

MARTA MARIA GALLI BOZZO MATALOUN

**Respostas pulmonares à restrição nutricional
e hiperoxia em coelhos pré-termo**

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

Área de concentração: Pediatria
Orientadora: Prof^a Dr^a Cléa Rodrigues Leone

São Paulo
2003

A meu pai, Aristheu; meu tio Adhemar; meus sogros Ana e Joe pelo apoio e estímulo inestimáveis

À minha mãe, Alzira, por ter-nos ensinado a importância de valores como o conhecimento e o esforço para adquiri-lo, o amor à vida e ao trabalho e, o respeito pelas pessoas

À Sérgio, companheiro de todos os momentos, por ajudar-me sempre encontrar um caminho e pelo incentivo para percorrê-lo

À Gabriel, pelo respeito, sensibilidade e perseverança com que encara os nossos e os seus valores

À Rodrigo, pelo otimismo e determinação contagiantes e pelo carinho e respeito a todos que o cercam

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Cléa Rodrigues Leone, orientadora e amiga, pela transmissão de conhecimentos, dedicação e oportunidades profissionais, além dos inúmeros ensinamentos que transcendem ao conhecimento científico

À FAPESP, pelo auxílio financeiro, que possibilitou a realização desta tese

Ao Prof Dr Flávio Adolfo Costa Vaz, pelo apoio, estímulo e oportunidades profissionais

Ao Prof Dr Yassuhiko Okay, pelo apoio e estímulo

Ao Prof Dr José Lauro de Araújo Ramos, pelo exemplo e estímulo

Ao Dr Celso Moura Rebello, responsável pelo Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria, pelo apoio e orientação durante a confecção desta tese

À Dra Renata S. Mascaretti, companheira durante a realização deste projeto, pelo estímulo e amizade

Aos patologistas Prof Dr Paulo Hilário Saldiva, Dra Marisa Dolhnikoff e Dra Thaís Mauad pela orientação e incentivo durante a confecção desta tese

Ao Prof Dr Gregório Montes (*in memoriam*), pela orientação técnica sobre a confecção e coloração de lâminas para leitura de fibras elásticas e de colágeno

Ao técnico do Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Pediatria, Marcelo Silva Santos pela dedicação, cuidados com os animais, e auxílio técnico

Às biólogas e técnicas dos Laboratórios de Histologia e de Biologia Celular, pela confecção de lâminas

À Prof^a Dr^a Cleide Enoir Petean Trindade, do Departamento de Pediatria de Botucatu, pelo exemplo e pela inestimável contribuição à minha formação

À Dra Ligia Maria S. de S. Rugolo, do Departamento de Pediatria de Botucatu, responsável pela minha escolha pela neonatologia, pela orientação, ensinamentos e estímulo

Ao Dr Eduardo Juan Troster, pelo estímulo para aperfeiçoar-nos constantemente

Aos médicos do Berçário Anexo à Maternidade, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo à minha formação profissional, durante todos estes anos

À Dra Monique Catache, companheira de trabalho e amiga, pela ajuda nos momentos difíceis

À Edi Toma, enfermeira-chefe do Berçário Anexo à Maternidade, pela colaboração e incentivo, durante todos estes anos de trabalho

À funcionárias do Berçário Anexo à Maternidade, pela colaboração

Aos animais que foram sacrificados, permitindo o avanço da Ciência

Aos recém-nascidos, motivo de nossa dedicação diária, que inspiram nossas perguntas e criam-nos o desafio para resolvê-las

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Desenvolvimento pulmonar.....	3
1.2. Importância das fibras elásticas e do colágeno na formação alveolar.....	5
1.3. Influência da hiperoxia sobre a arquitetura pulmonar.....	10
1.4. Importância da nutrição sobre a arquitetura pulmonar.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Geral.....	21
2.2. Específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	23
3.1.1. Nascimento.....	23
3.1.2. Identificação.....	24
3.1.3. Formação dos grupos de estudo.....	24
3.1.4. Randomização.....	24
3.1.5. Grupos de Estudo.....	25
3.1.6. Desenho do estudo.....	25
3.1.7. Métodos para a manutenção dos animais.....	26
3.1.8. Alimentação.....	27
3.1.9. Oxigenoterapia.....	28
3.1.10. Sacrifício dos animais.....	28
3.2. Processamento para a análise histológica pulmonar.....	29
3.3. Peso corpóreo.....	31
3.4. Peso pulmonar.....	31
3.5. Volume pulmonar total.....	31
3.6. Volume pulmonar específico (ml/100gramas peso corpóreo).....	32
3.7. Análise morfométrica.....	32
3.7.1. Contagem do número de alvéolos.....	33
3.7.2. Intercepto alveolar linear médio (ILm).....	33
3.7.3. Área de superfície interna (ASI).....	34
3.7.4. Contagem de parênquima.....	35
3.7.5. Medida da espessura do septo interalveolar.....	35
3.7.6. Densidade de fibras elásticas.....	35
3.7.7. Densidade de colágeno.....	36
3.8. Análise Estatística.....	36

4. RESULTADOS.....	38
4.1. Evolução dos animais estudados	42
4.1.1. Sobrevida	42
4.1.2. Evolução ponderal.....	44
4.1.2.1. Curva de peso médio diário, ao longo do tempo, de todos os coelhos do estudo.....	44
4.1.2.2. Evolução ponderal dos coelhos sacrificados	48
4.2. Efeitos pulmonares.....	51
4.2.1. Crescimento	51
4.2.1.1. Peso e volume pulmonares	51
4.2.2. Análise morfométrica	56
4.2.2.1. Número de alvéolos.....	56
4.2.2.2. Intercepto linear médio (ILm).....	58
4.2.2.3. Área de superfície interna (ASI).....	59
4.2.2.4. Espessura de septos alveolares	61
4.2.2.5. Densidade de fibras elásticas	62
4.2.2.6. Densidade de colágeno	64
5. DISCUSSÃO	66
5.1. Modelo experimental	68
5.1.1. Restrição nutricional	69
5.1.1.1. Oferta nutricional	70
5.1.1.2. Evolução ponderal.....	74
5.1.2. Restrição nutricional e hiperoxia	79
5.1.3. Sobrevida	81
5.2. Efeitos pulmonares.....	83
5.2.1. Crescimento pulmonar.....	83
5.2.1.1. Peso Pulmonar	85
5.2.1.2. Relação peso pulmonar / peso corpóreo	88
5.2.1.3. Volume pulmonar total (VPT).....	91
5.2.1.4. Volume pulmonar específico (VPE)	92
5.2.2. Morfometria pulmonar.....	94
5.2.2.1. Número de alvéolos, Intercepto linear médio (ILm), Área de superfície interna (ASI)	94
5.2.2.2. Densidade de fibras elásticas e de colágeno no parênquima pulmonar	101
5.3. Considerações finais	104
6. CONCLUSÕES.....	106
7. ANEXOS	110
8. REFERÊNCIAS	120

LISTA DE ABREVIATURAS

- GI - grupo dieta padrão
- GIA - grupo dieta padrão e ar ambiente
- GIB - grupo dieta padrão e hiperoxia
- GII - grupo restrição nutricional
- GIIA - grupo restrição nutricional e ar ambiente
- GIIB - grupo restrição nutricional e hiperoxia
- PC - peso corpóreo
- PP - peso pulmonar
- VPT - volume pulmonar total
- VPE - volume pulmonar específico
- ILm - intercepto linear médio
- ASI - área de superfície interna

RESUMO

Mataloun, M.M.G.B. **Respostas pulmonares à restrição nutricional e hiperoxia em coelhos pré-termo.** São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Os recém-nascidos pré-termo extremos, por estarem ainda em uma fase do desenvolvimento pulmonar anterior à alveolização, estão mais vulneráveis a fatores como a hiperoxia, o barotrauma, o volutrauma e, o uso de medicações como os corticosteróides. A ação destes fatores, associada à imaturidade pulmonar, pode alterar a organização estrutural pulmonar, interferindo na alveolização e na organização de fibras elásticas e de colágeno. Estas alterações são comuns à “nova” displasia broncopulmonar, patologia freqüente entre os recém-nascidos pré-termo, especialmente os extremos. Criou-se um modelo experimental de restrição nutricional e hiperoxia, em coelhos pré-termo, com o objetivo de analisar os efeitos da restrição nutricional e da hiperoxia sobre a arquitetura pulmonar (número de alvéolos, intercepto linear médio(ILm), área de superfície interna(ASI), espessura de septo interalveolar), especialmente em relação à deposição de fibras elásticas e de colágeno. Após a realização de cesárea, em coelhas New Zealand White, com idade gestacional de 28 dias, seus filhotes foram divididos em 4 grupos, de acordo com a dieta e a concentração de oxigênio administradas: GIA (dieta padrão e $FiO_2=0,21$) (n=120); GIB (dieta padrão e $FiO_2 \geq 0,95$) (n=232); GIIA (restrição nutricional e $FiO_2=0,21$) (n=72); GIIIB (restrição nutricional e $FiO_2 \geq 0,95$) (n=368). A restrição nutricional foi definida como uma redução em 30% de todos os nutrientes, em relação à dieta padrão. Os coelhos foram pesados, diariamente. Após o sacrifício, aos 7 e 11 dias de vida, os pulmões foram removidos, pesados e fixados em formol tamponado 10%, com uma pressão de 30 cm de H₂O. O volume pulmonar total foi medido pelo método de deslocamento de água. Nos cortes histológicos utilizou-se as seguintes colorações: hematoxilina-eosina, para contagem do número de alvéolos, ILm, ASI, medida de septo interalveolar; orceína-resorcina modificada para análise de fibras elásticas e picosirius, para análise de colágeno. Os resultados foram apresentados através de médias e realizou-se ANOVA para comparação dos resultados, considerando-se um $p < 0,05$ como significativo. A restrição nutricional alterou o crescimento somático, reduzindo o ganho de peso e, alterou o crescimento e a morfologia pulmonares, reduzindo o volume pulmonar, o número de alvéolos e a deposição de fibras elásticas e de colágeno aos 7 e 11 dias de vida. A hiperoxia elevou a mortalidade e modificou a arquitetura pulmonar, reduzindo o número de alvéolos e aumentando suas dimensões, bem como aumento da espessura dos septos interalveolares, aos 7 e 11 dias de vida. Aos 11 dias, a hiperoxia reduziu a deposição de colágeno. A restrição nutricional associada à hiperoxia teve os seus efeitos intensificados sobre a redução do número de alvéolos e do depósito de colágeno, aos 7 e 11 dias. Estes resultados ilustram o papel da nutrição como modulador da lesão pulmonar pela hiperoxia, em pulmões em desenvolvimento.

SUMMARY

MATALOUN, M.M.G.B. **Nutritional restriction and hyperoxia effects on lung development in preterm rabbits.** São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Characteristic pathologic findings in bronchopulmonary dysplasia are the presence of alveolization impairment, widened alveolar septa, disordered collagen and elastic fibers deposition. There are likely to be multiple factors that result in the histological changes seen with the development of bronchopulmonary dysplasia, besides the lung immaturity: hyperoxia, volutrauma, barotrauma, nutrition. The aim of this study is to develop an experimental model, in preterm rabbits, to evaluate the effects of nutritional restriction and hyperoxia on lung weight and volume, alveoli number, mean linear intercept (Lm), internal surface area (ISA), alveolar septal thickness, elastic fibers and collagen density. After c-section, 28 days preterm New Zealand White rabbits were randomized into 4 groups: GIA (regular diet and $FiO_2=0,21$) (n=120); GIB (regular diet and $FiO_2\geq 0,95$) (n=232); GIIA (nutritional restriction and $FiO_2=0,21$) (n=72); GIIB (nutritional restriction and $FiO_2\geq 0,95$) (n=368). They were kept in incubators, warmer and humidified oxygen (Plexiglas chamber). Nutritional restriction was defined as caloric-proteic intake limited to 70% of the regular diet. After sacrifice with 7 and 11 days, the lungs were removed and fixed in 10% formalin under 30 cm H₂O transtracheal pressure. The total lung volume was measured by displacement water. Lung slices were stained with hematoxylin and eosin for alveoli number, Lm, ISA and alveolar septal thickness; resorcin-orcein for elastic fibers and Picrosirius for collagen (fibers/parenchyma pointy counting). Statistical analysis was done by ANOVA. Level of significance was set at 0,05. Values are means \pm sd. It was observed that GIA and GIB (regular diet) put on more weight than nutritional restriction groups from 8th till 11th day of life. Nutritional restriction influenced the ponderal evolution and reduced lung volume, alveoli number, collagen and elastic fibers deposition at 7th and 11th days of life. Hyperoxia elevated the mortality. In relation to lung architecture, the hyperoxia reduced alveoli number and elevated Lm, besides widened alveolar septal at 7th and 11th days of life. At 11th days, hyperoxia reduced collagen deposition, too. Nutritional restriction and hyperoxia had an additive effect on the reduction of alveoli number and collagen deposition. These findings suggest that nutrition has a modulator effect on lung injury by hyperoxia. This study strengthened the contribution of nutrition on preterm lung development.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da organogênese, todos os eventos são determinados por genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (McGinnis; Krauslauf, 1992). Simultaneamente ao desenvolvimento e amadurecimento de todos os órgãos ocorrem etapas importantes do desenvolvimento pulmonar, desde o momento da segmentação axial, até a alveolização e o amadurecimento capilar.

Fatores transcricionais modulam estes processos genéticos (McGinnis; Kuziora, 1994), que comandarão a organogênese em todo o organismo. Concomitantemente à ação específica destes fatores no pulmão, ocorrem interações complexas entre os vários tipos celulares pulmonares (Griffin et al, 1993), como também entre os túbulos epiteliais derivados do endoderma intestinal e as estruturas mesenquimais de origem mesodérmica (Alescio; Cassini, 1962). O mesênquima produz fatores de crescimento críticos para a formação e ramificação dos túbulos respiratórios (Spooner; Wessels, 1970). A proliferação dos túbulos respiratórios é dependente de vários fatores de crescimento: fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento dos queratócitos, todos produzidos no mesênquima, e que

influenciam a proliferação celular epitelial e a ramificação dos túbulos respiratórios (Nogawa; Ito, 1995).

Todos estes fatores e suas relações irão determinar a arquitetura física e funcional dos pulmões no período pós-natal.

Atualmente, há uma maior sobrevivência de recém-nascidos pré-termo extremos, devido ao aperfeiçoamento dos cuidados nas unidades neonatais. Estes, por estarem ainda em uma fase do desenvolvimento pulmonar anterior à alveolização, estão mais vulneráveis à ação de fatores, como os decorrentes da abordagem terapêutica atual, com o uso de corticosteróides ante e pós-natal, surfactante e das novas modalidades ventilatórias, os quais, atuando conjuntamente com o fator imaturidade pulmonar, resultam no desenvolvimento de uma displasia broncopulmonar, denominada de “nova”, devido a suas características peculiares.

1.1. Desenvolvimento pulmonar

Durante o desenvolvimento pulmonar fetal, desde a fase pseudoglandular, são processos importantes para a morfogênese pulmonar: a ramificação dicotomizada dos brônquios e o aparecimento dos sáculos. Durante todas essas etapas, ocorre uma diferenciação das células epiteliais, ramificação dos brônquios, formação de uma rede capilar e, ao final da fase pseudoglandular, surgem as vias aéreas de condução e inicia-se a formação dos ácinos (Boyden; Tompsett, 1965). Nesta fase, já é detectada a

tropoelastina, que é precursora das fibras elásticas, em paredes bronquiolares e nos vasos pulmonares (Noguchi et al, 1991).

A seguir, durante a fase canalicular, além da formação dos ácinos, observa-se o desenvolvimento de uma rede capilar no mesênquima, com diminuição do mesmo e a formação de alguns pontos de contato entre o epitélio pulmonar e o endotélio capilar, criando-se a barreira hemato-gasosa. Nos pontos de contato íntimo entre o endotélio e o epitélio, as células cuboidais diferenciam-se em células epiteliais tipo I. Nesta fase, surgem também as células epiteliais tipo II, com posterior produção de surfactante (Vidie; Burri,1981; Burri, 1997).

A partir da vigésima quarta semana de gestação, existem agrupamentos de sáculos, os quais posteriormente modificam-se para formar os alvéolos. Neste período, observa-se a presença de fibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno, depósito de fibras e da matriz extracelular, embora o conteúdo de colágeno e fibras elásticas ainda seja pequeno.

Anteriormente à formação dos alvéolos, as células intersticiais começam a produzir fibras elásticas ao longo das paredes saculares. Inicialmente, ocorre o depósito de elastina, nas localizações extracelulares dos fibroblastos, estendendo-se posteriormente ao longo dos septos parenquimatosos, das camadas perivasculares e peribrônquicas até o saco pleural (Kapancy et al, 1974).

1.2. Importância das fibras elásticas e do colágeno na formação alveolar

O desenvolvimento pulmonar pós-natal caracteriza-se por 3 fases consecutivas, sendo que, inicialmente, ocorre um aumento de volume pulmonar por expansão dos espaços aéreos, seguida por uma rápida proliferação tecidual, com aumento da área de superfície de trocas gasosas, constituindo o processo da alveolização pulmonar (Burri et al, 1974), e posterior remodelação dos septos interalveolares (Burri, 1974; Zeltner; Burri, 1987; Zeltner et al, 1987).

A partir de estudos experimentais detalhados em pulmões de ratos (Burri, 1974; Massaro et al, 1985; Randell et al, 1989) e de estudos em pulmões de recém - nascidos e crianças (Zeltner; Burri, 1987; Zeltner et al, 1987), descreveu-se que as vias aéreas de condução terminam em ductos e sáculos transitórios. Os sáculos primitivos são recobertos por um septo, ainda imaturo, com poucas ramificações e capilares em ambos os lados, na maioria das vezes. A camada intersticial é rica em fibroblastos, que localizam-se em grupos, nas regiões onde vários septos se encontram, denominadas de junções septais (Burri, 1974). Em alguns pontos, o septo mostra pequenas protuberâncias, contendo um arcabouço intersticial com fibroblastos, fibrilas de colágeno, um pequeno feixe de tecido elástico e, freqüentemente, uma alça capilar (Burri , 1974).

