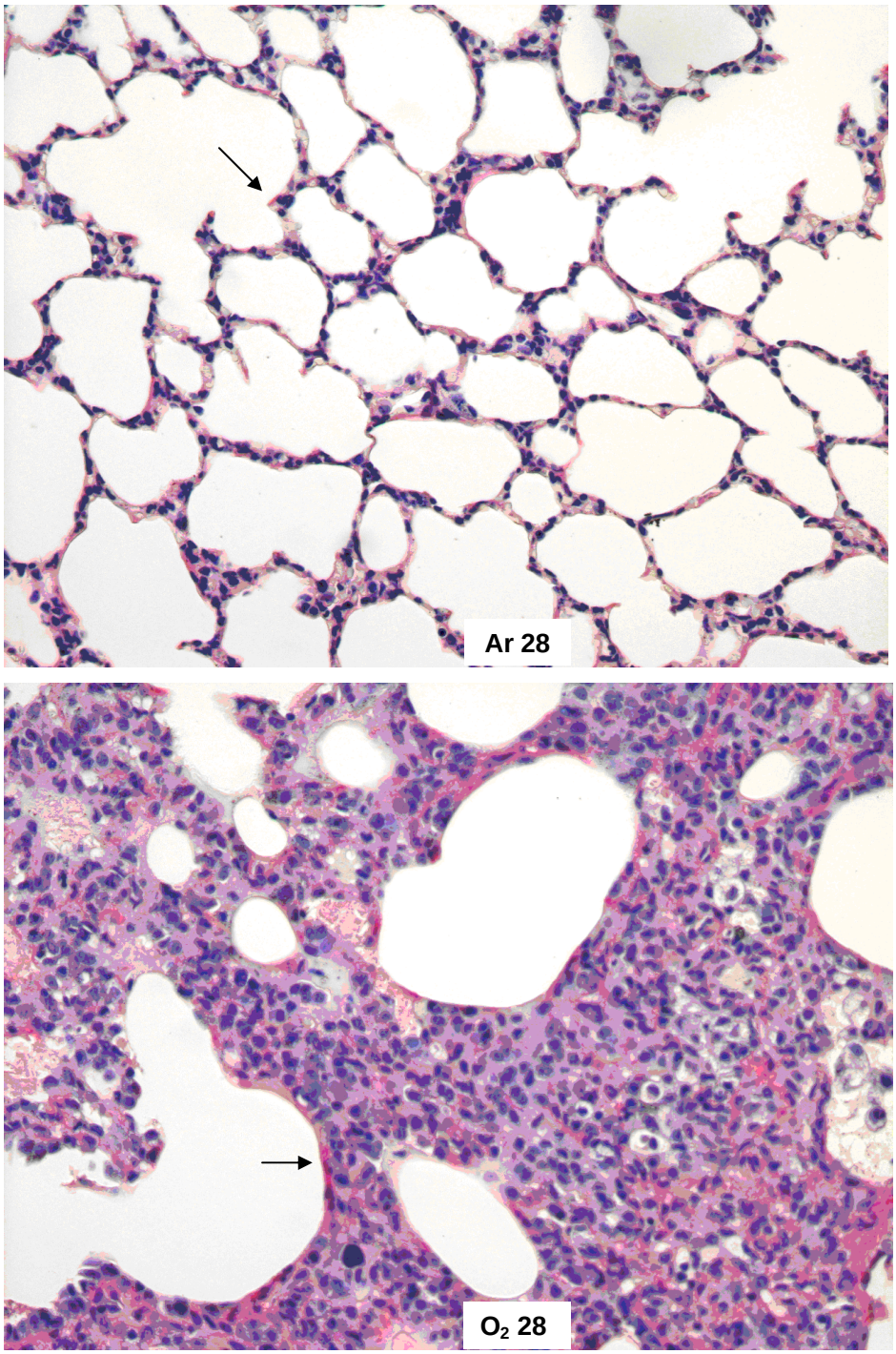
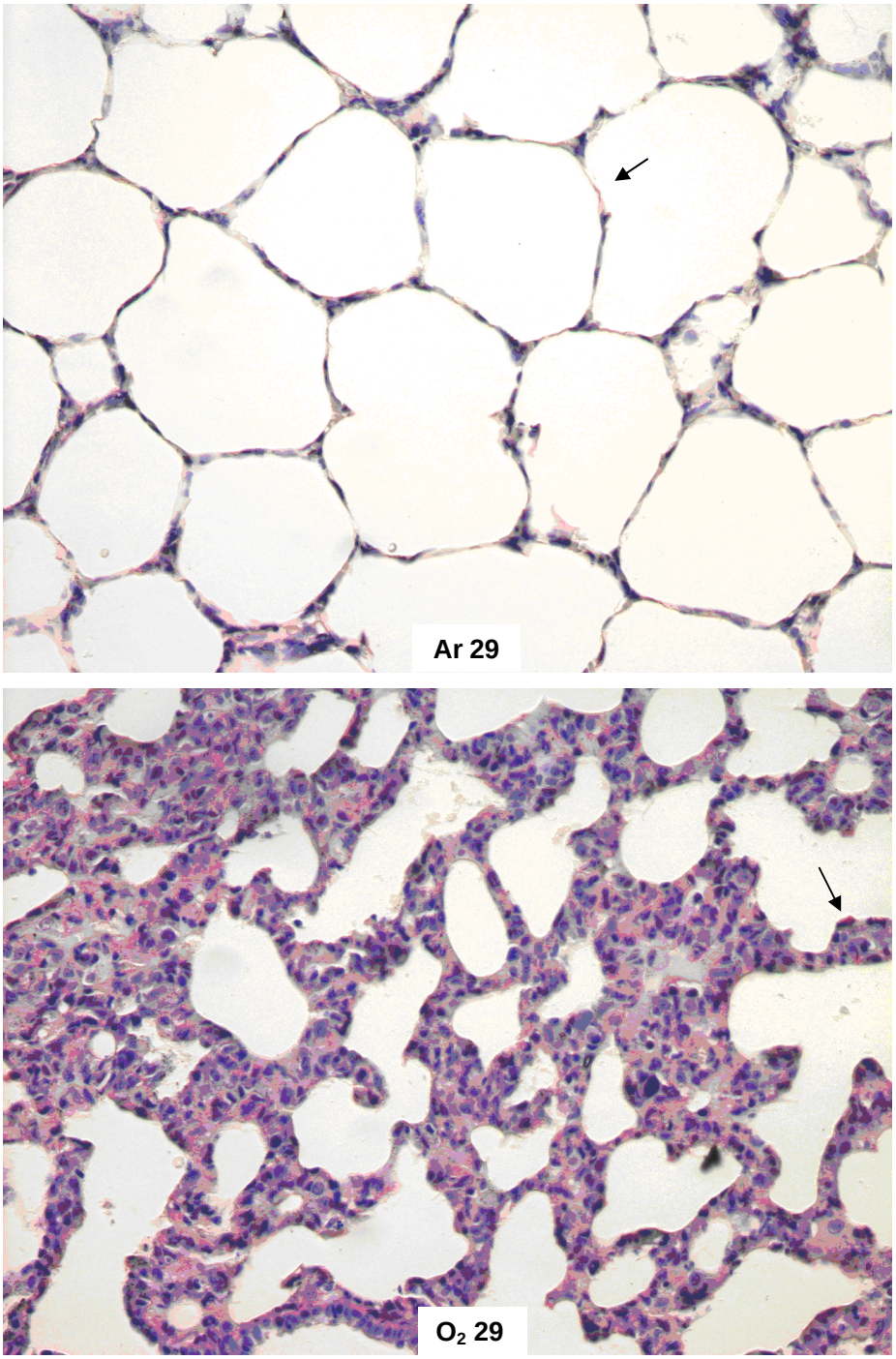