O septo primário é alterado pelo crescimento de várias pontes rígidas, formando invaginações. A alveolização inicia-se a partir do aparecimento

destas invaginações, ao longo de ambos os lados das paredes saculares. Estes septos em formação, septos secundários, subdividem os espaços aéreos primitivos e, a partir destas subdivisões, surgem os alvéolos. A formação dos alvéolos inicia-se na periferia, a partir do septo primário, com a formação de cristas ou pontes, que formam protuberâncias para os espaços aéreos, constituindo os ductos alveolares (Burri, 1974; Massaro et al, 1985; Randell et al, 1989). Estas pontes extracelulares contêm uma mistura de substância amorfa, a elastina, com uma substância microfibrilar. O espaço extracelular adjacente contém menores quantidades de fibras colágenas espalhadas, como também uma substância amorfa (Brody; Vaccaro, 1979).

A formação alveolar está intimamente relacionada com o depósito de elastina no sáculo (Burri, 1997). No início do septo secundário, ou abaixo da alça capilar aí contida, observa-se fibras de elastina. Em qualquer estágio do desenvolvimento septal, as fibras elásticas estão localizadas ao redor da abertura do alvéolo em formação (Burri, 1974).

Mercer et al (1990) e Mercer et al (1994), em estudos experimentais que analisam a estrutura do septo alveolar em diferentes espécies, descrevem a presença de fibras de elastina, visíveis em cortes únicos na borda externa, envolvendo cada anel da abertura alveolar, ao longo dos ductos alveolares. Imediatamente adjacente às fibras elásticas, observa-se uma rede de fibras colágenas, formando uma malha ou hexágono, nas paredes dos ductos alveolares.

Após a formação alveolar, ocorre um processo de amadurecimento das redes capilares do parênquima pulmonar. Esta remodelação estrutural,

que afeta profundamente a morfologia do septo parenquimatoso, representa a fase final do desenvolvimento pulmonar, denominada de fase de amadurecimento microvascular. Na realidade, ocorre a transformação da rede capilar dupla no septo parenquimatoso, em uma única rede capilar, conforme observada na morfologia do septo interalveolar maduro (Burri, 1997).

A formação do septo secundário parece ser um processo ativo, devido ao crescimento de estruturas mesodérmicas (Kauffman et al, 1974).

Desconhece-se a causa, mas o mesênquima inicia a proliferação em locais bem determinados. Talvez isto ocorra devido à grande atividade das células intersticiais e endoteliais na base ou dentro das pontes septais, induzida por fatores desconhecidos, com uma grande produção de tecidos e um aumento no número das cristas. Provavelmente, os feixes de fibras elásticas nas extremidades das pontes septais tenham um papel importante na formação septal (Lossli; Potter, 1959; Burri, 1997).

Vários estudos sugerem uma associação importante entre a alveolização e os eventos relacionados ao metabolismo das fibras elásticas e do colágeno, como a diferenciação dos fibroblastos intersticiais e a deposição de elastina nos septos secundários (Brody; Vaccaro, 1979).

A partir do terceiro trimestre de gestação, aparecem componentes microfibrilares e, após alguns dias ou semanas, dependendo das espécies, o depósito de elastina aumenta rapidamente até o nascimento. Estas alterações ocorrem paralelamente à diferenciação das unidades respiratórias no pulmão (Starcher, 1986).

Durante a embriogênese, a síntese de elastina no pulmão está associada a períodos específicos do desenvolvimento, sendo que ocorre um aumento importante da sua concentração, desde a fase canicular até a alveolização (Starcher , 1986; Crouch et al, 1997).

A distribuição e a disposição das fibras elásticas nos ductos alveolares sugerem que esta poderia desencadear, desde a fase canalicular, a formação dos alvéolos, a transformação dos septos primário e secundário, tendo um papel primordial na morfogênese alveolar.

De acordo com isto, observou-se, em pulmões de ratos em desenvolvimento, através da hibridização "*in situ*", vários graus de expressão do gene da tropoelastina, em diferentes locais da formação do septo alveolar. Nas células alongadas e finas, próximas ao epitélio localizado nas extremidades do septo, também foi detectada uma maior produção de elastina, atingindo seu pico 7 a 11 dias pós-natal, coincidindo com o pico de alveolização (Noguchi et al, 1991).

Existe uma correlação significativa entre alterações na expressão do colágeno e das proteínas das fibras elásticas e os eventos morfogenéticos pulmonares específicos (Crouch et al, 1997).

Alguns estudos mostram que o amadurecimento das fibras elásticas pulmonares, após o nascimento, induz a tensão orientada dentro do parênquima, produzindo o aparecimento de pequenas cristas no septo primário. Provavelmente, a tensão das fibras elásticas é responsável, pelo menos, pela disposição do esqueleto de colágeno, que mantém o septo em formação (Burri, 1974).

Da mesma forma, Burri (1974) demonstrou que o desenvolvimento do septo secundário, em ratos, está intimamente relacionado à deposição de fibras elásticas, no início do septo. Ainda não está bem esclarecido se os septos secundários crescem ativamente por proliferação tecidual, formam-se devido à tração do septo primário pelas fibras elásticas, ou se ocorre uma expansão da massa tecidual através de fendas na rede de fibras elásticas.

Boyden; Tompsett (1965) descreveram uma forma alternativa para a formação alveolar, a qual ocorreria por transformação dos bronquíolos terminais em respiratórios, através de alterações estruturais da parede bronquiolar, com a formação de uma barreira hemato - gasosa e uma invaginação destas áreas, formando-se os alvéolos.

Além disso, a partir de estudos realizados por Randell et al (1989) e Blanco et al (1991), observou-se que os alvéolos são formados durante a septação por outras vias, além da própria septação, embora estas vias alternativas ainda sejam desconhecidas (Massaro; Massaro, 1996).

Vários estudos demonstram que o período neonatal é um período sensitivo para o desenvolvimento alveolar normal (Frank; Groseclose, 1982; Massaro et al, 1985; Warner et al, 1998), e que vários fatores podem interferir na alveolização de forma permanente, modulando e até causando efeitos irreversíveis sobre esse processo.

1.3. Influência da hiperoxia sobre a arquitetura pulmonar

Em vários estudos experimentais, verificou-se alterações no sistema respiratório, causadas pela exposição a elevadas concentrações de oxigênio (Kistler et al, 1967; Clark; Lambersten, 1971; Crapo et al, 1980; Crapo, 1986).

Durante a lesão pulmonar mediada por oxigênio, Crapo et al (1980) descrevem, em animais submetidos a 100% de oxigênio a 1 atmosfera, uma fase inicial em que não se observam alterações morfológicas, mas apenas bioquímicas, devido à produção de radicais livres de oxigênio, sucedendo-a uma fase inflamatória, com alterações morfológicas em resposta à hiperoxia, como alterações na ultraestrutura da célula endotelial, com acúmulo de líquido pericapilar e de células sanguíneas inflamatórias no pulmão, com concomitante liberação de mediadores inflamatórios (Barry; Crapo, 1985). Nesta fase, observa-se um aumento no número de plaquetas no leito capilar pulmonar, que precede a ocorrência de um influxo de neutrófilos no leito intravascular. Estes aderem às células capilares endoteliais e, concomitantemente, ao interstício pulmonar. Os neutrófilos liberam mediadores inflamatórios e, quando ativados, produzem radicais livres. No entanto, existem dúvidas sobre o papel dos neutrófilos no desencadeamento da lesão pulmonar por oxigênio (Crapo, 1986).

Logo após a fase inflamatória, inicia-se a destruição do endotélio capilar pulmonar, com diminuição da massa total das células endoteliais, correspondendo à fase destrutiva. Não se observou proliferação importante

de fibroblastos, como também respostas morfológicas reparativas nesta fase. As células intersticiais predominantes foram células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, monócitos e linfócitos. A duração da fase inicial de lesão variou inversamente com a dose de oxigênio administrada (Crapo, 1986).

Já em ratos expostos a concentrações de oxigênio de 85%, ocorreu uma elevação no número de plaquetas na microvasculatura pulmonar após 72 horas e no número de neutrófilos, tanto da microvasculatura, quanto intersticiais, após 5 dias de exposição. No entanto, a partir do 7º dia de exposição, houve uma redução dos neutrófilos a quantidades insignificantes. A exposição a menores doses de oxigênio, não só retardou a instalação da fase inflamatória em relação à dose letal, como também bloqueou a intensidade e a duração da resposta (Barry; Crapo, 1985).

Posteriormente, verificou-se uma fase destrutiva, com perda das células endoteliais capilares na microvasculatura pulmonar. Concomitantemente a esta, ocorreu uma fase reparativa, com aumento das células, monócitos e fibroblastos. A relativa ausência de leucócitos polimorfonucleares e uma grande quantidade de monócitos no interstício pulmonar, são características importantes das diferentes alterações morfológicas associadas à toxicidade pulmonar de oxigênio, letal e sub-letal. Observou-se, também, uma resposta das células epiteliais, com um aumento do número de células tipo II e uma diminuição do tamanho das células tipo I (Barry; Crapo, 1985).

Vários estudos experimentais, em animais submetidos à hiperoxia por longo prazo, inicialmente, descreveram uma reação fibrótica no interstício pulmonar, com elevação de hidroxiprolina e de depósitos de colágeno (Bonikos et al, 1976; Crapo et al, 1980; Warner et al, 1998), espessamento do espaço intersticial alveolar (Bonikos, 1976; Crapo et al, 1980; Warner et al, 1998), além de alargamento dos espaços aéreos terminais, com destruição de grandes porções do septo interalveolar (Harrison, 1971; Bonikos et al, 1976), presença de metaplasia escamosa e bronquíolos ocluídos por epitélio em regeneração ou por “rolhas” com muco. Ressaltaram também a presença de áreas hiperinsufladas, alternadas com atelectasias e uma maior quantidade de fibras de tecido conectivo nas paredes alveolares (Coalson et al, 1982; Coalson et al, 1992).

Mais recentemente, têm sido descritas, como principais características: uma diminuição importante do número de alvéolos, com uma simplificação acinar e alterações no depósito de fibras elásticas e colágeno, nas paredes saculares e cristas rudimentares, com elevação de suas concentrações (Warner et al, 1998; Coalson et al, 1999).

Coalson et al (1992) descreveram alterações histopatológicas em modelo experimental de displasia broncopulmonar, em babuínos com 140 dias de idade gestacional, que correspondia a 75% da gestação, submetidos à ventilação de alta frequência oscilométrica, ou convencional, e concentrações de O₂ de 100% por 7 dias e após 80%, por 14 dias. Estas alterações corresponderam a lesões epiteliais hiperplásicas em vias aéreas, áreas de hiperinsulflação, com paredes saculares quase sem alvéolos, com

poucas células e maior quantidade de fibras de tecido conectivo nas paredes alveolares, além de áreas de fibrose alternadas com áreas atelectásicas, mas com sáculos de aparência normal e presença de células tipo II hiperplásicas, como também uma redução do número de células endoteliais. Ressalte-se que, neste modelo, estas alterações foram observadas na ausência de oclusão dos lúmens bronquiolares.

Posteriormente, Coalson et al (1999), apresentaram modelo experimental de displasia broncopulmonar em babuínos mais prematuros, com 125 dias de gestação, que receberam corticosteróide antenatal e surfactante, submetidos à ventilação mecânica e oxigênio por 1 a 2 meses. Observaram grandes sáculos distais simplificados, com vários graus de fibrose e uma diminuição do número de alvéolos, com um aumento do número das células mesenquimais, mononucleares e depósito focal de colágeno e elastina. Relataram a presença de elastina, depositada focalmente dentro das protuberâncias, ao longo de algumas paredes saculares e nas extremidades de cristas secundárias rudimentares. Somente agregados ocasionais de depósito de fibras elásticas foram identificados nas paredes dos sáculos.

Outros estudos, em modelos experimentais de displasia broncopulmonar em ovelhas prematuras, submetidas à ventilação mecânica e oxigênio para manter uma PaO₂ entre 50 a 80 mmHg, observaram também inflação não uniforme, diminuição do número de alvéolos, redução da densidade do volume da crista alveolar secundária, aumento da quantidade e distribuição anormal das fibras elásticas, maior quantidade de

musculatura lisa ao redor dos bronquíolos terminais, além de inflamação e edema. A maioria dos septos secundários eram encurtados, como também os capilares rudimentares, nas bases destes septos, não se estendiam até suas extremidades. Ocorreu, também, edema alveolar e intersticial, desde os septos interlobulares até a pleura visceral (Albertine et al, 1999). Neste modelo experimental, observou-se também uma elevação das concentrações de desmosina, como também da expressão do RNA mensageiro de tropoelastina nos locais de acúmulo de elastina, principalmente nas paredes alveolares. Por outro lado, neste estudo, o conteúdo de colágeno pulmonar não se alterou (Pierce et al, 1997).

Os efeitos da hiperoxia sobre o pulmão maduro estão bem estabelecidos, no entanto estes efeitos não estão bem elucidados em pulmões em desenvolvimento. Os animais recém-nascidos têm maior tolerância à hiperoxia e sobrevivem mais do que os adultos, mas no período perinatal, quando o pulmão ainda está em formação, diferenciação e crescimento, a ação desta poderá causar alterações irreversíveis.

Vários pesquisadores (Anderson et al, 1973; Sobonya et al, 1982; Stocker, 1986; Erickson et al, 1987; Margraf et al, 1991) descreveram lesões semelhantes às relatadas em animais prematuros, em recém-nascidos pré-termo que morreram, submetidos à ventilação mecânica e concentrações de oxigênio superiores a 60%, por 5 a 135 dias. Identificaram uma fase inicial exsudativa, com metaplasia escamosa, traqueal e brônquica, lesão de células epiteliais e alveolares, como também do endotélio capilar, oclusão dos espaços alveolares por pneumócitos edemaciados e edema intersticial.

Após, relataram a ocorrência de uma fase proliferativa, com organização dos exsudatos nos septos interalveolares e no interior dos alvéolos, espessamento septal, proliferação dos fibroblastos e depósitos de colágeno. Em alguns, observaram uma oclusão do lúmen alveolar e, em outros, uma bronquiolite obliterante, como também fibrose alveolar.

Em 1986, Stocker descreveu alterações microscópicas pulmonares, além de características clínicas, em recém-nascidos que morreram com diagnóstico de displasia broncopulmonar, submetidos à ventilação mecânica e a elevadas concentrações de oxigênio. Observou principalmente metaplasia escamosa em traquéia, com fibrose submucosa e hiperplasia muscular em brônquios e bronquíolos, fibrose septal alveolar em todos os casos, que variou de leve a intensa. Postulou que a presença da bronquiolite obliterante, ocluindo o lúmen bronquiolar com debris inflamatórios, protegeria em grau variável o parênquima alveolar distal a estas obstruções, de expor-se a elevadas concentrações de oxigênio e a picos de pressão, os quais resultariam em fibrose septal.

No entanto, Margraf et al (1991) não identificaram bronquiolite obliterante nos recém-nascidos com displasia broncopulmonar, que morreram e foram submetidos a autópsia. Descreveram uma diminuição importante do número de alvéolos, presença de fibrose septal e um padrão de distribuição irregular das fibras elásticas nas paredes alveolares, em todos os recém-nascidos analisados.

Da mesma forma, Sobonya et al (1982) mostraram uma diminuição importante da área de superfície interna alveolar, como também do número

de alvéolos, em recém-nascidos submetidos à ventilação mecânica e oxigênio, sugerindo uma diminuição importante do crescimento pulmonar.

Todos estes estudos sugerem que as alterações histopatológicas causadas por oxigênio, da mesma forma que pela ventilação mecânica, têm características em comum: diminuição do número de alvéolos, alteração de depósito de fibras elásticas e colágenas e, provavelmente, estas alterações estão associadas, já que a deposição de fibras elásticas seria um dos fatores que precederiam à formação de septos primários, com posterior aparecimento dos septos secundários e formação dos alvéolos.

1.4. Importância da nutrição sobre a arquitetura pulmonar

Os efeitos da restrição nutricional são diversos, dependendo do período de desenvolvimento pulmonar em que esta ocorre. Por outro lado, os processos fisiológicos são específicos em cada período do desenvolvimento e serão afetados de formas diferentes pelos mesmos agravos.

Apesar dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento pulmonar, para produzirem a arquitetura pulmonar, serem determinados por genes, a restrição nutricional pode modular estes eventos.

Como consequência da restrição nutricional, em animais adultos, são descritas diminuições no peso e no conteúdo do tecido conectivo pulmonares, como hidroxiprolina e no conteúdo protéico, bem como no de

elastina. Foi descrito que estas alterações diminuem as forças elásticas, com modificações na mecânica pulmonar. No entanto, após um período de recuperação nutricional, foi observado a presença, ainda, de uma diminuição das forças de recolhimento elástico. Sugeriram então, que, apesar da recuperação nutricional, ocorreu uma transformação irreversível na arquitetura dos sacos terminais (Sahebji; MacGee, 1983). Outros estudos também descreveram uma distorção das vias aéreas terminais, com diminuição da área de superfície alveolar (ISA) (Sahebji; Vassalo, 1979).

Também Kerr et al (1985) relataram em ratos, com restrição nutricional de 1/3 da oferta adequada por 6 semanas, alterações morfométricas semelhantes ao enfisema. Nesse estudo, o conteúdo de colágeno e elastina, não se alterou com a restrição. Interessante a observação de que, ratos totalmente privados de proteínas desenvolveram enfisema menos grave do que aqueles que receberam proteínas. Já, ratos que receberam 2/3 da oferta adequada, não apresentaram alterações enfisematosas, mesmo quando desenvolveram retardo de crescimento importante.

Inicialmente relacionou-se hiperoxia, volutrauma, barotrauma, entre outros, como associados a alterações na arquitetura pulmonar, com o desenvolvimento de displasia broncopulmonar. Atualmente, existem vários estudos (Frank; Groseclose, 1982; Das, 1984; Bruce et al, 1989; Sosenko; Frank, 1991; Kalenga et al, 1995; Kalenga et al, 1995a) destacando a importância da nutrição sobre o desenvolvimento pulmonar e sua possível associação com displasia broncopulmonar.

A dificuldade em prover um suporte nutricional adequado a recém-nascidos pré-termo, repercute sobre a capacidade de resposta do pulmão imaturo, já susceptível aos vários agravos descritos.

No entanto, os efeitos da restrição nutricional protéico-calórica sobre a arquitetura pulmonar, durante o desenvolvimento pulmonar perinatal não são, ainda, bem conhecidos.

Das (1984), em modelo experimental em ratos recém-nascidos submetidos a jejum intermitente por 24 horas no primeiro e no quinto dias de vida, totalizando um período total de jejum de 48 horas e, nos outros dias, permitindo uma sucção normal nas mães, em alguns até o sétimo dia de vida e, em outros, até o décimo quarto dia de vida, observou, tanto nos ratos submetidos à restrição nutricional, sacrificados aos 7 dias de vida, como nos sacrificados aos 14 dias de vida, uma redução no peso corpóreo, volume pulmonar, número de alvéolos e superfície interna alveolar. Nos submetidos à restrição nutricional e sacrificados aos 14 dias de vida, verificou, além das alterações já descritas, também uma diminuição importante do peso pulmonar e das fibras elásticas pulmonares e um menor desenvolvimento alveolar, com alargamento dos espaços aéreos. Portanto, neste estudo, a restrição nutricional alterou a alveolização, reduziu o crescimento pulmonar e a produção de elastina pulmonar.

No entanto, outros autores, apesar de descreverem uma influência negativa da restrição protéico-calórica sobre o crescimento pulmonar, com redução de peso e de volume pulmonares, bem como do parênquima pulmonar e da espessura septal média, não observaram alterações

importantes sobre a alveolização, em ratos submetidos a restrição protéico-calórica do primeiro ao 49^o dias de vida, ou do 14^o ao 49^o dias de vida (Kalenga et al , 1995, Kalenga et al, 1995a).

Frank; Groseclose (1982), analisando os efeitos da restrição protéico-calórica e hiperoxia, isoladamente ou associados, em ratos durante a primeira semana de vida, descreveram uma diminuição do peso corpóreo, como também do peso pulmonar, do conteúdo pulmonar de proteína e de DNA, tanto sob o efeito da hiperoxia, quanto sob o efeito da restrição nutricional protéico-calórica, além de uma diminuição importante nestes parâmetros de crescimento, quando analisaram a associação destes dois fatores. Apesar de ter ocorrido um bloqueio na alveolização dos ratos submetidos à hiperoxia, o desenvolvimento desta foi normal nos submetidos à restrição protéico-calórica.

Todos estes estudos sugerem que as alterações histopatológicas causadas sobre a arquitetura pulmonar, tanto pela hiperoxia quanto pela restrição nutricional, em animais pré-termo, modificam o desenvolvimento das funções das células pulmonares e a sua arquitetura, com repercussões clínicas importantes.

O conhecimento dos processos fisiopatológicos, decorrentes da ação de fatores adversos e comuns no período neonatal, como hiperoxia e restrição nutricional, podem contribuir para a elaboração de uma melhor abordagem de recém-nascidos pré-termo, submetidos à ação destes, minimizando seus efeitos, através da prevenção e até da indicação de esquemas terapêuticos mais eficientes.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos da restrição nutricional e da hiperoxia pós-natal sobre a arquitetura pulmonar, em especial em relação à deposição de fibras elásticas e colágeno nesse tecido, em coelhos pré-termo, com idade gestacional de 28 dias.

2.2. Específicos

Analisar em coelhos pré-termo, com gestação de 28 dias, submetidos ou não à hiperoxia, os efeitos da restrição nutricional pós-natal sobre:

1. Características da arquitetura pulmonar, referentes a número e morfologia de alvéolos e do parênquima pulmonar;
2. Deposição de fibras elásticas e de colágeno no tecido pulmonar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

3.1.1. Nascimento

Utilizou-se coelhas grávidas da raça New Zealand White, com idade gestacional conhecida, por cruzamento realizado em datas programadas. No 28^o dia de gestação, os animais foram sedados com injeção intramuscular de ketamina (10 mg/kg) e acepromazina (0,1 mg/kg), e realizou-se raquianestesia com 2 ml de solução de marcaína-xylocaína a 2% (1:1; vol.:vol.). Após abertura da parede abdominal e do útero, foram identificadas as membranas, correspondentes à direita e à esquerda e os fetos foram também identificados e secados, pesados sobre colchão térmico e sob calor radiante, utilizando-se O₂ em baixa concentração (30%) nos primeiros 30 minutos de vida.

Após o nascimento dos animais, as mães foram sacrificadas, com administração de pentobarbital endovenoso.

3.1.2. Identificação

Os coelhos foram identificados pela ordem de retirada do útero, iniciando-se pela porção distal do corno uterino direito, seguido pela retirada do filhote, da porção distal, do corno esquerdo e, a seguir, o próximo filhote de apresentação mais distal à direita, seguido pelo da esquerda, e, assim, sucessivamente, até o último filhote. Os animais receberam um número de identificação sequencial, considerando-se a ordem de retirada do útero.

3.1.3. Formação dos grupos de estudo

Logo após o período de adaptação inicial, os animais sobreviventes de cada ninhada foram randomizados, de acordo com o regime de exposição ao oxigênio e com o tipo de alimentação.

3.1.4. Randomização

Os animais foram randomizados, conforme sua posição intra-útero, de acordo com sua localização no corno placentário. Inicialmente, retirou-se o primeiro filhote mais distal à direita e, após, o primeiro à esquerda, o segundo à direita e, assim por diante, até chegar ao último filhote daquela mãe e o mesmo com as outras coelhas, de forma que os filhotes fossem numerados nesta sequência. A partir da numeração, foram randomizados

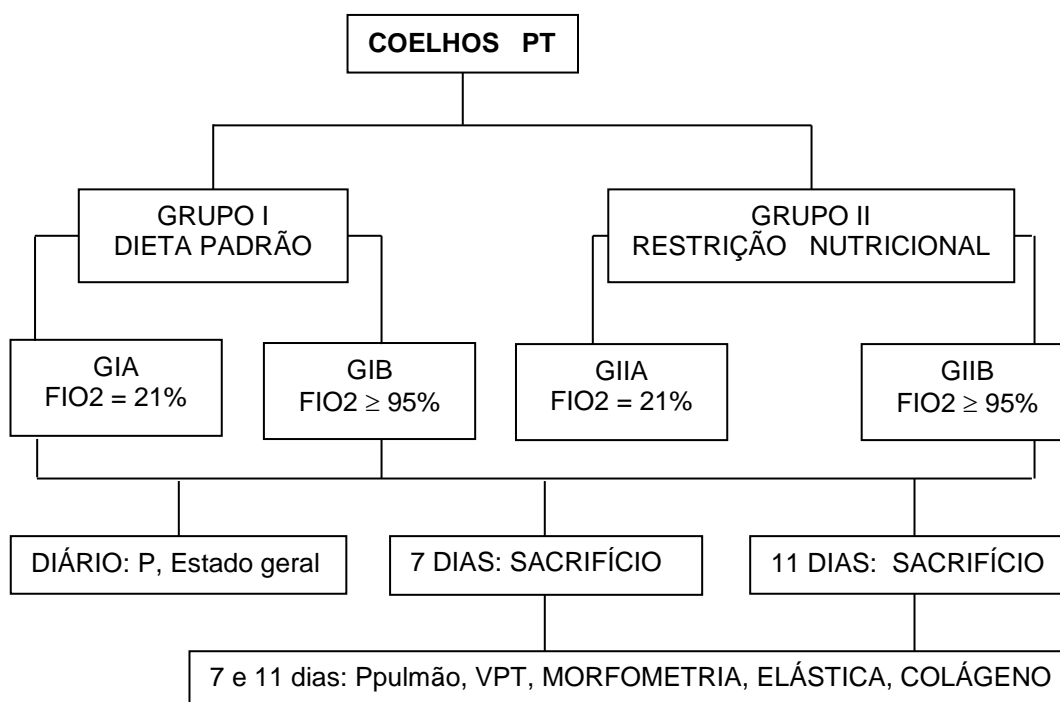
para pertencerem ao grupo oxigênio a 95%, ou ar ambiente, como também ao grupo dieta padrão ou restrição nutricional.

3.1.5. Grupos de Estudo

De acordo com o regime de alimentação:

- . Grupo I – animais que foram alimentados com dieta padrão:
 - . Grupo IA : $FiO_2 = 21\%$
 - . Grupo IB : $FiO_2 \geq 95\%$
- . Grupo II – animais que foram submetidos à restrição nutricional:
 - . Grupo IIA : $FiO_2 = 21\%$
 - . Grupo IIB : – $FiO_2 \geq 95\%$

3.1.6. Desenho do estudo



Realizou-se diariamente avaliação do estado geral e do peso de cada animal. Dentre estes, foram escolhidos animais, aleatoriamente aos 7 e 11 dias de vida, para o sacrifício.

3.1.7. Métodos para a manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em incubadoras (Fanem®, São Paulo, Brasil) a uma temperatura entre 30 e 32° C. Os controles diários, incluíram: peso (os animais foram pesados pela manhã, com balança analítica de precisão – TR 403, Denver Instrument Company®)), presença e característica dos pêlos, atividade física (movimentação), estado geral (coloração, aceitação alimentar, distensão abdominal).

Para controle de infecção, além dos cuidados especiais com a alimentação, que serão descritos abaixo, as incubadoras foram lavadas antes de cada período de estudo, a água destilada utilizada nos nebulizadores foi esterilizada e a maravalha (serragem) especial para coelhos prematuros, autoclavada. Após o terceiro dia de vida, os animais foram rotineiramente medicados com penicilina cristalina (20.000 UI/kg/d) e estreptomicina (20 mg/kg/dia), por via intramuscular, em dose única pela manhã.

Devido à possibilidade de óbito por hemorragia pulmonar, administrou-se Vitamina K injetável, via intramuscular, 0,002 mg/kg/dia, no terceiro dia de vida.

3.1.8. Alimentação

Utilizou-se uma fórmula láctea, com composição semelhante à do leite natural de coelha (Sogorb et al, 1991). Para o grupo submetido à restrição nutricional, administrou-se 70% da oferta utilizada através da dieta padrão (Quadros 1 e 2).

QUADRO 1 – COMPONENTES DA DIETA PADRÃO E DA DIETA DE RESTRIÇÃO

Tipo de dieta	Padrão	Restrição
Fórmula AL 110 (Nestlé®) (g)	5,0	3,5
Caseical (Support®)(g)	5,0	3,5
Trigliceril CM AGE (Support®) (ml)	15,0	10,5
Vitanove® (gota)	1	1
Água destilada	QSP 100ml	QSP 100ml

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DA DIETA PADRÃO E DA DIETA DE RESTRIÇÃO (POR 100 ML DE FÓRMULA RECONSTITUÍDA)

	PADRÃO	RESTRIÇÃO
Proteínas (g)	5,3	3,7
Aminoácidos livres / caseína	12/88	12/88
Gorduras (g)	16,2	11,3
Gordura láctea (%)	8	8
Lecitina de soja (%)	1	1
Óleo de milho (%)	21	21
TCM (%)	70	70
Glicídios (g)	2,8	1,9
Dextrino-maltose (%)	100	100
Sódio (mg)	8,5	6,0
Potássio (mg)	30	21
Cálcio (mg)	24	16
Fósforo (mg)	15	10,5
Vitamina A (UI)	115	95
Cobre (mg)	0,015	0,010
Energia (kcal)	155	109

Todos os animais foram alimentados duas vezes ao dia, utilizando-se sonda orogástrica nº 4, adaptada a uma seringa graduada para o controle do volume administrado.

Administrou-se a dieta, a partir da quarta hora de vida e, a seguir os seguintes volumes das respectivas dietas, de acordo com cada grupo de estudo: primeiro dia de vida-100 ml/kg/d; segundo dia de vida-150 ml/kg/d; terceiro ao décimo-primeiro dia de vida-200 ml/kg/d.

As sondas e os animais foram manipulados com o uso de luvas de látex para procedimentos, sendo que, após a administração de leite para cada animal, a sonda era limpa com gase embebida em álcool etílico a 70% e, em seguida, com gase embebida em água destilada.

3.1.9. Oxigenoterapia

Administrou-se oxigênio aquecido e umidificado, com nebulizadores neonatais (Intermed ®, São Paulo, Brasil), através de uma câmara de acrílico selada, mantida em uma temperatura constante de 30° a 32°C. Mediu-se a concentração de oxigênio, através de oxímetro de ar ambiente (Dixtal®, São Paulo).

3.1.10. Sacrifício dos animais

Os animais randomizados para cada grupo de estudo foram sacrificados por secção da aorta abdominal, após sedação profunda com

injeção intraperitoneal de pentobarbital (25 mg/kg), no 7º e 11º dias após o nascimento, seguido da dissecação e fixação dos pulmões.

3.2. Processamento para a análise histológica pulmonar

Após o sacrifício, procedeu-se à incisão da parede abdominal e secção da aorta abdominal, a fim de evitar a ocorrência de sangramento pulmonar. Realizou-se a traqueostomia, com canulação da traquéia, utilizando-se cânulas de metal de 1 mm de diâmetro. Produziu-se pneumotórax bilateral, puncionando-se o diafragma na sua superfície abdominal. Após, conectou-se a cânula a uma coluna de água e inflou-se os pulmões a uma pressão de 30 cm de H₂O, seguida de ligadura de traquéia. Após cuidadosa dissecação com lupa (aumento de 2X), os pulmões foram removidos do tórax e mergulhados em uma solução de formol tamponado a 10%.

Após 24 horas de exposição ao formol tamponado a 10%, os pulmões foram pesados. A seguir, foram separados, sendo cada volume medido individualmente por deslocamento de água (Scherle, 1970).

Após estas medidas, utilizando-se a porção distal do lobo inferior direito, removeu-se blocos de tecido de 1 mm de espessura em planos sagitais. Estes tecidos foram conservados em álcool etílico a 70% até o seu embebimento em parafina, sendo, então, obtidos cortes seriados de 5µm de espessura. Realizou-se os cortes de tecido para a análise histológica

pulmonar, de maneira sistemática e padronizada. A análise histológica pulmonar incluiu análise da morfometria pulmonar e do conteúdo e características da elastina, e do colágeno nestes pulmões.

Utilizou-se as seguintes colorações: hematoxilina e eosina para análise morfométrica; Weigert, resorcina-orceína modificado, para as fibras elásticas; Picrosirius para o colágeno (Junqueira et al, 1978).

A análise morfométrica foi realizada por um mesmo investigador de maneira cega. Observou-se o desenvolvimento estrutural do pulmão representado pela alveolização, através da determinação do número de alvéolos, do intercepto linear médio (ILm) e da área de superfície interna alveolar (ASI). Analisou-se, também, a porcentagem de espaço aéreo e tecidual e de proliferação fibroendotelial. Quantificou-se as fibras elásticas e colágeno no tecido conjuntivo alveolar e nos septos alveolares.

A fase de experimentação animal foi realizada no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental (UPE) do Departamento de Pediatria da FMUSP, sob orientação do Dr Celso Rebello.

A análise morfométrica pulmonar foi realizada conjuntamente com a Unidade de Pesquisa Experimental (UPE) do Departamento de Pediatria da FMUSP e o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, inicialmente sob orientação da Dra Marisa Dolhnikoff e do Prof. Dr Paulo Hilário Saldiva.

Analisou-se o crescimento pulmonar, através das medidas de peso e volume pulmonares.

3.3. Peso corpóreo

Pesou-se todos os coelhos no dia do sacrifício, além do seu peso diário. Foi utilizada uma balança analítica de precisão, TR 403, Denver Instrument Company®, e foram obtidas medidas em triplicata, sendo realizada a média aritmética das medidas, para a determinação do peso.

O cálculo do peso médio diário baseou-se na média aritmética do peso de todos os coelhos, em cada grupo e em cada dia de duração do estudo.

3.4. Peso pulmonar

Após 24 horas de fixação do pulmão, retirou-se o coração e pesou-se o pulmão em triplicata, com balança analítica de precisão, TR 403, Denver Instrument Company®, e calculou-se a média aritmética das medidas.

Determinou-se a relação do peso do pulmão/peso corpóreo do coelho no momento do sacrifício (PP/PC), com o objetivo de minimizar os possíveis efeitos do crescimento somático sobre o pulmonar .

3.5. Volume pulmonar total

A determinação do volume pulmonar total foi feita através da técnica baseada no princípio de Arquimedes (Scherle, 1970). Após a fixação inicial,

o pulmão insuflado era mergulhado em água, observando-se o deslocamento da coluna líquida. Para este fim, foi utilizada uma seringa de vidro de 30 ml, conectada através de um tubo flexível a uma pipeta de 2 ml, graduada em intervalos de 0,01 ml (Bruce et al., 1989). Realizou-se as medidas em triplicata, calculando-se a média dos valores. Se dois valores diferiram em mais do que 0,05 ml, repetiu-se a medida em triplicata. Não foi utilizado fator de correção para os valores úmido e desidratado, pois todos os pulmões foram processados de maneira idêntica.