Figura 11. Distribuição das fibras colágenas (setas) nos grupos Ar 29 e O_2 29, coloração Picrosirius, aumento 200x



O resumo dos dados de Lm, ISA, número de alvéolos, espessamento septal, fibras elásticas e fibras colágenas é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo sobre o efeito da hiperoxia nas variáveis estudadas, Lm, ISA, número de alvéolos, espessamento septal, fibras elásticas e fibras colágenas entre os grupos de estudo expostos ao oxigênio

	O_2 28 (n=17)	**O_2 29** (n=8)
Lm (μm)	↑	↑
ISA(μm^2)	↓	↓
Número de Alvéolos	↓	↓
Espessamento Septal	↑	↑
Fibras Elásticas	↑	↑
Fibras Colágenas	↑	↑

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A utilização de coelhos prematuros com 29 dias de gestação submetidos a uma concentração de oxigênio de 80% resultou em achados histopatológicos compatíveis aos da DBP em humanos e semelhantes aos encontrados em animais de 28 dias de gestação com uma concentração de oxigênio ≥ 95%, porém com uma maior sobrevida.

5.1. A Escolha da Hiperoxia como Fator Agressor

A escolha do oxigênio como fator de agressão foi baseada na facilidade da execução do modelo, associado a evidências anteriores da literatura que mostram que o oxigênio isoladamente dá início à cascata de eventos inflamatórios que resultará no bloqueio do desenvolvimento alveolar. Pulmões de ratos expostos a 100% de oxigênio até a morte ou a 85% por sete dias apresentaram proliferação e hipertrofia das células epiteliais tipo II, diminuição da área de superfície e do volume dos capilares, além do aumento da atividade da superóxido dismutase (Crapo, et al., 1980; Crapo, 1986). De modo oposto, foi optado por não associar a ventilação mecânica ao uso do oxigênio pela dificuldade de se manter estes animais conectados a um ventilador por períodos prolongados de tempo.

Animais prematuros tem se mostrado altamente suscetíveis ao estresse oxidativo, em parte devido à falha na regulação das enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase (Frank e Sosenko, 1991). Da mesma maneira, recém-nascidos prematuros são particularmente sensíveis aos efeitos deletérios do oxigênio. A capacidade dos RNPT de lidar com os radicais livres encontrados no plasma é reduzida e continua a diminuir durante o período inicial pós-natal (Weinberger et al., 2002).

A hiperoxia, como único fator de agressão, leva a alterações anatomopatológicas semelhantes às encontradas na DBP em humanos. Portanto, neste estudo optou-se por utilizar como fator desencadeante da lesão pulmonar a exposição prolongada ao oxigênio em altas concentrações, permitindo o estudo das implicações deste agente agressor sobre o pulmão em desenvolvimento.