3.6. Volume pulmonar específico (ml/100gramas peso corpóreo)

O volume pulmonar total foi corrigido em relação ao peso corpóreo do animal (ml/100gramas de peso corpóreo). Considerando-se que um menor crescimento somático generalizado poderá contribuir para um menor desenvolvimento do pulmão e, conseqüentemente, um menor volume, com o objetivo de minimizar este efeito sobre a medida do volume pulmonar total, utilizou-se o fator de correção para o peso corpóreo do animal (Frank, 1987).

3.7. Análise morfométrica

Utilizou-se microscópio Nikon E-600, com um radículo acoplado a uma das oculares, com 100 pontos e 50 retas, para a realização da análise

morfométrica. Para contagem do número de alvéolos e para a medida de espessura do septo alveolar, foi usado o analisador de imagem Pro – Image.

3.7.1. Contagem do número de alvéolos

Utilizou-se o método proposto por Dunnill (1962) modificado.

Fotografou-se cada lâmina (coloração HE), em aumento de 100X, através de um analisador de imagens (Imagem – Pro). Foram fotografados cortes seriados de três retas traçadas no corte, de pleura a pleura, em locais distintos deste corte. Estas imagens foram projetadas no monitor do computador e procedeu-se à contagem dos interceptos das paredes alveolares, nas três retas traçadas de pleura a pleura. Após, realizou-se a soma dos interceptos e dividiu-se-a por dois, obtendo-se o número de alvéolos e a média aritmética do número de alvéolos das três retas. No analisador, mediu-se o comprimento de cada reta. O número médio de alvéolos por corte foi calculado a partir da contagem de todas as retas, bem como o número por unidade de área (número de alvéolos X 10^3 cm).

3.7.2. Intercepto alveolar linear médio (ILm) (Dunnill, 1962)

Esta técnica baseou-se no método para encontrar a área de superfície de pequenos objetos, através de sua área de projeção. Representa as dimensões dos alvéolos e a distância entre os septos interalveolares. Analisou-se 10 campos em aumentos de 100X.

Considerou-se como intercepto, a linha que cruza o septo alveolar. Os alvéolos que tocavam, mas não cruzavam a parte superior e à esquerda da grade foram contados, e os que tocavam, mas não cruzavam a parte inferior e a reta à direita da grade, não foram contados.

O intercepto linear médio foi calculado como:

$$ILm = NL / m = \frac{\text{comprimento total das retas}}{\text{Número de interceptos alveolares}}$$

No aumento 100X, cada reta média 100 μ m e, o radículo, continha 50 retas, portanto o comprimento total das retas foi de 5000. Analisou-se 10 campos por animal.

Nos cortes com lesão importante, realizou-se o intercepto em aumento 400X e leu-se 20 campos por animal. No aumento 400X, cada reta média 25 μ m e o radículo continha 50 retas, portanto o valor do comprimento total das retas foi de 1250.

3.7.3. Área de superfície interna (ASI) (Thurlbeck, 1967; Frank, 1987)

Representa a interface ar – tecido.

$ASI = 4 V / ILm \text{ (cm}^2 \text{)}$ onde:

V = volume pulmão fixado (distendido a 25 cm – 30 cm H₂O), conforme medido pelo método de deslocamento de água, multiplicado pela fração de parênquima, determinada pela contagem de pontos.

3.7.4. Contagem de parênquima

Não considerou-se como parênquima, vasos sanguíneos e brônquios >2 mm diâmetro. Contou-se como parênquima, na grade de retas e pontos, todos os pontos que caíam sobre tecidos, exceto os descritos acima (Dunnill, 1962; Thurlbeck, 1967; Frank, 1987). Contou-se o número de pontos que caíam no parênquima e, dividiu-se-os por 100.

3.7.5. Medida da espessura do septo interalveolar

Mediu-se 50 septos alveolares, em aumento 400X, através do analisador de imagem Pro- Image. Traçou-se uma linha entre as membranas basais do epitélio, e estas foram medidas através do analisador de imagem. Após, calculou-se a média destes septos.

3.7.6. Densidade de fibras elásticas

Utilizando-se um radículo de 100 pontos e 50 retas, na objetiva, com calibração de um aumento de 400 X, determinou-se a proporção de volume de fibras elásticas no parênquima pulmonar, como uma relação entre o número de pontos que caem entre o tecido corado, correspondendo aos pontos que caíram nas fibras elásticas, e os que caíram no parênquima. Os pontos que caíram sobre as vias aéreas e os vasos, foram excluídos. Foram analisados 20 campos (Dolhnikoff et al, 1999).

3.7.7. Densidade de colágeno

Utilizando-se um radículo de 100 pontos e 50 retas, na objetiva e, luz polarizada, com calibração de um aumento de 400 X, determinou-se a proporção de volume de colágeno no parênquima pulmonar, como uma relação entre o número de pontos que caíam em tecido corado, correspondendo aos pontos no colágeno e os que caíram no parênquima. Os pontos que caíram sobre as vias aéreas e os vasos foram excluídos. Foram analisados 20 campos (Dolhnikoff et al, 1999).

3.8. Análise Estatística

Criou-se um banco de dados no Excel e, a partir deste banco de dados, realizou-se a análise estatística das variáveis antropométricas, da análise morfométrica, da densidade de fibras elásticas e de colágeno.

As variáveis foram descritas através dos valores mínimo e máximo, mediana, média e desvio padrão.

Os grupos foram comparados quanto ao peso pulmonar, peso pulmonar/peso corpóreo, volume pulmonar total, volume pulmonar específico, número de alvéolos, espessura de septo interalveolar, intercepto alveolar linear médio, área de superfície interna alveolar, densidade de fibras elásticas e de colágeno utilizando-se a análise de variância (Rosner, 1986).

Já para a comparação dos grupos quanto ao peso médio ao longo do estudo, utilizou-se a análise de variância para medidas repetidas (Timm, 1975). A suposição de distribuição normal das variáveis foi verificada pela construção de gráficos descritivos e as comparações múltiplas foram realizadas com base na estatística de Wald (Agresti, 1990). A sobrevivência de cada um dos grupos foi estimada pelo método de Kaplan-Meier (Sch; Prentice, 1980), comparada através do teste de log-rank (Sch; Prentice, 1980). Para análise do ganho de peso médio dos grupos do estudo, utilizou-se o teste de diferença das médias.

O nível de significância adotado em todas as análises estatísticas foi menor do que 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram submetidas à cesárea 158 coelhas, tendo 10 sido excluídas, nesse momento, 4 devido a erro de data em relação ao tempo de gestação e 6 por infecção amniótica. Portanto, incluiu-se no estudo 148 fêmeas. Destas, nasceram 918 filhotes, dos quais foram retirados da casuística 14 com má-formação e 4 por óbito fetal. Portanto, haviam 900 filhotes, dos quais sobreviveram 792 após a primeira hora de vida. Foram, então, randomizados 792 coelhos prematuros em 2 grupos de estudo: grupo I (dieta padrão) 352 coelhos e grupo II (restrição nutricional) 440 coelhos.

No Grupo I (GI), 120 permaneceram em ar ambiente (GIA) e 232 foram mantidos com concentrações de oxigênio $\geq 95\%$ (GIB).

No Grupo II (GII), dos 440 coelhos prematuros incluídos, 72 permaneceram em ar ambiente (GIIA) e 368 foram mantidos em concentrações de oxigênio $\geq 95\%$ (GIIB).

No GIA foram sacrificados 19 coelhos aos 7 dias de vida e 19, aos 11 dias de vida. Foram analisados 17 coelhos aos 7 dias, pois 2 foram excluídos por apresentarem broncopneumonia e 18 coelhos aos 11 dias,

devido a qualidade técnica inadequada do material processado para realização da lâmina.

No GIB, 19 coelhos foram sacrificados aos 7 dias de vida e 17 aos 11 dias de vida. Dos 19 coelhos sacrificados aos 7 dias, 17 foram analisados, pois 2 desenvolveram broncopneumonia e foram excluídos.

No GII, dos 72 coelhos mantidos em ar ambiente (GIIA), 21 foram sacrificados aos 7 dias e 24 aos 11 dias.

Já no GIIB, dos 368 coelhos prematuros randomizados, 23 foram sacrificados aos 7 e 23 aos 11 dias de vida. No entanto, aos 7 dias, neste grupo, foram analisadas 22 lâminas, pois 1 lâmina estava com qualidade técnica inadequada (figura 1).

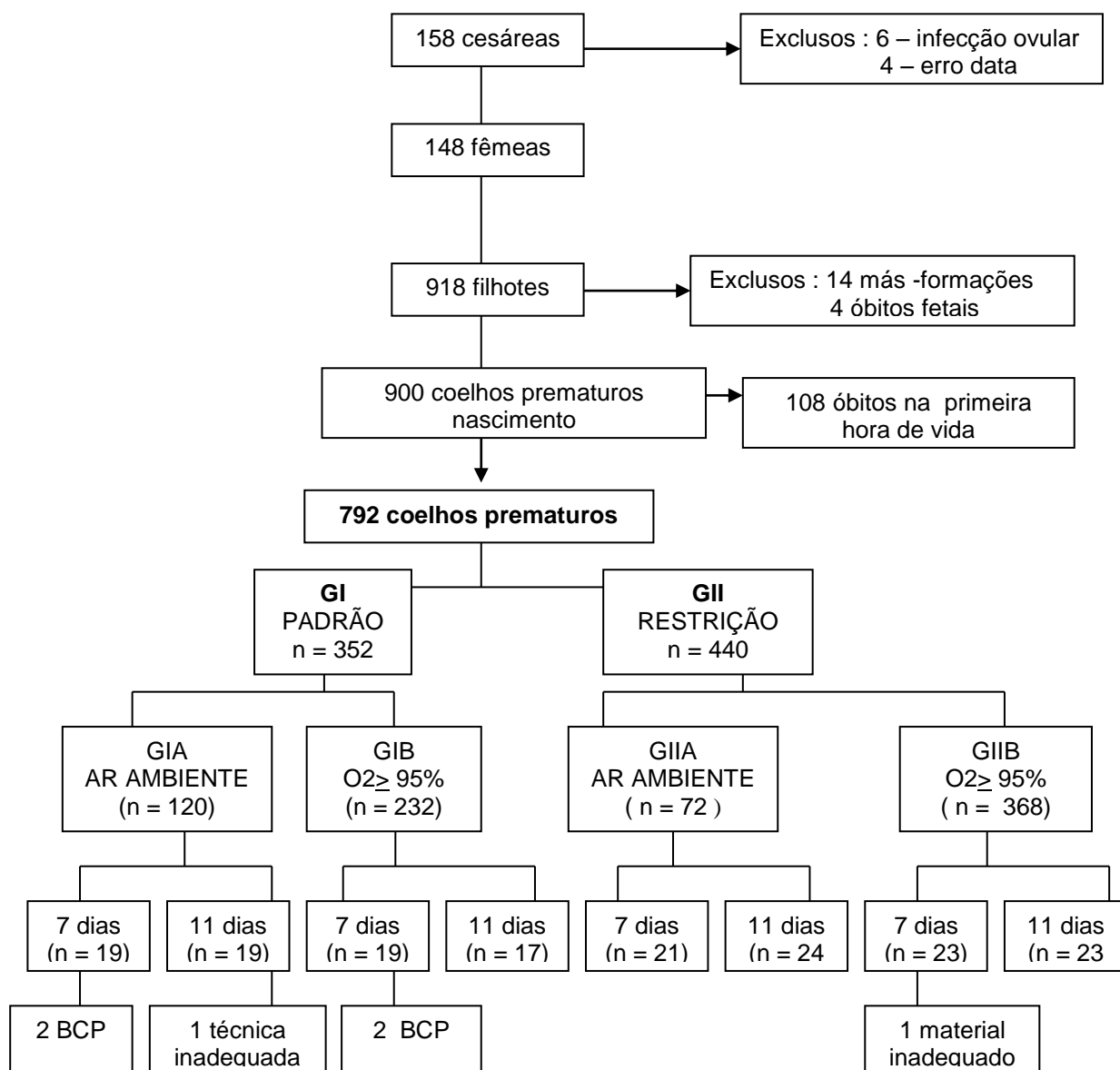


FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DE COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS DE VIDA, DE ACORDO COM A DIETA E AS CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO ADMINISTRADAS

4.1. Evolução dos animais estudados

4.1.1. Sobrevida

A sobrevida geral entre os coelhos randomizados foi de 20,8%.

A sobrevida entre os grupos que receberam o mesmo regime alimentar e diferentes concentrações de oxigênio, como I A e IB, foi de 32% e 16,0%, respectivamente. Estes resultados evidenciam uma maior sobrevida entre os que foram mantidos em ar ambiente.

Da mesma maneira, nos grupos submetidos à restrição nutricional, observou-se uma sobrevida de 62,5% no GIIA e, no GIIB, de 13,0%, verificando-se também uma maior sobrevida entre os que foram mantidos em ar ambiente (Tabela 1).

O grupo com maior sobrevida foi o GIIA, seguido pelo GIA, enquanto os grupos GIB e GIIB foram os grupos com menor sobrevida, não havendo diferença estatística entre eles ($p = 0,3755$).

Os óbitos ocorreram por: infecção (pele, sistêmica), perfuração gastrointestinal, aspiração, distensão abdominal e sem causa definida.

TABELA 1 – MORTALIDADE DE COELHOS PRÉ-TERMO, DE ACORDO COM A DISTRIBUIÇÃO EM CADA GRUPO

Grupo	n (%)		Total
	Sacrifício	Óbito	
Grupo IA	38 (32%)	82(68%)	120
Grupo IB	36 (16%)	196 (84%)	232
Grupo IIA	45 (62,5%)	27 (37,5%)	72
Grupo IIB	46 (13%)	322 (88%)	368

GIAXGIB- $p < 0,0001$ GIBXGIIB- $p = 0,3755$ GIAXGIIA- $p < 0,0001$ GIIAXGIIB- $p = 0,0004$

P(sobreviver)

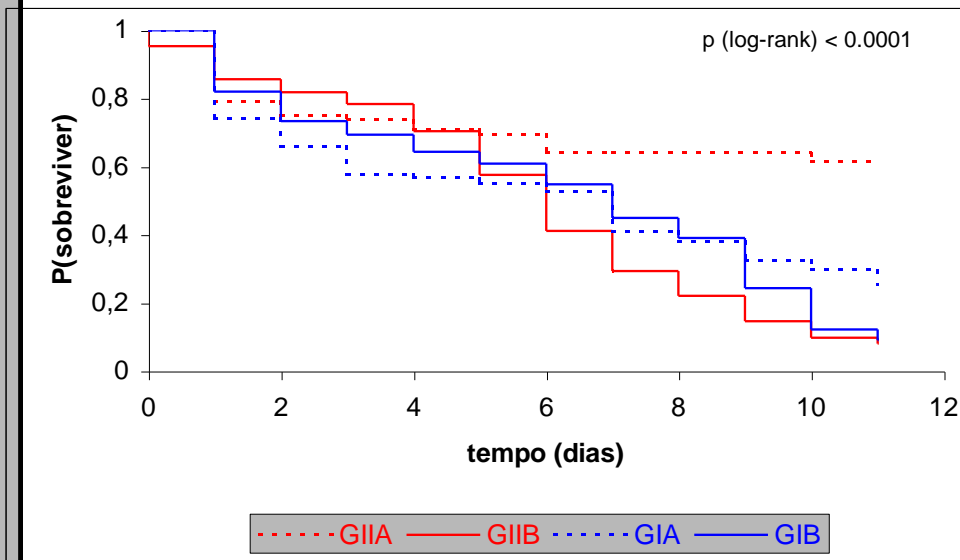


FIGURA 1- EVOLUÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE COELHOS PRÉ-TERMO, DE

ACORDO COM OS GRUPOS ESTUDADOS, DURANTE 11 DIAS

TABELA 2 – VALORES DE p EM RELAÇÃO ÀS COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DA SOBREVIDA DURANTE 11 DIAS NOS DIFERENTES GRUPOS

Grupo	GIA	GIB	GIIB
GIA		0,2732	
GIIA	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
GIIB	0,0115	0,0153	

O GIIB apresentou a maior sobrevivência entre os grupos. Até o 4º dia de vida, os valores são comparáveis. Ocorreu uma tendência de redução da sobrevivência, em todos os grupos, entre o 5º e o 6º dias de vida.

4.1.2. Evolução ponderal**4.1.2.1. Curva de peso médio diário, ao longo do tempo, de todos os coelhos do estudo**

Analisou-se a evolução ponderal dos 792 coelhos pré-termo randomizados, subdivididos nos 4 grupos, através da curva de médias de pesos diários (Gráfico 2, Tabela3, Anexo A) .

Observou-se uma perda de peso até o D1 no GI (GIA - 4,76% e GIB - 3,9% do peso de nascimento) e, até o D2, no GII (GIIA - 7,6% e GIIB - 6,6% do peso de nascimento). A partir do D3, todos os grupos ganharam peso, embora o ganho de peso fosse menor a partir do D4, ($p < 0,0001$) no GIIB, em relação ao GIA e GIB. A partir do D8, GIIA apresentou menor ganho de peso em relação ao GIA e GIB, mantendo-se assim até o D11 (Gráfico2) (Tabela 3).

Entre os grupos submetidos à dieta padrão, o grupo submetido à hiperoxia (GIB) apresentou maiores médias de peso diárias que o GIA, entre o 7º e o 10º dias de vida ($p < 0,05$), sendo que, no 11º dia, não houve diferenças entre as médias diárias de peso entre os 2 grupos. Também, não se observou diferença entre as médias diárias de peso no GIIB em relação ao GIIA (Gráfico 2) (Tabela 3).

Os coelhos do GIIB recuperaram o peso de nascimento apenas no D5, enquanto os demais apresentaram esta recuperação no D4.

GRÁFICO 2 – PESO MÉDIO DIÁRIO DE COELHOS PRÉ-TÉRMO, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO, NOS PRIMEIROS 11 DIAS DE VIDA

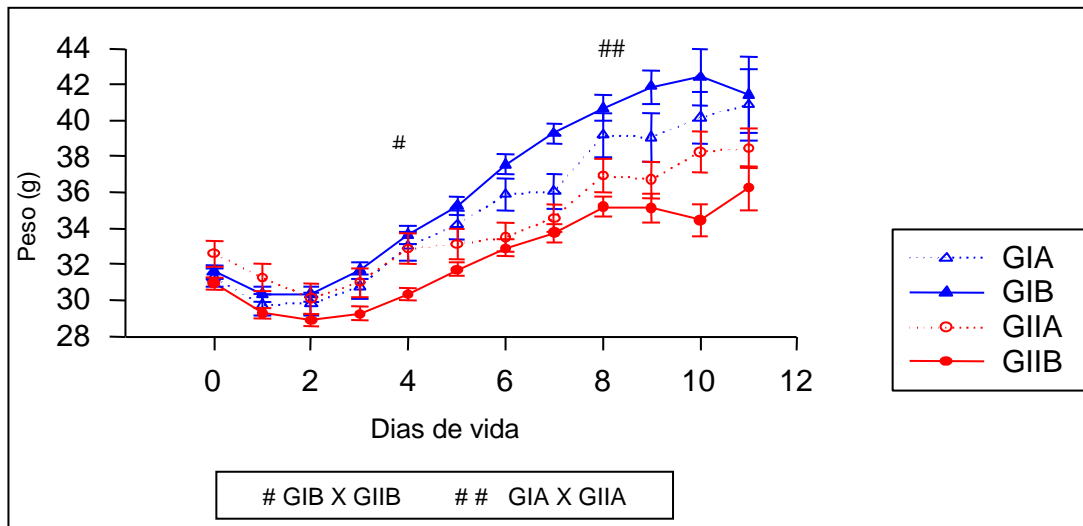


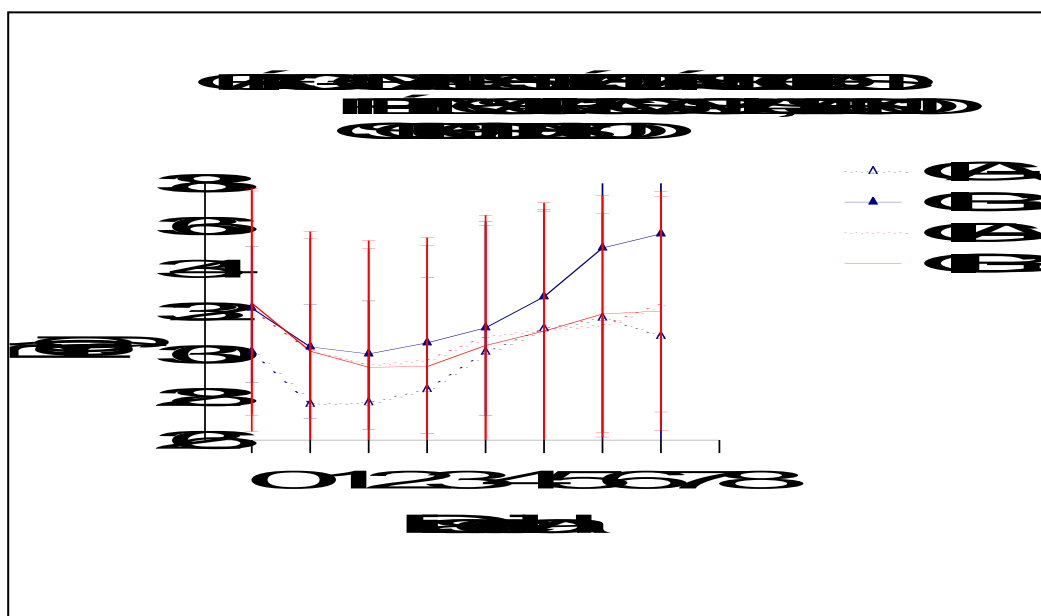
TABELA 3 – ANÁLISE DAS MÉDIAS DIÁRIAS DE PESO (ANOVA)

HIPÓTESE (H0)	GL	P
Grupos iguais no D4	3	<0,0001
GIIA = GIIB no D4	1	0,0082
GIA = GIIB no D4	1	0,0009
GIIB = GIB no D4	1	< 0,0001
Grupo iguais no D5	3	< 0,0001
GIA = GIB no D5	1	< 0,0001
GIIB = GIB no D5	1	< 0,0001
Grupos iguais no D6	3	<0,0001
GIIA =GIA no D6	1	0,0186
GIIA = GIB no D6	1	<0,0001
GIA = GIIB no D6	1	<0,0001
GIIB = GIB no D6	1	<0,0001
Grupos iguais no D7	3	<0,0001
GIIA = GIB no D7	1	< 0,0001
GIA = GIIB no D7	1	< 0,0001
GIA = GIB no D7	1	0,0017
Grupos iguais no D8	3	<0,0001
GIIA = GIA no D8	1	0,013
GIIA = GIB no D8	1	<0,0001
GIA = GIIB no D8	1	<0,0001
GIA = GIB no D8	1	0,0093
GIIB = GIB no D8	1	<0,0001
Grupos iguais no D9	3	<0,0001
GIIA = GIA no D9	1	0,0004
GIIA = GIB no D9	1	<0,0001
GIA = GIIB no D9	1	<0,0001
GIA = GIB no D9	1	0,0048
GIIB = GIB no D9	1	<0,0001
Grupos iguais no D10	3	<0,0001
GIIA = GIA no D10	1	0,0012
GIIA = GIIB no D10	1	0,0067
GIIA = GIB no D10	1	<0,0001
GIA = GIIB no D10	1	0,0203
GIIB = GIB no D10	1	<0,0001
Grupos iguais no D11	3	<0,0001
GIIA = GIA no D11	1	<0,0001
GIIA = GIIB no D11	1	0,2464
GIIA = GIB no D11	1	<0,0001
GIA = GIIB no D11	1	<0,0001
GIA = GIB no D11	1	0,2114
GIIB = GIB no D11	1	<0,0001

4.1.2.2. Evolução ponderal dos coelhos sacrificados

Analisando-se a evolução da média de peso entre os coelhos sacrificados, verificou-se que:

- **aos 7 dias de vida:** Nos grupos GIA (n = 19), GIB (n =19), GIIA (n = 21) e GIIB(n = 23) ocorreu uma perda de peso importante do D0 ao D1. No GIA, a partir do D1 o peso estabilizou-se e, a seguir, houve um ganho de peso progressivo até o D6. Nos outros grupos, ocorreu uma perda de peso até o D2 e, a partir do D3, este começou a se elevar (Gráfico 3, Anexo B).



Como a média dos pesos de nascimento do GIA foi menor que a do GIIA, realizou-se o teste de diferença das médias entre o peso de nascimento e o peso no momento do sacrifício, em todos os grupos.

O ganho de peso, verificado através deste (Tabela 4, Gráfico 5, Anexo D), foi maior no GIB, de forma estatisticamente significativa, em relação ao GIIB ($p = 0,0001$), não havendo diferença entre GIA e GIIA ($p = 0,6481$). Neste dia, o ganho de peso de GIB foi maior do que o do GIA ($p = 0,0085$) e, não se observou diferença estatisticamente significativa entre o ganho de peso do GIIA em relação ao GIIB ($p = 0,548$).

- **aos 11 dias de vida** – Nos grupos GIA ($n = 19$), GIB ($n = 17$), GIIA ($n = 24$), GIIB ($n = 23$), ocorreu uma perda de peso até o D1 e, a partir do D3, elevação progressiva em todos os grupos. O GIA apresentou maior ganho de peso do que o GIIA a partir do D8 ($p = 0,013$) e o GIB, em relação ao GIIB, desde o D4 ($p < 0,0001$). Os grupos GIA, GIB, GIIA recuperaram o peso de nascimento no D4, enquanto o GIIB, somente o fez no D8 (Gráfico 4, Anexo C).

Como a média dos pesos de nascimento do GIA foi menor que a do GIIA, realizou-se o teste de diferença das médias entre o peso de nascimento e o peso no momento do sacrifício, em todos os grupos.

O ganho de peso através da diferença das médias (Tabela 4, Gráfico 5, Anexo D) foi maior, de forma estatisticamente significativa, no GIB em relação ao GIIB ($p = 0,0001$) e, no GIA em relação ao GIIA ($p = 0,0001$). Não observou diferenças em relação ao ganho de peso, entre GIA e GIB ($p = 0,219$) e GIIA e GIIB ($p = 0,563$)

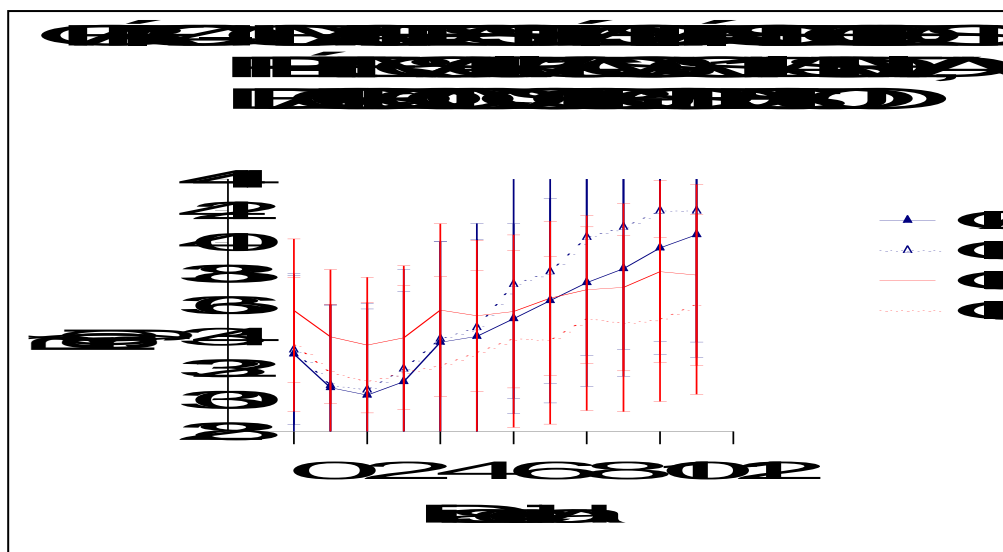


GRÁFICO 5 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS ENTRE O PESO DE NASCIMENTO E O PESO NO MOMENTO DO SACRIFÍCIO DE COELHOS PRÉ-TERMO AOS 7 E 11 DIAS DE VIDA, NOS GRUPOS DE ESTUDO

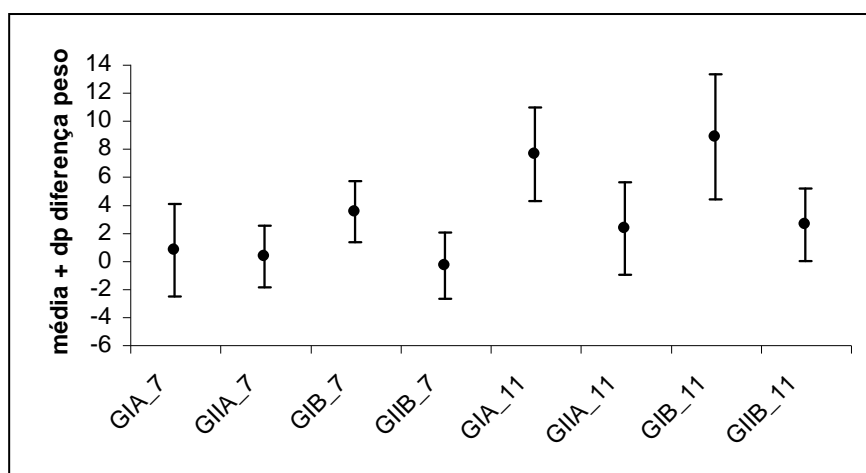


TABELA 4 – ANÁLISE DE DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DOS PESOS DE NASCIMENTO E DOS PESOS NO MOMENTO DO SACRIFÍCIO, ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO

Hipótese (H0)	GL	P
GIA7= GIIA7	1	0.6481
GIB7= GIIB7	1	0.0001
GIA7= GIB7	1	0.0085
GIIA7 = GIIB7	1	0,548
GIA11= GIB11	1	0.2193
GIB11= GIIB11	1	<.0001
GIA11= GIIA11	1	<.0001
GIIA11= GIIB11	1	0,563

4.2. Efeitos pulmonares

4.2.1. Crescimento

4.2.1.1. Peso e volume pulmonares

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 5 e 6 e gráficos 6,7,8 e 9 :

TABELA 5 – PESO PULMONAR (PP), PESO PULMONAR/ PESO CORPÓREO (PP/PC), VOLUME PULMONAR TOTAL (VPT), VOLUME PULMONAR ESPECÍFICO (VPE), EM COELHOS PRÉ-TERMO, NOS GRUPOS AOS 7 DIAS

7 dias	GIA (n = 17)	GIB (n = 17)	GIIA (n = 21)	GIIB (n = 22)
PP (g)	0,83 ± 0,19 [#]	0,96 ± 0,28 ^{**}	0,64 ± 0,16 [*]	0,77 ± 0,21
PP/PC	0,027 ± 0,006 [#]	0,027 ± 0,008	0,019 ± 0,004 [*]	0,024 ± 0,005
VPT (ml)	2,42 ± 1,22 [#]	2,65 ± 2,20 ^{**}	1,53 ± 0,54 [*]	1,10 ± 0,48
VPE (ml/100g)	7,77 ± 3,57 [#]	7,30 ± 5,80 ^{**}	4,77 ± 1,61 [*]	3,43 ± 1,48

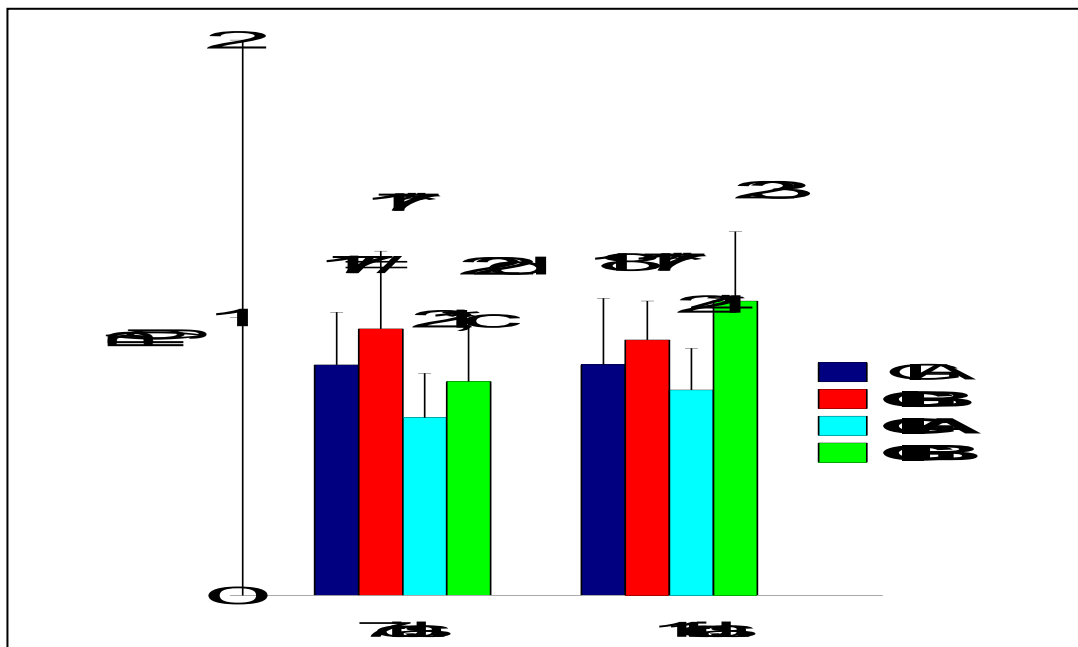
^{*}, [#], ^{**} p < 0,05 ^{*} GIIA X GIIB [#] GIA X GIIA ^{**} GIB X GIIB

TABELA 6 – PESO PULMONAR(PP), PESO PULMONAR/PESO CORPÓREO (PP/PC), VOLUME PULMONAR TOTAL(VPT), VOLUME PULMONAR ESPECÍFICO(VPE), EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 11 DIAS DE VIDA, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO

11 dias	GIA (n = 18)	GIB (n = 17)	GIIA (n = 24)	GIIB (n = 23)
PP (g)	0,83 ± 0,24	0,92 ± 0,14 ^{**}	0,74 ± 0,15 [*]	1,06 ± 0,25
PP/PC	0,020 ± 0,005	0,022 ± 0,003 ^{**}	0,019 ± 0,003 [*]	0,029 ± 0,006
VPT (ml)	2,63 ± 1,83 [#]	1,93 ± 0,80	1,54 ± 1,05	1,58 ± 0,93
VPE (ml/100g)	6,36 ± 3,59 [#]	4,67 ± 1,74	4,13 ± 2,76	4,40 ± 2,66