5.2. A Espécie Animal

A decisão de se utilizar o coelho prematuro submetido à hiperoxia como modelo experimental para o estudo da DBP foi baseada no seu baixo custo (os modelos utilizando babuínos e cordeiros são extremamente dispendiosos), associado à facilidade de manuseio desta espécie animal, com possibilidade de sua utilização para teste de novas intervenções terapêuticas (incluindo a ventilação mecânica), seja para a prevenção, ou para o tratamento da DBP. O coelho é um bom modelo por ter ninhadas com

seis a dez filhotes, com fetos maiores que os do rato e mais fáceis de manusear, sendo sua idade gestacional facilmente determinada (Kikkawa et al., 1971; Karnak et al., 1999)

Outra vantagem deste modelo está na grande proximidade entre os estágios de desenvolvimento pulmonar com o humano (Karnak et al., 1999 e Kovar et al., 2002). Nesta espécie animal entre o 18° e o 20° dia de gestação o pulmão encontra-se na fase pseudoglandular, o 22° dia é o período de transição entre a fase pseudoglandular e a canalicular. Entre o 23° e o 24° dia encontra-se na fase canalicular. No 25° e 26° dia o pulmão do coelho está na fase sacular, o período de transição da fase sacular para a fase alveolar é em torno do 27° dia, podendo ser identificadas as primeiras unidades alveolares. A fase alveolar inicia-se no 28° dia de gestação (Kikkawa et al., 1971; Karnak et al., 1999), nesta fase o animal está iniciando o processo de alveolização que continua até a vida adulta, de 24 a 36 semanas de vida (Kovar et al., 2002), ocorrendo aumento do número de alvéolos, diminuição da espessura da barreira alvéolo-capilar, com redução dos componentes endotelial e epitelial (Fu et al., 2003).

Nesta espécie animal o tempo de gestação é de 31 dias, sendo que 28 dias de gestação é o limite da viabilidade, e que corresponde a 87% do termo. No recém-nascido humano 87% do termo corresponde a uma idade gestacional inferior a 34 semanas correspondendo, portanto, a fase sacular do desenvolvimento pulmonar, sendo que o aparecimento dos primeiros alvéolos ocorre ao redor de 32 semanas (Burri, 1997).

O uso do coelho como modelo animal para estudar os efeitos da hiperoxia sobre o pulmão em desenvolvimento foram limitados a extratos de culturas de pulmão, ou de culturas de macrófagos, expostos ao oxigênio. Neste sentido, macrófagos foram retirados de coelhos prematuros (27 dias de gestação) e coelhos a termo (31 dias) e, quando foram expostos a 5% ou 95% de oxigênio, apenas os macrófagos prematuros tiveram um aumento nos radicais de oxigênio intracelulares, após a exposição à hiperoxia (Rozycki et al., 2002). Em outro estudo do mesmo grupo culturas de células de pulmão de coelhos prematuros e a termo foram expostas a 95% ou 5% de oxigênio por 24 horas. Os pulmões prematuros demonstraram níveis mais elevados de interleucina - 8 (IL-8) (Rozycki et al., 2004).

A utilização de animais após o nascimento prematuro foi limitada a períodos curtos de hiperoxia, de 20 horas a quatro dias (Frank e Sosenko, 1991; Shah e Hallman, 1997; Issa et al., 1999; Kovar et al., 2002). Nos achados de Issa et al. (1999), coelhos prematuros também com 29 dias de gestação foram expostos à 98% de oxigênio e ar ambiente ou à 98% de oxigênio e ácido nítrico (14ppm) por 20 horas. Em ar ambiente, o óxido nítrico inalatório não apresentou efeitos sobre o surfactante, porém uma pequena dose de óxido nítrico diminuiu ou preveniu os efeitos prejudiciais do oxigênio no surfactante alveolar, aliviando assim o estresse oxidativo.

Utilizando a mesma idade gestacional e um estímulo oxidativo semelhante Shah et al. (1997), expuseram coelhos prematuros de 29 dias de gestação a 100% de oxigênio por dois ou quatro dias, e administraram com o objetivo de diminuir a lesão causada pelo oxigênio, transferrina ou albunina

duas horas após o nascimento dos coelhos prematuros. A administração de transferrina diminuiu as lesões pulmonares causadas pela hiperoxia.

Guen et al. (2008), inseriu Escherichia coli em coelhas grávidas no 29° dia de gestação, e iniciou terapia com ceftriaxone 8 horas após a inoculação por um período de oito dias. Apesar de os animais permanecerem por um tempo maior para o estudo (oito dias), eles utilizaram a infecção pré-natal como método para indução da lesão pulmonar. Estes estudos corroboraram com a ideia central de utilizar, no modelo experimental de displasia broncopulmonar atualmente proposto, coelhos prematuros de 29 dias de gestação.

No modelo inicialmente desenvolvido em nosso meio baseado em longos períodos de exposição a altas concentrações de oxigênio, foram utilizados coelhos prematuros de 28 dias de gestação expostos a uma FiO_2 ≥ 95%. No entanto, a taxa de mortalidade foi elevada (Mascaretti 2004; Mataloun et al., 2006). Neste modelo, os animais foram submetidos à hiperoxia durante dois períodos de tempo: sete e onze dias. Embora com sete dias de exposição ao oxigênio a mortalidade tenha sido inferior à encontrada com 11 dias, esta ainda era relativamente elevada (87,1%) e as lesões pulmonares encontradas não foram suficientemente consistentes para a adoção deste modelo experimental. Desta forma, entendemos que não obteríamos os resultados esperados com sete dias de exposição à hiperoxia utilizando uma menor concentração de oxigênio, por isso não optamos por realizar a agressão por hiperoxia com uma menor concentração de oxigênio (FiO_2 = 80%) durante 11 dias, acreditando que um dia a mais de

maturação pulmonar e uma concentração de oxigênio um pouco menor (80%) resultaria em um modelo de DBP com uma menor mortalidade.

5.3. Sobrevida

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a sobrevida dos animais submetidos à lesão pulmonar pela hiperoxia, comparando com o modelo anterior, em que foram utilizados animais mais prematuros e submetidos a uma maior concentração de oxigênio.

Nossos resultados demonstram que a sobrevida foi melhor entre os animais que nasceram com 29 dias de gestação quando comparados aos que nasceram com 28 dias, tanto nos expostos ao oxigênio como entre os submetidos ao ar ambiente.