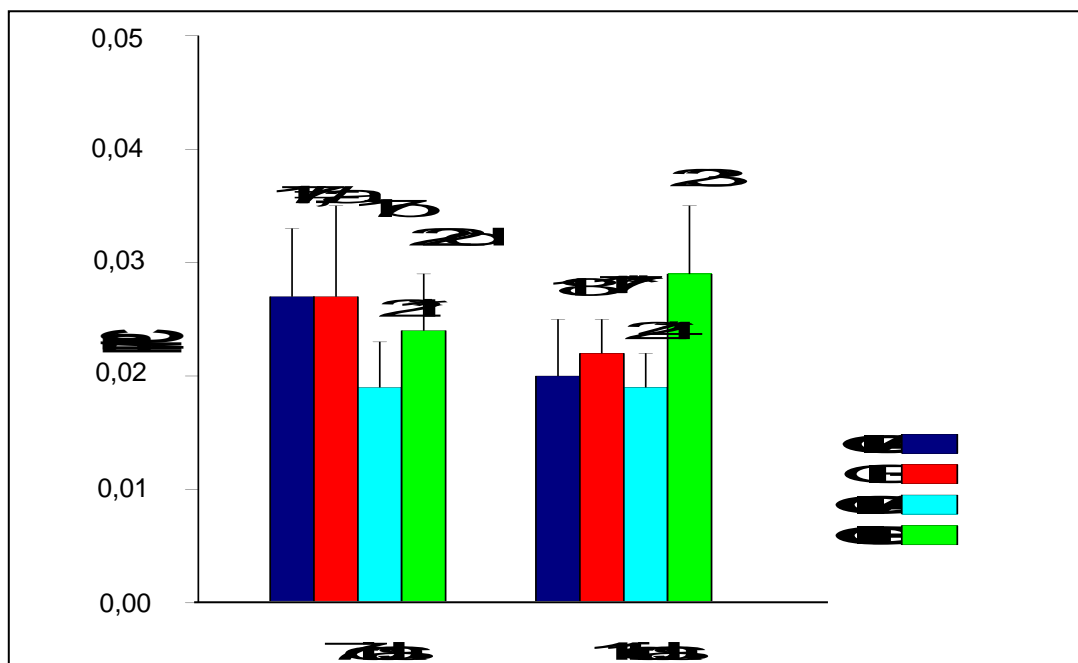
^{*}, [#], ^{**} p < 0,05 ^{*} GIIA X GIIB [#] GIA X GIIA ^{**} GIB X GIIB

GRÁFICO 6 – PESO PULMONAR (g), EM COELHOS PRÉ-TERMO AOS 7 E 11 DIAS DE VIDA, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO



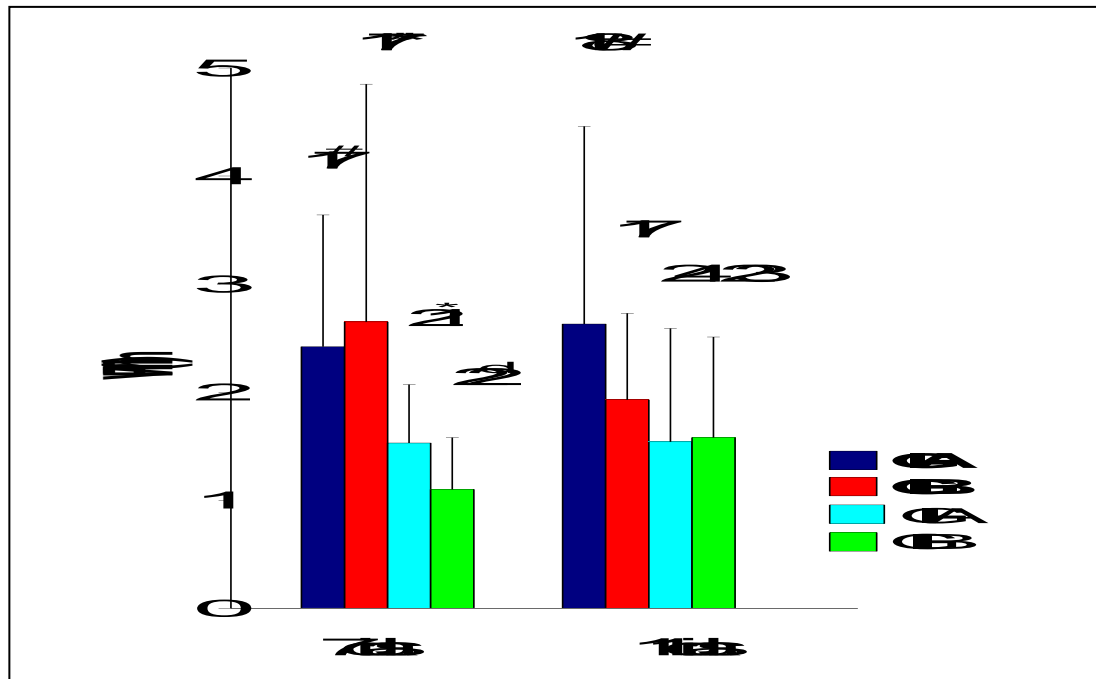
*, #, **, c, d p < 0,05 * GIA X GIIB # GIA X GIIA ** GIB X GIIB c – GIA 7x GIA11
d – GIIB7 x GIIB11

GRÁFICO 7 – PESO PULMONAR / PESO CORPÓREO, EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO



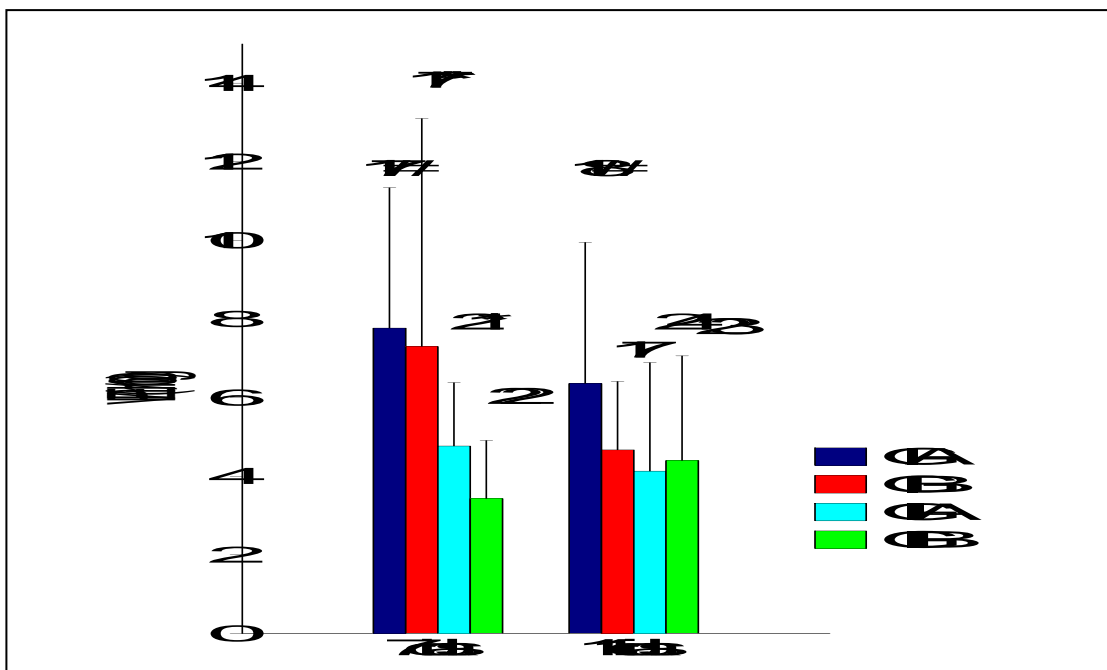
*, #, **, a, b, d p < 0,05 * GIA X GIIB # GIA X GIIA ** GIB X GIIB a- GIA7 X GIA11
b – GIB7 X GIB11 d – GIIB7 X GIIB11

GRÁFICO 8 – VOLUME PULMONAR TOTAL (VPT)(ml), EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, NOS GRUPOS DE ESTUDO



*, #, **, d p < 0,05 * GIA X GIB # GIA X GIIA ** GIB X GIIB d – GIIB7 X GIIB11

GRÁFICO 9 – VOLUME PULMONAR ESPECÍFICO (VPE)(ml/100g), EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, NOS GRUPOS DE ESTUDO



*, #, **, p < 0,05 * GIA X GIB # GIA X GIIA ** GIB x GIIB

- **PP, PP/ PC, VPT e VPE, entre os grupos submetidos a diferentes ofertas de oxigênio, mas com dieta padrão**

- **GIA e GIB:**

Aos 7 dias, da mesma forma que aos 11 dias de vida , entre os coelhos que receberam dieta padrão (GIA e GIB),mas diferentes ofertas de oxigênio, os pesos pulmonares, PP/PC, VPT e VPE foram semelhantes;

Considerando-se o PP/PC , verificou-se que foi maior aos 7 dias do que aos 11 dias (GIA7 x GIA11 $p = 0,0002$) e (GIB7 X GIB11 $p = 0,019$).

Em relação ao Peso de pulmão, VPT e VPE, não houve diferenças entre os 7 e 11 dias, tanto no GIA quanto no GIB.

- **PP, PP/ PC, VPT e VPE entre os grupos submetidos a diferentes ofertas de oxigênio, mas submetidos à restrição nutricional**

- **GIIA e GIIB:**

Aos 7 e aos 11 dias de vida, o grupo submetido à hiperoxia (GIIB) apresentou maiores P pulmão (7 dias, $p = 0,0014$; 11 dias, $p < 0,0001$) e PP/PC (7 dias, $p = 0,014$; 11 dias, $p < 0,001$) em relação ao GIIA , enquanto o VPT ($p = 0,0061$) e o VPE ($p = 0,0049$) foram menores no GIIB em relação ao GIIA aos 7 dias e semelhantes entre eles, aos 11 dias.

Entre os grupos submetidos à restrição nutricional, PP foi maior aos 11 dias em relação aos 7 dias, tanto nos mantidos em ar ambiente ($p = 0,0366$), quanto nos em hiperoxia ($p < 0,001$). Também, entre os submetidos à restrição nutricional e hiperóxia (GIIB), PP/PC ($p = 0,0029$) e VPT($p = 0,0287$) foram maiores aos 11 dias em relação aos 7 dias,enquanto nos em

ar ambiente, PP/PC, VPT, VPTE foram semelhantes neste período. Também, no GIIB, VPE foi semelhante entre os 7 e os 11 dias.

▪ **PP, PP/ PC, VPT e VPE entre os grupos submetidos a diferentes ofertas nutricionais e à mesma concentração de oxigênio:**

▪ **Ar ambiente (GIA e GIIB):**

Aos 7 dias de vida, os coelhos do GIA (dieta padrão) tiveram maiores PP($p = 0,0014$), PP / PC ($p < 0,0001$), VPT ($p = 0,060$) e VPE ($p = 0,016$) em relação ao GIIB (restrição nutricional).

Aos 11 dias de vida, PP e PP/PC foram semelhantes. VPT ($p = 0,0254$) e VPE ($p = 0,0298$) de GIA (dieta padrão) foram maiores do que os do GIIB (submetidos à restrição nutricional).

▪ **Hiperoxia (GIB e GIIB):**

Aos 7 dias de vida, P pulmonar ($p = 0,0227$), VPT ($p = 0,0049$) e VPE ($p = 0,0080$) foram maiores em GIB em relação a GIIB, sendo que PP/PC foi semelhante entre eles.

No entanto, aos 11 dias de vida, o grupo submetido à restrição nutricional (GIIB) apresentou maiores Ppulmão ($p = 0,0239$) e PP/PC($p < 0,001$) em relação ao GIB. VPT e VPE foram semelhantes entre os grupos GIB e GIIB.

4.2.2. Análise morfométrica

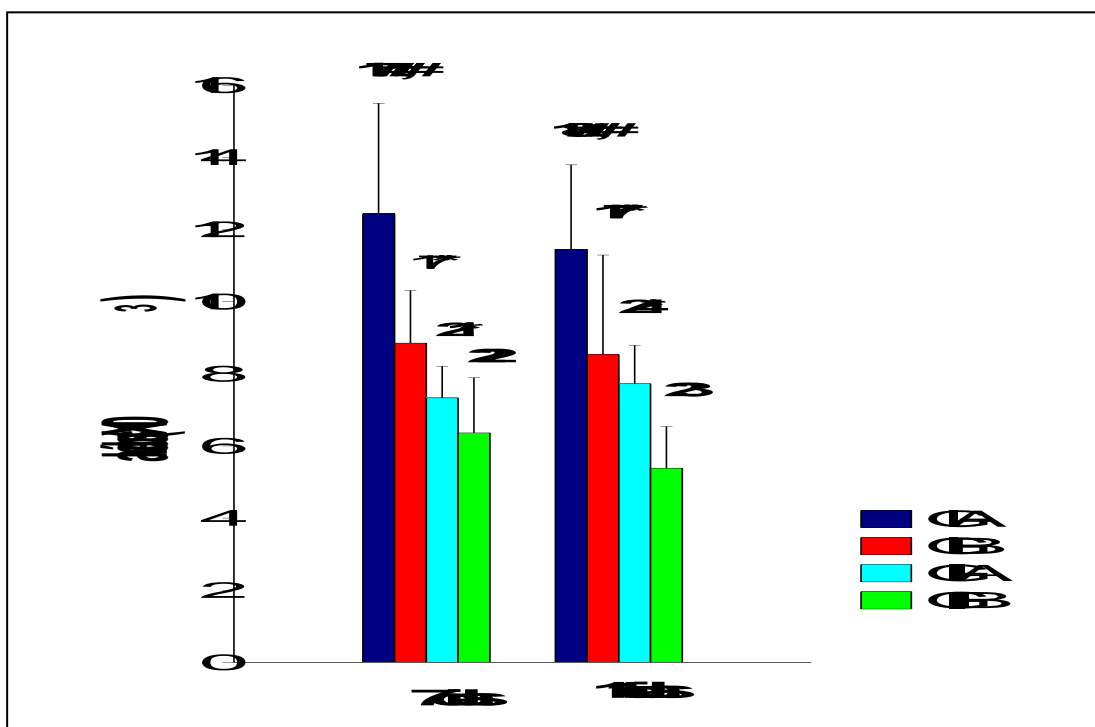
4.2.2.1. Número de alvéolos

TABELA 7 – NÚMERO DE ALVÉOLOS ($\times 10^3$) EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO

Alvéolos ($\times 10^3$)	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7 dias (n)	12,43 \pm 3,07 (17) ^{##}	8,85 \pm 1,46(17) ^{**}	7,33 \pm 0,88 (21) [*]	6,36 \pm 1,53 (22)
11dias (n)	11,45 \pm 2,34 (18) ^{##}	8,53 \pm 2,76(17) ^{**}	7,72 \pm 1,07 (24) [*]	5,38 \pm 1,16 (23)

^{*}, [#], ^{**}, ^{##} p < 0,05 ^{##} GIA X GIB [#] GIA X GIIA ^{**} GIB X GIIB ^{*} GIIA X GIIB

GRÁFICO 10 – NÚMERO DE ALVÉOLOS ($\times 10^3$), EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, NOS GRUPOS DE ESTUDO



^{*}, [#], ^{**}, ^{##} p < 0,05 ^{##}GIA X GIB [#] GIA X GIIA ^{**}GIB X GIIB ^{*}GIIA xGIIB

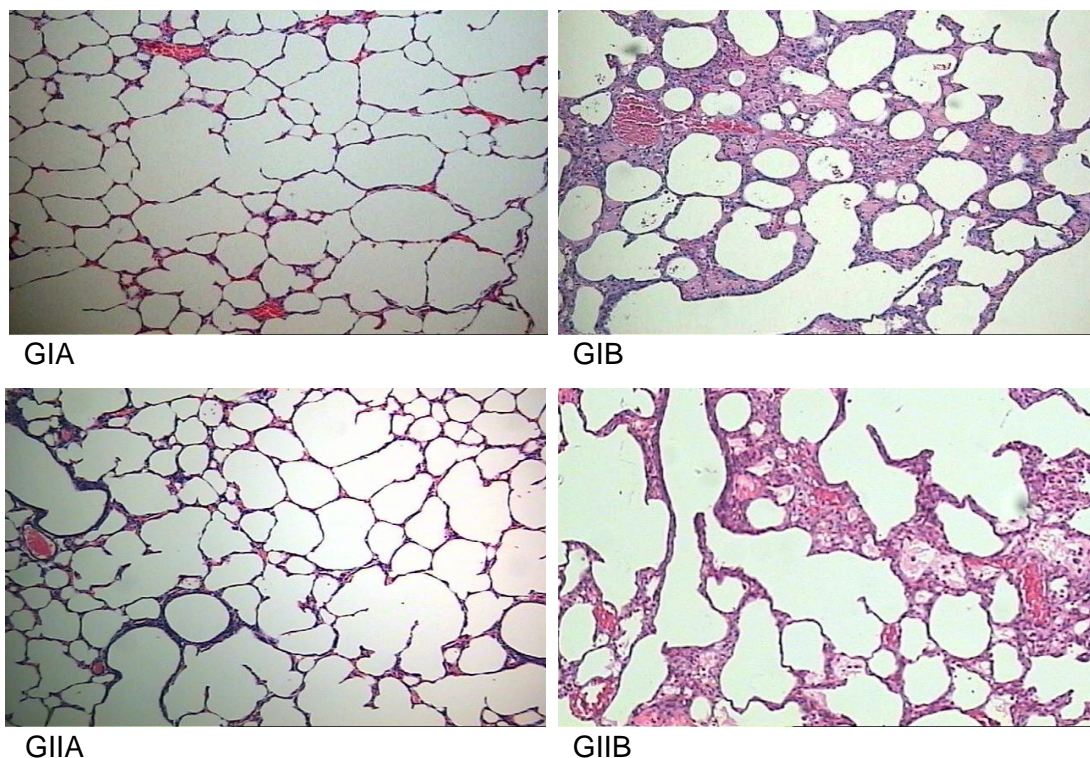


FIGURA 2 – CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÕES DE COELHOS PRÉ-TERMO - ALVÉOLOS E SEPTOS ALVEOLARES (10x), NOS GRUPOS DE ESTUDO AOS 11 DIAS.

Aos 7 e aos 11 dias de vida, ocorreu uma redução no número de alvéolos nos grupos submetidos à hiperoxia (GIB e GIIB) em relação aos mantidos em ar ambiente (GIA e GIIA)(aos 7 dias: $p < 0,0001$; $p = 0,0042$; aos 11 dias: $p = 0,001$; $p < 0,0001$) respectivamente. Da mesma forma, houve uma diminuição do número de alvéolos nos grupos submetidos à restrição nutricional (GIIA e GIIB), em relação aos mantidos com dieta padrão (GIA e GIB) (aos 7 e aos 11 dias: $p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente. No grupo submetido à restrição nutricional e hiperoxia (GIIB), observou-se uma redução mais intensa em relação aos outros grupos.

4.2.2.2. Intercepto linear médio (ILm)

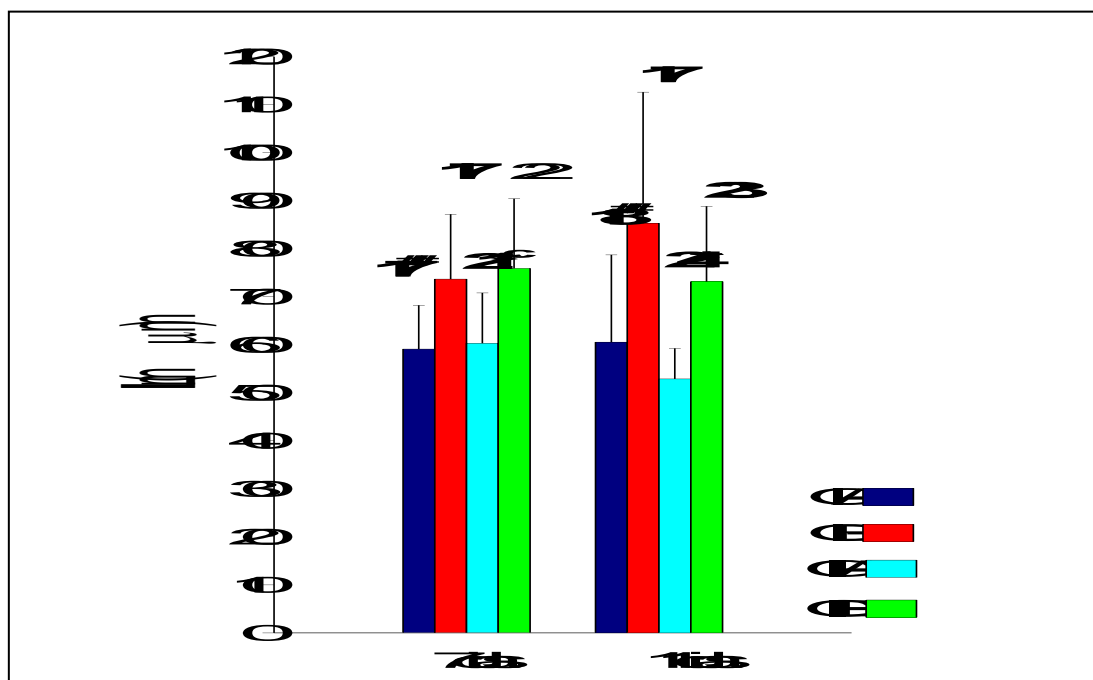
TABELA 8 – INTERCEPTO LINEAR MÉDIO (μm) EM COELHOS PRÉ-TERMO, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO, AOS 7 E 11 DIAS

ILm (μm)	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7dias (n)	59,10 \pm 9,12 (17) ##	73,70 \pm 13,40(17)	60,33 \pm 10,46(21)*	75,83 \pm 14,50(22)
11dia (n)	60,54 \pm 18,20(18)##	85,30 \pm 27,30(17)	52,70 \pm 6,50 (24)*	73,13 \pm 15,71(23)

*, ## p < 0,05 ## GIA X GIB

* GIIA X GIIB

GRÁFICO 11 – INTERCEPTO LINEAR MÉDIO, EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO



*, ## p < 0,05

GIA X GIB

* GIIA X GIIB

c – GIIA7 X GIIA 11

Aos 7 e aos 11 dias, ocorreu uma elevação do ILm nos grupos submetidos à hiperoxia (GIB e GIIB) em relação aos mantidos em ar ambiente (GIA e GIIA) (7d: p=0,0003; p=0,0002; 11d: p= 0,0021; p<0,0001), respectivamente. No grupo submetido à restrição nutricional e

ar ambiente (GIIA), ocorreu uma redução do ILM aos 11 dias, em relação aos 7 dias ($p = 0,0076$). Nos outros grupos, foram semelhantes aos 11 dias em relação aos 7 dias.

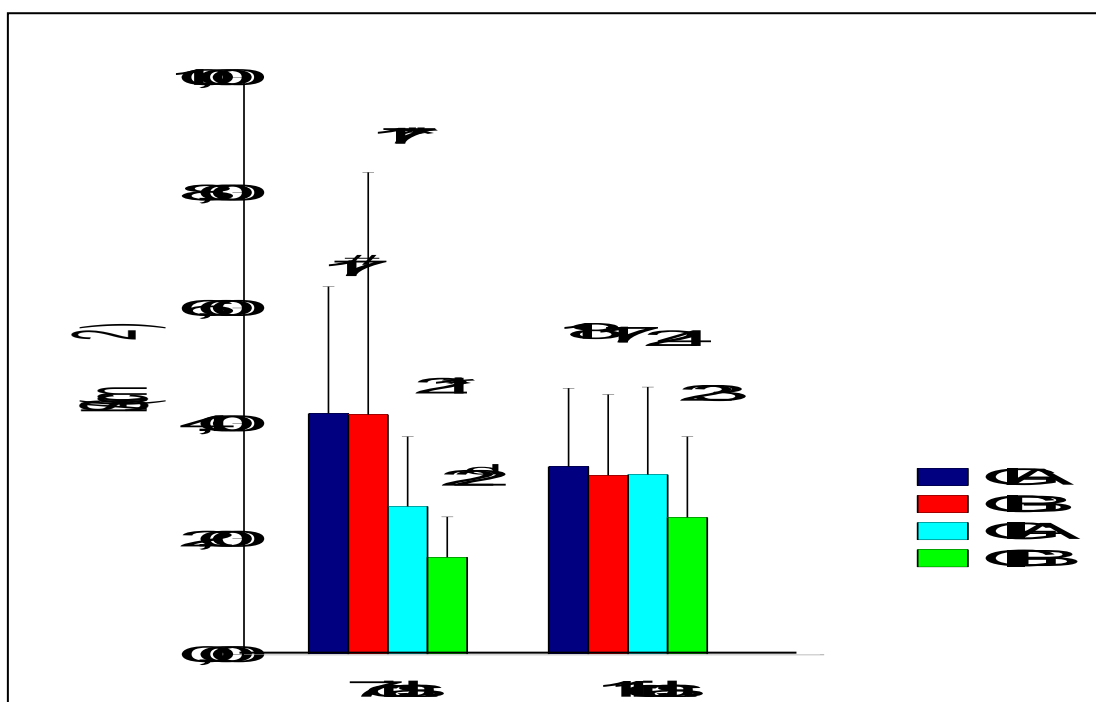
4.2.2.3. Área de superfície interna (ASI)

TABELA 9 –ÁREA DE SUPERFÍCIE INTERNA(ASI)(cm²) EM COELHOS PRÉ-TERMO,SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO AOS 7 E 11 DIAS

ISA (cm ²)	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7 dias (n)	4,2 ± 2,2 (17) [#]	4,2 ± 4,3 (17) ^{**}	2,6 ± 1,2 (21) [*]	1,7 ± 0,7 (22)
11dias (n)	3,2 ± 1,4 (18)	3,1 ± 1,4 (17)	3,1 ± 1,5 (24)	2,4 ± 1,5 (23)

^{*}, [#] $p < 0,05$ [#] GIA X GIIA ^{**} GIB X GIIB ^{*} GIIA X GIIB

GRÁFICO 12 – ÁREA DE SUPERFÍCIE INTERNA (cm²) AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO



[#] $p < 0,05$ [#] GIA X GIIA ^{**} GIB X GIIB ^{*} GIIA X GIIB ^d- GIIB7 X GIIB11

Aos 7 dias, ocorreu uma diminuição do ASI, nos grupos restrição nutricional (GIIA e GIIB), em relação aos dieta padrão (GIA e GIB) ($p=0,0081$; $p=0,0192$), respectivamente, como também do restrição nutricional e hiperoxia (GIIB) em relação ao restrição nutricional e ar ambiente (GIIA) ($p=0,0071$). Aos 11 dias, não se observou diferença estatística entre os grupos. No entanto, no grupo submetido à restrição nutricional e hiperoxia (GIIB), verificou-se uma tendência à redução, em relação ao GIA ($p=0,093$). Apenas, no GIIB aos 11 dias ocorreu uma aumento do ISA, em relação ao GIIB aos 7dias ($p=0,039$).

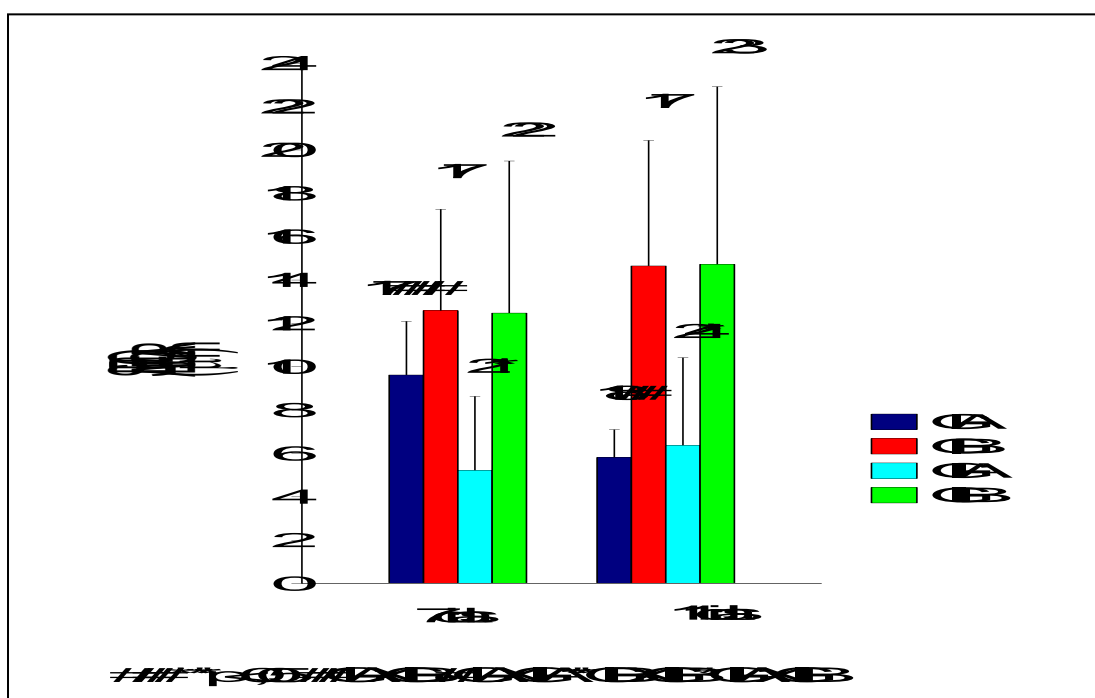
4.2.2.4. Espessura de septos alveolares

TABELA 10 – MEDIDA DE SEPTOS ALVEOLARES EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO

Septo alveolar (μm)	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7 dias (n)	9,62 \pm 2,48(17) ^{##, #}	12,59 \pm 4,68(17)	5,23 \pm 3,41(21) [*]	12,48 \pm 7,01 (22)
11 dias (n)	5,82 \pm 1,28 (18) ^{##}	14,65 \pm 5,79(17)	6,38 \pm 4,04(24) [*]	14,73 \pm 8,19 (23)

*, ## p < 0,05 ## GIA X GIB # GIA X GIIA * GIIA X GIIB

GRÁFICO 13 – MEDIDA DOS SEPTOS ALVEOLARES (μm), EM COELHOS PRÉ-TERMO, NOS DIFERENTES GRUPOS AOS 7 E 11 DIAS



Observou-se um espessamento septal, no 7^o e 11^o dias de vida nos coelhos submetidos à hiperóxia, tanto no GIB (dieta padrão) quanto nos GIIB (restrição nutricional) (7 d: p = 0,0225; p < 0,0001; 11 d: p < 0,0001; p < 0,0001), respectivamente (Figura 2).

Aos 7 dias, ocorreu uma redução da espessura dos septos interalveolares, no GIIA em relação ao GIA (p = 0,0001).

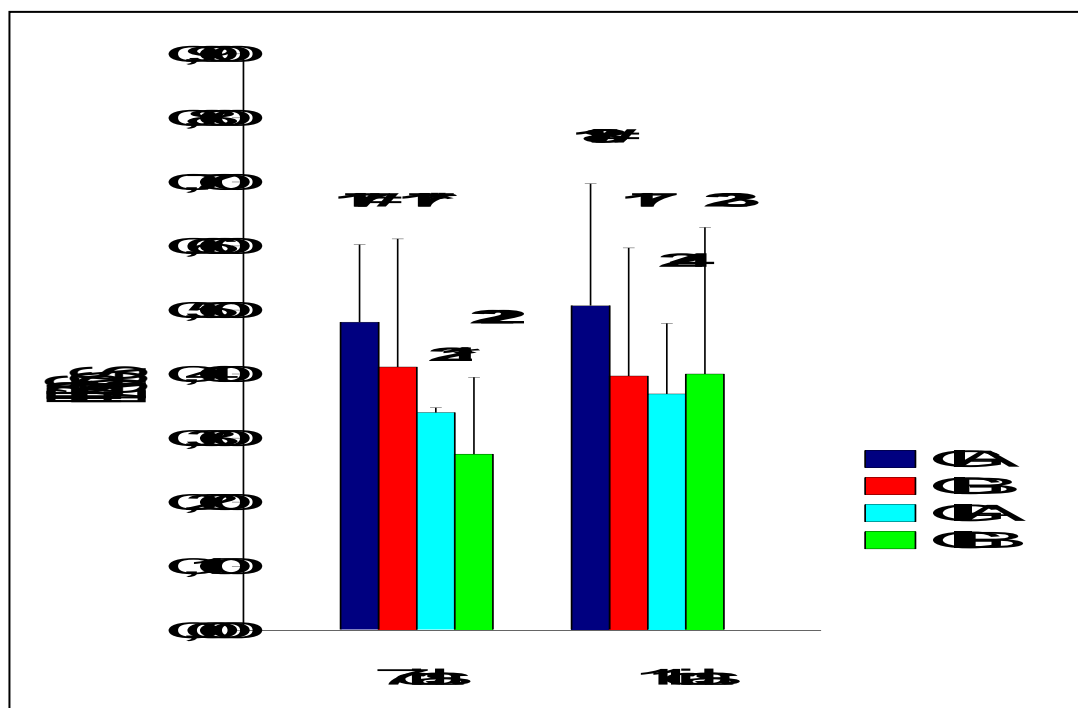
4.2.2.5. Densidade de fibras elásticas

TABELA 11 – DENSIDADE DE FIBRAS ELÁSTICAS DO PARÊNQUIMA PULMONAR EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO

Fibras elásticas	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7 dias (n)	0,48 ± 0,12 (17) #	0,41 ± 0,20(17)**	0,34± 0,07(21)*	0,27 ± 0,12(22)
11dias (n)	0,51 ± 0,18 (18) #	0,40 ± 0,20(17)	0,37 ± 0,11(24)	0,40 ± 0,23(23)

*,#, ** p < 0,05 # GIA X GIIA * *GIB X GIIB *GIIA X GIIB

GRÁFICO 14 – DENSIDADE DAS FIBRAS ELÁSTICAS NO PARÊNQUIMA PULMONAR DE COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO



*,#, ** p < 0,05 # GIA X GIIA * *GIB X GIIB *GIIA X GIIB

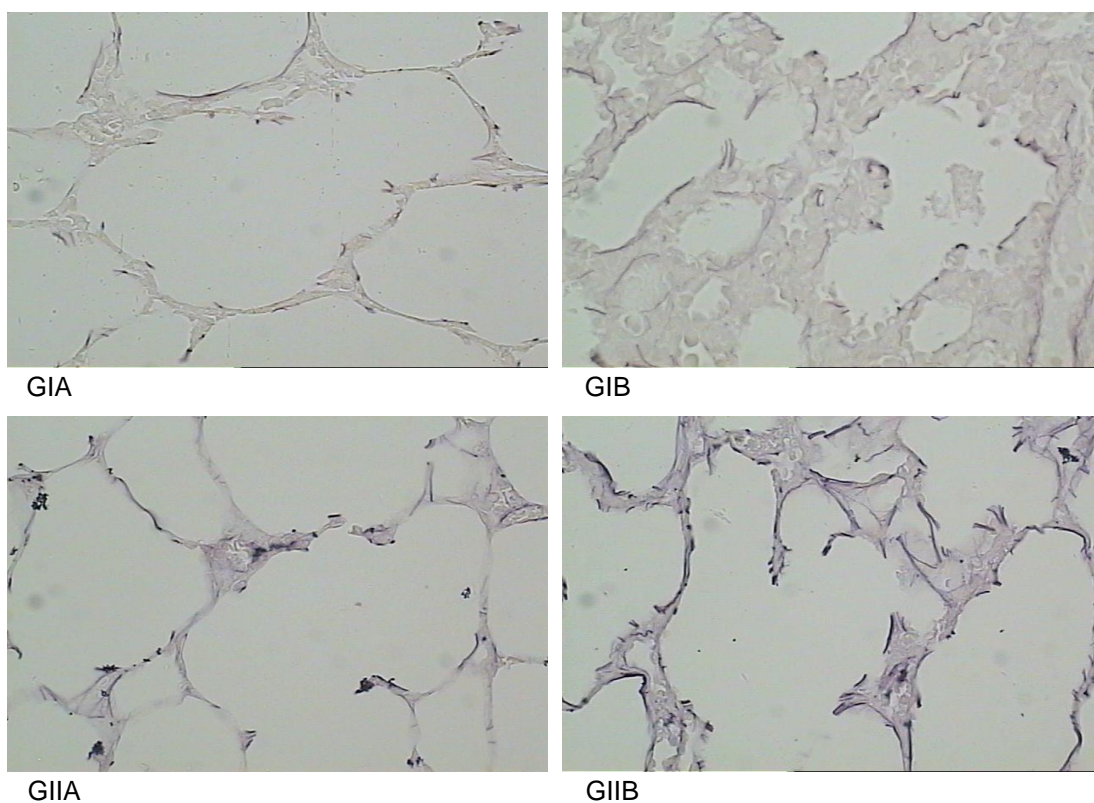


FIGURA 3 – CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÃO DE COELHOS PRÉ-TERMO COM DEPOSIÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS NOS DIFERENTES GRUPOS (40x), AOS 11 DIAS.