A mortalidade no grupo 28 dias, utilizando altas concentrações de oxigênio foi elevada, o que dificultaria a utilização prática deste modelo (Mascaretti 2004; Mataloun et al., 2006). Com a utilização de um dia a mais de gestação (29 dias), ocorreu um aumento significativo na sobrevida sem alterar de maneira significativa o processo de alveolização. De modo semelhante, a redução na concentração de oxigênio para 80% também diminuiu a mortalidade sem prejuízo significativo das lesões anátomo-patológicas pulmonares associadas à exposição ao oxigênio. As taxas de sobrevida encontradas entre os animais de 29 dias de gestação expostos a uma FiO_2 de 80% permitem a utilização deste modelo para o estudo da displasia broncopulmonar.

Chen et al. (1997), encontrou uma mortalidade de 67% em ratos expostos a uma fração inspirada de oxigênio > 95% por 14 dias, quando estes eram comparados com ratos expostos ao ar ambiente (mortalidade ar ambiente 33%), os ratos que foram tratados com dexametasona apresentaram uma discreta melhora na mortalidade, porém esta melhora não foi significativa.

O tratamento com ácido retinóico e dexametasona foi utilizado em ratos recém-nascidos expostos a uma $FiO_2 \geq 90\%$ ou ar ambiente por 14 dias com a finalidade de diminuir a mortalidade nestes animais. A mortalidade dos animais em ar ambiente foi de 12%, os animais expostos ao oxigênio apresentaram uma mortalidade de 50%, os animais expostos ao oxigênio que receberam ácido retinóico tiveram uma mortalidade de 40% e os que ficaram expostos ao O_2 e receberam dexametasona 45% (Veness-Meehan et al., 2000).

5.4. Caracterização do Bloqueio do Desenvolvimento Alveolar

Este estudo também teve como objetivo demonstrar que, mesmo com a utilização de uma idade gestacional mais avançada (29 dias de gestação) e de uma menor agressão pelo oxigênio ($FiO_2 = 80\%$), seria possível obter as lesões pulmonares compatíveis com as encontradas na displasia broncopulmonar em humanos.

Para a caracterização destas lesões optamos por estudar o tamanho do alvéolo, a área de superfície interna alveolar, o número de alvéolos por

campo microscópico analisado, a espessura do septo alveolar e a proporção de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar. A escolha destes parâmetros foi baseada no fato de que estas são as principais modificações que ocorrem na displasia broncopulmonar em humanos (Albertine et al., 1999).

O tamanho e a distância entre as paredes alveolares é bem representado, em uma análise simplificada, através da determinação do intercepto linear médio (Lm). Neste estudo a hiperoxia modificou o desenvolvimento normal do pulmão, demonstrado por um aumento do intercepto linear médio nos grupos O_2 28 e O_2 29.

Avaliação semelhante do bloqueio do desenvolvimento pulmonar foi realizada em ratos prematuros tratados com dexametasona ou solução salina 12 horas antes do parto, e randomizados para hiperoxia (>95%) ou ar ambiente logo após o nascimento durante um período de sete ou doze dias. De modo similar aos nossos resultados, a hiperoxia resultou em aumento no Lm, alargamento dos espaços aéreos distais e redução no volume pulmonar (Chen et al., 1997).

Coalson et al. (1999), estudando babuínos prematuros submetidos a ventilação mecânica e hiperoxia encontrou um aumento no Lm de 55% nos animais expostos ao oxigênio.

Margraf et al. (1991), estudaram o desenvolvimento pulmonar em crianças com e sem DBP. Foram realizadas autópsias de oito pacientes com DBP e de seis pacientes que morreram sem doença pulmonar. O intercepto

linear médio dos pacientes com DBP estava aumentado, demonstrando a importância deste parâmetro na caracterização desta doença.

No modelo anteriormente desenvolvido em nosso meio os pulmões dos coelhos prematuros expostos a hiperoxia (≥95%) por sete e onze dias apresentaram aumento no Lm quando comparados com o grupo ar ambiente (Mataloun et al., 2006; Mascaretti et al., 2009).

Os achados do presente estudo estão de acordo com a maioria dos estudos encontrados na literatura, que demonstram um aumento no Lm associado à exposição ao oxigênio, representando o aumento do tamanho alveolar secundário ao bloqueio do desenvolvimento pulmonar (Margraf et al., 1991; Chen et al., 1997; Mascaretti et al., 2009; Mataloun et al., 2006).

O cálculo da Área de Superfície Interna (ISA) reflete a área da membrana alvéolo-capilar e consequentemente a área de superfície disponível para a realização das trocas gasosas (Dunnil, 1962; Thurlbeck, 1967). No presente estudo foi encontrada uma diminuição significativa na ISA nos grupos que foram expostos ao oxigênio (O_2 28 e O_2 29) em relação aos grupos que permaneceram em ar ambiente. Vários autores estudaram os efeitos do bloqueio do desenvolvimento pulmonar que ocorre na DBP sobre a área de superfície interna. Ratos expostos a hiperoxia (95%) por sete dias apresentaram diminuição na área de superfície interna quando comparados com ratos expostos ao ar ambiente (Chen et al., 1997).

Coalson et al. (1999), estudaram babuínos prematuros tratados com surfactante exógeno após o nascimento, expostos ao oxigênio e à ventilação

mecânica, e também encontraram diminuição de 60% na área de superfície interna nos animais submetidos ao oxigênio.

A autópsia de recém-nascidos com DBP também revelou redução da área de superfície interna (Margraf et al., 1991), confirmando, assim como no Lm, a importância da análise deste parâmetro nos modelos experimentais desta doença.

A redução do número de alvéolos nos pulmões como consequência do bloqueio do desenvolvimento pulmonar é considerado um achado central na displasia broncopulmonar.No modelo experimental desenvolvido anteriormente no nosso meio utilizando coelhos expostos a elevadas concentrações de oxigênio (95%), foi encontrado aumento do Lm e diminuição do número de alvéolos, no entanto não houve diferença na área de superfície interna quando o grupo hiperoxia foi comparado com grupo ar ambiente (Mascaretti et al., 2009; Mataloun et al., 2006).

Johnson et al. (2009), induziram a DBP em ratos com uma fração inspirada de oxigênio de 60%, e encontraram uma diminuição no número de alvéolos de aproximadamente 50%. Em babuínos prematuros (71% de gestação) que desenvolveram lesão pulmonar após ventilação sem volutrauma, também foi demonstrado interrupção no desenvolvimento alveolar (Coalson et al., 1999). De modo similar foi encontrada diminuição na alveolização em babuínos estudados 33 semanas após o nascimento prematuro que permaneceram por três semanas em ventilação mecânica com FiO_2 de 80 – 100% (Coalson et al., 1995). Coalson et al. (1992), estudaram babuínos prematuros (75% da gestação) submetidos à ventilação

mecânica convencional utilizando uma concentração de oxigênio de 100% por sete dias seguidos, de 80% por 14 dias, e encontraram uma redução na alveolização. Albertine et al. (1999), estudando ovelhas prematuras ventiladas por três ou quatro semanas, encontraram uma menor septação alveolar e um menor número de alvéolos comparadas com animais ventilados mecanicamente após nascimento a termo.

De modo semelhante ratos recém-nascidos expostos ao ar ambiente ou a uma concentração de oxigênio de 85% por 28 dias apresentaram uma diminuição da septação alveolar, com aumento no tamanho dos espaços aéreos terminais e aumento da fibrose pulmonar. Estes achados foram evidentes após sete dias de exposição ao oxigênio, porém foram mais pronunciados com 28 dias. Neste estudo, a diminuição na alveolização foi precedida pela diminuição na proliferação de células pulmonares. A hiperoxia também causou um aumento no número de células inflamatórias no pulmão de ratos (Warner et al., 1998).

Okamoto et al. (2009), encontrou uma redução do número, área e perímetro dos alvéolos em autópsia de prematuros com a “nova” DBP. No presente estudo, o encontro de um número reduzido de alvéolos nos grupos submetidos à hiperoxia demonstra novamente que, ao lado de uma menor mortalidade, o uso de animais de 29 dias de gestação expostos a uma concentração de oxigênio de 80% durante 11 dias reproduziu os achados da DBP descritos em humanos.

Em relação à espessura do septo alveolar, observamos que houve um aumento significativo nos grupos O_2 28 e O_2 29 quando estes foram

comparados com os grupos Ar 28 e Ar 29. Na DBP foi descrito um aumento da espessura septal em recém-nascidos que evoluíram para o óbito (Stocker, 1986; Margraf et al., 1991).

Vários estudos experimentais confirmaram os achados descritos acima em humanos em relação à espessura do septo alveolar e sua relação com a displasia broncopulmonar. Coalson et al. (1992) e Coalson et al. (1995), encontraram aumento da espessura do septo alveolar em babuínos submetidos a ventilação mecânica e ao oxigênio, quando comparados ao grupo controle.

Comprovando o papel dos mediadores inflamatórios no aumento da espessura septal após a exposição ao oxigênio, Deng et al. (2000), trataram ratos prematuros expostos ao ar ambiente ou a 95% de oxigênio por oito dias com anti-citocina induzida por neutrófilo 1 (anti-CINC-1) e anti-proteína de macrófago inflamatório-2 (anti-MIP-2). O uso destes bloqueadores inflamatórios preveniu o espessamento septal. De modo semelhante Auten et al. (2001), relataram que o volume e a densidade da superfície alveolar pela hiperoxia foram preservados quando utilizado o anti-CINC-1 em ratos expostos ao ar ambiente, a uma FiO_2 ≥95% ou a FiO_2 ≥95% + anti-CINC-1.

O efeito da displasia broncopulmonar sobre a proporção das fibras elásticas no pulmão prematuro foi bastante estudada. No presente estudo houve um aumento na proporção de fibras elásticas nos animais do grupo O_2 28 com relação ao grupo Ar 28. Nos grupos de 29 dias (Ar e O_2) a proporção de fibras elásticas foram menores que as do grupo 28 dias, porém o grupo O_2

29 apresentou aumento das fibras elásticas quando comparados com o grupo Ar 29.

Ogden et al. (1984), encontrou em seus estudos um aumento na elastase e outras proteases em pulmões com DBP. Speer (2003), também relatou aumento na concentração de elastase em secreção de vias aéreas de crianças com DBP. Chen et al. (1997), encontrou um aumento significativo na elastina de ratos prematuros submetidos a uma FiO_2 > 95% quando comparados com ratos expostos ao ar ambiente. Coalson et al. (1999), Coalson (2003) e Bland et al. (2003), descreveram um aumento na deposição de fibras elásticas nas paredes alveolares além de um aumento e distribuição anormal de elastina nas unidades respiratórias terminais, nos achados patológicos de DBP em crianças. Thibeault et al. (2003), também relataram que o tecido elástico em crianças com DBP aumenta progressivamente com a idade. Em crianças foi encontrado um aumento na espessura, tortuosidade e distribuição irregular nas fibras elásticas (Margraf et al., 1991).

Albertine et al. (1999), encontraram aumento no conteúdo de fibras elásticas, insuflação pulmonar não uniforme, inflamação e edema em ovelhas prematuras após ventilação mecânica prolongada por três ou quatro semanas.

De maneira contrária aos resultados descritos anteriormente em relação aos efeitos da hiperoxia sobre a deposição de fibras elásticas no tecido pulmonar, foi descrito que em pulmões com doença pulmonar crônica o desenvolvimento das fibras elásticas é retardado, ocorrendo uma

diminuição na quantidade das fibras nas paredes dos alvéolos com irregularidade na sua distribuição (Nakamura et al., 1990).

Por outro lado Bruce et al. (1989), utilizando um modelo de hiperoxia em ratos, encontraram um desarranjo estrutural das fibras elásticas, com redução no seu comprimento porém sem diferença na sua concentração.

Em relação à deposição das fibras colágenas sabemos que durante o processo de desenvolvimento pulmonar normal ocorre um aumento quantitativo e uma maturação das mesmas no parênquima (Thibeault et al., 2003). Em modelos experimentais de DBP o conteúdo de colágeno encontra-se alterado, tanto em relação à concentração, quanto à sua organização. A proporção de fibras colágenas em relação ao parênquima pulmonar em resposta à exposição ao oxigênio permanece controversa na literatura. Thibeault et al. (2003), observaram aumento na deposição de fibras colágenas em crianças que morreram com risco de evolução de DBP. Da mesma maneira Coalson (2003), encontrou uma maior deposição de fibras colágenas tipo I na parede dos alvéolos.

Ekekezie et al. (2000), avaliaram o espessamento septal e o conteúdo de colágeno em porcos recém-nascidos expostos por 5 dias ao ar ambiente, ao ar ambiente + óxido nítrico (50ppm), ao oxigênio (96%) ou ao oxigênio + óxido nítrico. Concluíram que cinco dias de exposição ao óxido nítrico não resultou em degradação da matriz celular pulmonar, porém aumentou o conteúdo de colágeno no pulmão. Em contraste, a exposição à hiperoxia com ou sem óxido nítrico resultou em degradação da matriz celular pulmonar e aumento no conteúdo de colágeno pulmonar.

O tratamento com ácido retinóico foi utilizado em ratos recém-nascidos expostos a uma $FiO_2 \geq 90\%$ por 14 dias. Os animais foram tratados com ácido retinóico ou com dexametasona. O ácido retinóico não melhorou a formação septal, no entanto, ele aumentou o conteúdo de colágeno na parede das vias aéreas (Veness - Meehan et al., 2000).

No presente estudo a proporção de fibras colágenas aumentou nos animais expostos ao oxigênio, quando comparados aos expostos ao ar ambiente. Os animais dos grupos 28 dias (Ar e O_2) apresentaram uma maior quantidade de fibras colágenas.

A principal limitação do presente estudo é o fato de ser um estudo experimental, realizado em laboratório, e que não reproduz a fisiopatologia da DBP exatamente como ela acontece na prática clínica. A lesão encontrada no recém-nascido prematuro normalmente acontece quando este se encontra em ventilação mecânica e com uma FiO_2 entre 35 – 45%, nós reproduzimos a DBP maximizando os efeitos da toxicidade do oxigênio e utilizando uma FiO_2 muito elevada (80% e 95%), o que não acontece no recém-nascido.

5.5. Considerações Finais

A sobrevida dos recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento (501 a 1500g) tem aumentado progressivamente, estando em torno de 84%, devido aos avanços da neonatologia nos últimos 35 anos (Parker e Abman, 2003). Uma grande preocupação para todos os profissionais envolvidos no cuidado destes RNs nas UTIs é que eles sejam saudáveis e tenham uma

qualidade de vida adequada na infância e na vida adulta, crescendo e desenvolvendo plenamente as suas potencialidades, sem carregar sequelas limitantes do período neonatal.

Entender como funciona o mecanismo fisiopatológico da DBP é de extrema importância para tratar corretamente a doença, por isso a importância dos modelos experimentais, pois eles permitem reproduzir a patologia para compreende-la melhor e também testar novos métodos de tratamento.

Neste estudo foi desenvolvido um modelo animal para o estudo da DBP baseado na imaturidade pulmonar (29 dias) e na exposição ao oxigênio (80%), que abre a possibilidade de permitir novos estudos envolvendo os mecanismos que induzem a lesão tecidual pelo oxigênio, reproduzindo de maneira simples e menos dispendiosa, apenas com a hiperoxia, as lesões anatomopatológicas semelhantes às encontradas na DBP.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em coelhos prematuros a lesão pulmonar induzida pela exposição prolongada ao oxigênio e idade gestacional de 28 dias com $FiO_2 \geq 95\%$ ou idade gestacional de 29 dias e $FiO_2 = 80\%$ resultou em achados histopatológicos compatíveis com a displasia broncopulmonar em humanos e, no grupo 29 dias, resultou em uma maior sobrevida quando comparado ao grupo 28 dias.

Em ambos os modelos de lesão pulmonar pelo oxigênio os animais apresentaram aumento do Intercepto Linear Médio, diminuição da Área de Superfície Interna e do número de alvéolos, aumento do espessamento septal e aumento na proporção de fibras elásticas e colágenas.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, Carlton DP, Bland RD. Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(3):945-58.

Altiok O, Yasumatsu R, Bingol-Karakoc G, Riese RJ, Stahlman MT, Dwyer W, Pierce RA, Bromme D, Weber E, Cataltepe S. Imbalance between Cysteine Proteases and Inhibitors in a Baboon Model of Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:318-26.

Auten RL Jr, Mason N, Tanaka DT, Welty-Wolf K, Whorton M. Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol*. 2001;281:336-44.

Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology.* 2003;8:63-71.

Bhandari A, Bhandari V. Pathogenesis, pathology and pathophysiology of pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Front Biosci.* 2003;1(8):370-80.

Bland RD, Albertine KH, Pierce RA, Starcher BC. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: Potencial benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*. 2003;84:101-2.

Bonikos DS, Bensch KG, Northway WH Jr. Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mices. *Am J Pathol*. 1976;85:623-50.

Bracci R. Free oxygen radicals and surfactant. *Biol Neonate*. 1997;71(Suppl 1):23-7.

Bruce MC, Pawlowski R, Tomashefski JF Jr. Changes in lung elastic fiber structure and concentration associated with hyperoxic exposure in the developing rat lung. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1067-74.

Bucher JR, Roberts RJ. The development of the newborns rats in hyperoxia: A dose-response study of lung, growth, maturation, and changes in antioxidant enzyme activities. *Pediatr Res*. 1981;15:999-1008.

Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In: *Lung Growth and Development*, edited by McDonald JA. New York: Dekker; 1997, p.1-35.

Chen Y, Martinez MA, Frank L. Prenatal dexamethasone administration to premature rats exposed to prolonged hyperoxia: a new rat model of pulmonary fibrosis (bronchopulmonary dysplasia). *J Pediatr.* 1997;130(3):409-16.

Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinato.* 2006;30:171-8.

Choi CW, Kim BI, Hong JS, Kim EK, Kim HS, Choi JH. Bronchopulmonary dysplasia in a rat model induced by intra-amniotic inflammation and postnatal hyperoxia: morphometric aspects. *Pediatr Res.* 2009;65(3):323-7.

Coalson JJ, Winter VT, Gerstmann DR, Idell S, King RJ, de Lemos RA. Pathophysiologic, morphometric, and biochemical studies of the premature

baboon with bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:872-81.

Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(2):640-6.

Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4):1333-46.

Coalson JJ, Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*. 2003; 8:73-81.

Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptative doses oxygen. *Am Rev Respir Dis*. 1980;122:123-43.

Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Am Rev Physiol*. 1986;48:721-31.

Deakins KM. Bronchopulmonary Dysplasia. *Respiratory Care.* 2009;54(9):1252-62.

Deng H, Nicholas Mason S, Auten RLJr. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:2316-23.

Dunnil MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax*. 1962;17:320-8.

Ekekezie II, Thibeault DW, Rezaeikhaligh MH, Mabry SM, Norberg M, Reddy GK, Youssef J, Truog WE. High-dose inhaled nitric oxide and hyperoxia

increases lung collagen accumulation in piglets. *Biol Neonate*. 2000;78(3):198-206.

Escobedo MB, Hilliard JL, Smith F, Meredith K, Walsh W, Johnson D, Coalson JJ, Kuehl TJ, Null DM Jr, Robotham JL. A baboon model of bronchopulmonary dysplasia. I. Clinical features. *Exp Mol Pathol.* 1982;37(3):323-34.

Frank L, Sosenko IR. Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr*. 1987;110:106-10.

Frank L, Sosenko IR. Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatr Res*. 1991;29:292-6.

Fu Z, Heldt GP, West JB. Thickness of the blood-gas barrier in premature and 1-day-old newborn rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:130-6.

Gerdin E, Tyde´n O, Eriksson UJ. The development of antioxidant enzymatic defense in the perinatal rat lung: activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase. *Pediatr Res*. 1985;19:687-91.

Guen GLC, Denis C, Franco-Montoya ML, Jarry A, Delacourt C, Potel G, Bourbon J, Roze JC, Jarreau PH. Antenatal infection in the rabbit impairs post-natal growth and lung alveolarisation. *Eur Respir J.* 2008;32:1520-8.

Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, Rey-Parra GJ, Galipeau J, Haromy A, Eaton F, Chen M, Hashimoto K, Abley D, Korbutt G, Archer SL, The´baud B. Airway Delivery of Mesenchymal Stem Cells Prevents Arrested Alveolar Growth in Neonatal Lung Injury in Rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:1131-42.

Hack M, Fanaroff. Out Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990's. *Early Hum Dev*. 1999;53:193-218.

Hallman M, Haataja R. Genetic Influences and neonatal lung disease. *Seminars in Neonatology.* 2003;8 19-27.

Haworth SG, Hislop AA . Lung development – the effects of chronic hypoxia. *Seminars in Neonatology.* 2003;8:1-8.

Hayashibe H, Asayama K, Dobashi K, Kato K. Prenatal development of antioxidant enzymes in rat lung, kidney, and heart: marked increase in immunoreactive superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and catalase in the kidney. *Pediatr Res*. 1990;27:472-5.

Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R. Alveolar development in the human fetus and infant. *Early Human Development*. 1986;13:1-11.

Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J. Anat*. 2002;201:325-34.

Issa A, Lappalainen U, Kleinman M, Bry K, Hallman M. Inhaled nitric oxide decreases hyperoxia-induced surfactant abnormality in preterm rabbits. *Pediatr Res*. 1999;45(2):247-54.

Jancov RP, Johnstone L, Luo X, Robinson BH, Tanswell AK. Macrophages as a major source of oxygen radicals in the hyperoxic newborn rat lung. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(2):200-9.

Jancov RP, Tanswell AK. Growth factors, postnatal lung growth and bronchopulmonary dysplasia. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5(Suppl A):S265-75.

Johnson BH, Yi M, Masood A, Belcastro R, Li J, Shek S, Kantores C, Jankov RP, Tanswell AK. A critical role for the IL-1 receptor in lung injury induced in neonatal rats by 60% O2. *Pediatr Res.* 2009;66(3):260-5.

Jobe A, Bancalari E. Workshop Summary: bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1723-9.

Jobe A. An Unknown Lung growth and development after very preterm birth. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1529-36.

Jobe AH. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*. 2003;8:9-17.

Karnak I, Muftuoglu S, Cakar N, Cahit Tanyel F. Organ growth and lung maturation in rabbit fetuses. *Res Exp Med*. 1999;198:277-87.

Kikkawa Y, Kaibara M, Motoyama EK, Orzalesi MM, Cook CD. Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. *Am J Pathol*. 1971;64:423-42.

Klebe S, Wijngaarden P, Melville T, Lipsett J, Smet HD, Coster D, Williams KA. Exposure to cyclic oxygen sufficient for development of oxygen-induced retinopathy does not induce bronchopulmonary dysplasia in rats. *Experimental Lung Research*. 2010;36 (3):175-82.

Kovar J, Sly PD, Willet KE. Postnatal alveolar development of the rabbit. *J Appl Physiol*. 2002;93:629-35.

Lum H, Mitzner W. A species comparison of alveolar size and surface forces. *J Appl Physiol*. 1987;62(5):1865-71.

Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(2):391-400.

Mascaretti RS. *Coelhos prematuros expostos à hiperoxia: um modelo experimental para estudo da displasia broncopulmonar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Mascaretti RS, Mataloun MMGB, Dolhnikoff M, Rebello CM. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits. *Clinics.* 2009;64(11):1099-104.

Mataloun MMGB, Leone CR, Gibelli MAC, Vaz FAC. Efects of corticosteroids in very low birth weight newborns dependent on Mechanical ventilation. *Clinics.* 2005;60(2):113-120.

Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohlnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J Pediatr*. 2006;82:179-85.

Nakamura Y, Fukuda S, Hashimoto T. Pulmonary elastic fibers in normal human development and in pathological conditions. *Pediatr Pathol.* 1990;10(5):689-706.

Northway WH Jr, Rosan RC; Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med*.1967;27:356-68.

Ogden BE, Murphy SA, Saunders GC, Pathak D, Johnson JD. Neonatal lung neutrophils and elastase/proteinase inhibitor imbalance. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(5):817-21.

Okamoto CT, Bahr JA, Silva LLG, Noronha L. Análises histopatológica e morfométrica no diagnóstico da “nova” displasia broncopulmonar e

comparação clinicopatológica com a forma clássica da doença. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45(2):155-60.

Parker TA, Abman SH. The pulmonary circulation in bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*. 2003;8:51-62.

Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, Carlton DP, Bland RD. Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. *Am J Physiol.* 1997;272(3):452-60.

Rebello CM, Proença RSM, Troster EJ, Jobe AH. Exogenous Surfactant Therapy What is established and what still needs to be determined. *J Pediatr.* 2002;78(Supl. 2):215-226.

Rozycki HJ, Comber PG, Huff TF. Cytokines and oxygen radicals after hyperoxia in preterm and term alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(6):1222-8.

Rozycki HJ, Eischeid AC, Huff TF. Effect of hyperoxia on interleukin-8 expression in premature versus term rabbit lung explants. *Exp Lung Res*. 2004;30(4):285-96.

Russell GA. Antioxidants and neonatal lung disease. *Eur J Pediatr.* 1994;153(9):36-41.

Saugstad, OD. Chronic lung disease: the role of oxidative stress. *Biol Neonate.* 1998;74(Suppl 1):21-8.

Saugstad, OD. Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics.* 2001;108(5):1203-10.

Saugstad, OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol.* 2003;8(1):39-49.

Saugstad, OD. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *J. Perinat. Med*. 2010;38:571-7.

Scherle WA. A simple method for volumetry of organs in quantitative sterology. *Mikroskopie* 1970;5:57-60.

Shah M, Bry K, Hallman M. Protective effect of transferrin against hyperoxia: a study on premature rabbits. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:429-37.

Sogorb F, Damy SB, Rodrigues UP, Chaguri ICAG . Variação na composição do leite de coelha. *Mem Inst Butantan* 1991;53:175-80.

Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*. 2003;8:29-38.

Stocker JT. Pathologic features of long-standing "healed" bronchopulmonary dysplasia: a study of 28 3- to 40-month-old infants. *Hum Pathol.* 1986;17(9):943-61.

Suguihara C, Lessa AC. Como minimizar a lesão pulmonar no prematuro extremo: propostas. *Jornal de Pediatria*. 2005;81(1):69-78.

Sweet DG, Halliday HL, Warner JA. Airway remodeling in chronic lung disease of prematurity. *Paediatrics Respiratory Reviews.* 2002;3:140-6.

Sward-Comunelli SL, Mabry SM, Troug WE, Thibeault DW. Airway muscle in preterm infants: changes during development. *J Pediatr.* 1997;130:570-6.

Thibeault DW, Marbry SM, Ikechukww IE, Troug WE. Collagen scaffolding during development and its deformation with chronic lung disease. *Pediatrics.* 2003;111:766-76.

Thompson A, Bhandari V. Pulmonary Biomarkers of Bronchopulmonary Dysplasia. *Biomarker Insights* 2008;3:361-73.

Thurlbeck WM. The internal surface area of nonemphysematous lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1967;95:765-73.

Vadivel A, Abozaid S, Van Haaften T, Sawicka M, Eaton F, Chen M, Thébaud B. Adrenomedullin Promotes Lung Angiogenesis, Alveolar Development, and Repair. *Am J Respir Cell and Mol Biol*. 2010;43:152-60.

Veness-Meehan KA, Bottone FG Jr, Stiles AD. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats. *Pediatr Res*. 2000;48(4):434-44.

Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol*. 1998;275:110-7.

Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2002;181:60-7.