Ocorreu uma redução das fibras elásticas no parênquima pulmonar nos grupos restrição nutricional (GIIA e GIIB) em relação aos que receberam dieta padrão (GIA e GIB) ($p < 0,0001$; $p = 0,0104$) aos 7 dias e, aos 11 dias, apenas no grupo restrição e ar ambiente (GIIA) em relação ao dieta padrão e ar ambiente (GIA) ($p = 0,0062$).

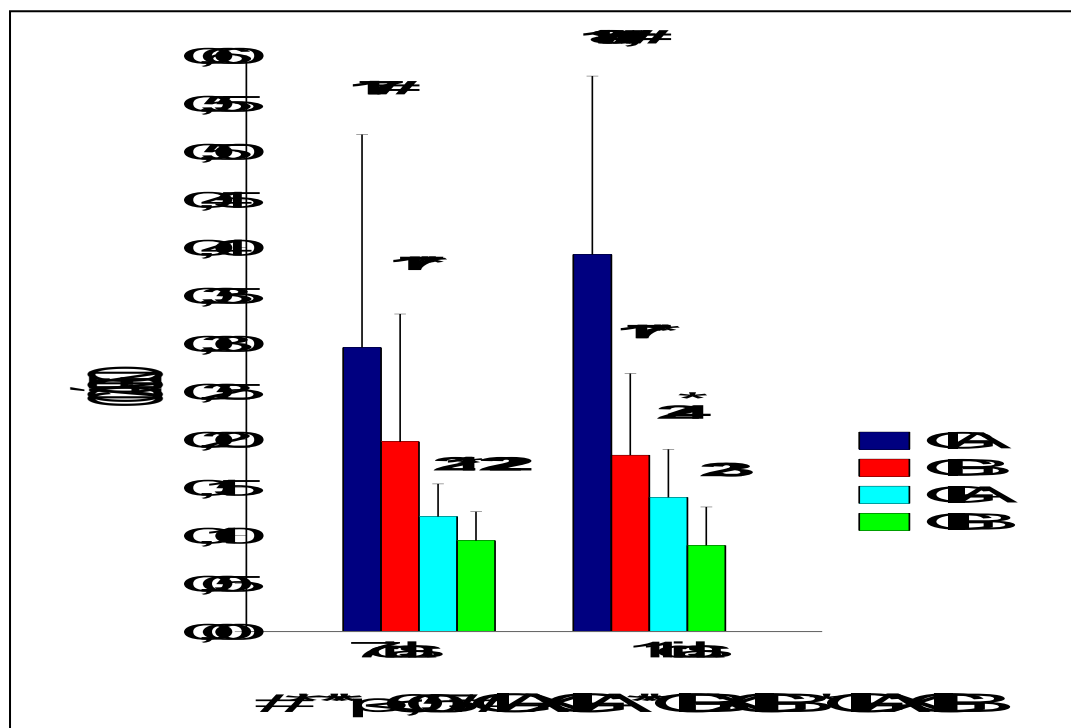
4.2.2.6. Densidade de colágeno

TABELA 12 – DENSIDADE DE COLÁGENO DO PARÊNQUIMA PULMONAR EM COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, SEGUNDO OS GRUPOS DE ESTUDO

Colágeno	GIA	GIB	GIIA	GIIB
7 dias (n)	0,296 ± 0,222(17) [#]	0,198 ± 0,133(17) ^{**}	0,120 ± 0,03(21) [*]	0,095 ± 0,03 (22)
11dias (n)	0,393±0,186(18) ^{##}	0,184 ± 0,085(17) ^{**}	0,139 ± 0,05(24) [*]	0,090 ± 0,04 (23)

##, **, * p < 0,05 # GIA X GIIA ** GIB X GIIB * GIIA X GIIB

GRÁFICO 15 – DENSIDADE DE COLÁGENO NO PARÊNQUIMA PULMONAR, DE COELHOS PRÉ-TERMO, AOS 7 E 11 DIAS, DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO



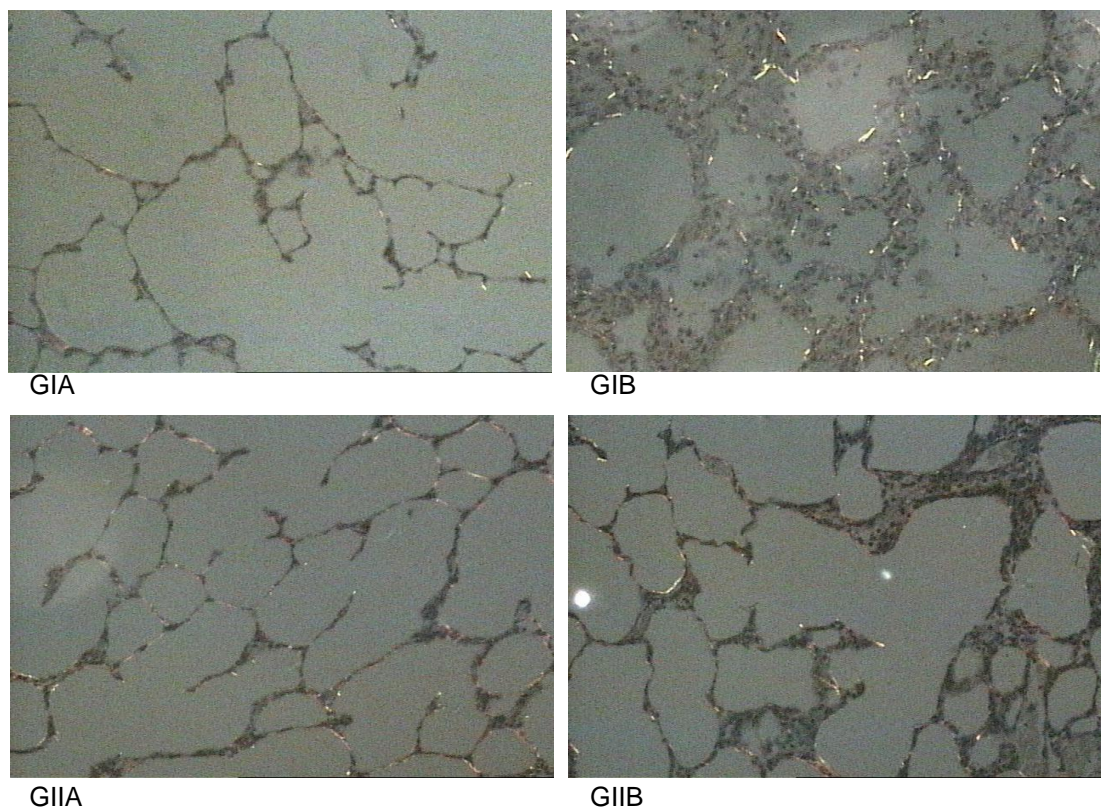


FIGURA 4 – CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÃO DE COELHOS PRÉ-TERMO DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO PARÊNQUIMA PULMONAR NOS DIFERENTES GRUPOS (20x) AOS 11 DIAS.

Aos 7 e 11 dias de vida, observou-se uma diminuição na densidade de colágeno no GIIA em relação ao GIA (7d: $p = 0,0015$; 11d: $p < 0,0001$), bem como do GIIB comparado ao GIB (7d: $p = 0,0022$; 11d: $p < 0,0001$), portanto, nos grupos restrição nutricional, em relação aos dieta padrão, como também no grupo restrição nutricional e hiperoxia, em relação ao restrição nutricional e ar ambiente (GIIA X GIIB, $p = 0,014$). Aos 11 dias, verificou-se esta redução, também, no grupo dieta padrão e hiperoxia em relação ao dieta padrão e ar ambiente (GIA X GIB) ($p < 0,001$).

Aos 7 e 11 dias, observou-se o efeito da restrição nutricional sobre a redução dos depósitos de colágeno, e aos 11 dias, também da hiperoxia sobre os mesmos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de modelos experimentais em animais tem contribuído para o conhecimento da fisiopatologia de determinados distúrbios e a abordagem de novas terapêuticas no período perinatal.

O estudo dos efeitos de determinados fatores, como a restrição nutricional e a hiperoxia, sobre o pulmão em desenvolvimento, requer a utilização de modelos experimentais, numa fase inicial, quando é necessário identificar as mudanças estruturais decorrentes, que irão determinar alterações funcionais no pulmão.

Estas irão caracterizar as bases fisiopatológicas de diferentes distúrbios respiratórios, que ocorrem no período neonatal em recém-nascidos pré-termo, relacionados ao fato de que estes nascem numa fase em que o processo de desenvolvimento pulmonar ainda não se completou.

5.1. Modelo experimental

Com o objetivo de estudar a lesão pulmonar, decorrente de diferentes fatores durante o desenvolvimento pulmonar, vários modelos experimentais foram criados.

Os efeitos da nutrição nos períodos peri e neonatal, bem como a longo prazo, foram analisados em animais a termo, principalmente em ratos (Frank; Groseclose; 1982; Das, 1984; Kalenga et al, 1995). Já a lesão pulmonar por hiperoxia foi estudada em animais a termo, ratos (Crapo et al, 1980; Warner et al, 1998) e, em animais pré-termo, babuínos (Coalson et al, 1982; Coalson et al, 1992; Coalson et al, 1999), ratos (Tanswell et al, 1989) e coelhos (Seidner et al, 1995). No entanto, existe uma dificuldade em obter-se um modelo experimental em animais pré-termo, para ser utilizado por um período mais longo após o nascimento, devido às suas elevadas taxas de mortalidade.

O modelo experimental em babuínos pré-termo é atualmente o único em que se obtém uma maior sobrevivência por períodos longos, permitindo estudar, tanto os efeitos da nutrição, como também da hiperoxia (Coalson et al, 1982; Coalson et al, 1992; Coalson et al, 1999) a médio e longo prazo. No entanto, este modelo é caro, necessitando de uma manutenção destes animais em unidades de terapia intensiva neonatais criadas para este fim, com equipe especializada, durante todo o período do estudo.

Desenvolveu-se, neste estudo, um modelo experimental em coelhos pré-termo, com idade gestacional conhecida de 28 dias. Este modelo é acessível e barato, necessitando de menor quantidade de cuidados que os

necessários naqueles que utilizam babuínos. Os coelhos têm maiores dimensões que os ratos e camundongos, o que permite a realização de estudos e procedimentos com maior facilidade. Além disto, como a ovulação da coelha pode ser induzida, o nascimento pode ser programado com exatidão, garantindo maior precisão na idade gestacional.

Como o pulmão do recém-nascido pré-termo tem características peculiares, por encontrar-se em desenvolvimento, para analisar os efeitos de fatores que possam alterar sua arquitetura, em modelos experimentais, faz-se necessário a utilização de animais que apresentem rápidos processos de diferenciação e crescimento de seus órgãos (DeLemos; Coalson, 1992).

Também a utilização de animais pré-termo foi necessária, para a análise dos efeitos da restrição nutricional e da hiperoxia, sobre um pulmão em desenvolvimento, devido a características peculiares desta fase como: processo de alveolização incompleto (Zeltner; Burri, 1987); maior resistência à hiperoxia (Frank, 1987) e menores reservatórios de surfactante (Hallman et al, 1986).

Utilizou-se coelhos pré-termo, com 28 dias de idade gestacional, devido esta ser a idade limite de viabilidade (Lorenzo, 1985), nestes animais.

5.1.1. Restrição nutricional

O modelo experimental de restrição nutricional mais utilizado no período neonatal, é o que manipula o número de filhotes que irão sugar numa mesma lactante, isto é, aumentando o número de lactentes em uma

coelha, em quantidade maior do que a usual, produz-se uma restrição nutricional, e compara-se com um grupo com menor número de filhotes sugando em uma mesma lactante (Das, 1984; Massaro et al, 1985).

Também, alguns diminuem a oferta global ou a de determinados nutrientes de uma dieta manipulada, em relação às necessidades nutricionais daquela espécie (Kalenga et al, 1987).

Pela impossibilidade técnica de mantermos coelhas lactantes nutrindo os filhotes, pois não tínhamos um biotério de manutenção, optou-se por produzir uma restrição nutricional, reduzindo a oferta de todos os nutrientes em 30%, em relação a uma dieta padrão.

Como desconhecia-se, em coelhos pré-termo, o tempo necessário para obter-se os efeitos da restrição nutricional sobre o crescimento, inicialmente optou-se por realizar uma restrição nutricional por 14 dias. No entanto, devido à elevada mortalidade do modelo, após 11 dias de vida, reduziu-se a duração desta restrição para 11 dias.

Desenvolveu-se, desta maneira, um modelo de restrição nutricional em coelhos pré-termo, com uma sobrevida que permitiu o estudo neste, dos efeitos do regime nutricional utilizado durante 11 dias de vida.

5.1.1.1. Oferta nutricional

A escolha lógica para a dieta dos animais de laboratório, para o desenvolvimento de modelos experimentais, é a dieta que eles receberiam naturalmente, isto é o leite da própria mãe. Esta atenderia mais adequadamente às necessidades nutricionais da espécie. No entanto,

mesmo a composição nutricional do leite materno da coelha varia consideravelmente ao longo do tempo (Coates et al, 1964; Cowie, 1969) e entre animais da mesma espécie (Sogorb et al, 1991). Além do que, há dificuldade em quantificar o volume de dieta consumido “ad libitum”.

Conhecendo-se as necessidades nutricionais da espécie, pode-se reproduzir fórmulas que forneçam os nutrientes para supri-las, minimizando a variabilidade destes. Mas, deve-se considerar que as necessidades nutricionais variam de acordo com o período da vida, com sua elevação durante o crescimento, a reprodução e a amamentação.

Em nosso meio, não dispunhamos de um biotério de manutenção, o que impossibilitou a utilização de leite de coelha para a alimentação dos filhotes. Também não colocamos os filhotes para mamar em coelhas lactantes, porque estes, com 28 dias de idade gestacional, não conseguem sugar.

O desenvolvimento de uma fórmula para alimentar os filhotes de coelhas, procurou reproduzir uma composição a mais semelhante possível à do leite de suas mães.

Durante a lactação, a composição média do leite de coelha é variável (Coates et al, 1964). Sabe-se que tem um elevado teor protéico (10,7 – 15 gramas/ 100ml), de gordura (10,8 a 14,9 gramas/100 ml), de sódio (47,5 – 82,3 mEq/L ou 82 – 160 mg/ 100g (Coates et al, 1964; Cowie, 1969; Sogorb et al, 1991) e pequena quantidade de lactose (1,12 - 1,8 gramas/ 100ml). Esta composição é espécie - específica, pois os coelhos têm intolerância à

lactose, desenvolvendo freqüentemente diarréia, quando são alimentados com fórmulas com maiores concentrações de lactose.

Foram feitas várias tentativas com diversas fórmulas artificiais, com o objetivo de se obter a mais adequada ao estudo. Inicialmente, realizou-se um piloto com Pré-NAN®, fórmula para recém-nascido pré-termo, que contem maior quantidade de proteína, mas 76% de seus carboidratos estão sob a forma de lactose. No entanto, a mortalidade dos coelhos era elevadíssima, pois eles desenvolviam diarréia e distensão abdominal importante.

Posteriormente, utilizou-se Alfarré®, fórmula láctea infantil, que tem uma maior quantidade protéica (2,5 gramas/100ml), proteínas do soro do leite hidrolisadas (80% peptídeos e 20% aminoácidos livres) e não contem lactose. Também, utilizando-se esta fórmula, os coelhos pré-termo desenvolviam quadros importantes de diarréia e distensão abdominal, com elevada mortalidade. Devido ao seu conteúdo de aminoácidos livres e peptídeos, a osmolaridade desta fórmula é de 634 mOsm/100 ml, provavelmente sendo esta uma das causas do quadro clínico observado.

Após, utilizou-se NAN sem lactose®, com seu conteúdo de carboidratos sob a forma de dextrino-maltose, já que os coelhos têm intolerância à lactose. Também tem 1,7 g de proteínas/ 100ml, concentração semelhante à do leite humano. No entanto, quando comparada à do leite de coelha, esta concentração é 10 vezes menor. Nas fases iniciais de lactação, o leite de coelha contém 10,7 g proteínas/ 100ml. Esta fórmula, além de possuir uma concentração protéica insuficiente, também possui uma

concentração de carboidratos elevada (7,6 g/ 100 ml) em relação à constituição do leite de coelha (1,8 g carboidratos/ 100ml). Portanto, para diminuir a concentração de carboidratos na fórmula utilizada, esta foi diluída a 1/3, reduzindo, conseqüentemente, ainda mais sua concentração protéica.

A fim de elevar a concentração de proteínas nesta fórmula, adicionou-se caseína, sob a forma de caseinato de cálcio (Caseína®)(90g de proteínas/ 100 gramas pó), obtendo-se uma concentração protéica final de 5,38 gramas/ 100ml. Também para aproximar a concentração de gordura da fórmula utilizada, à do leite de coelha, adicionou-se triglicérides com ácidos graxos essenciais e complexo vitamínico (Quadros 1 e 2).

Apesar de todas estas adaptações, a fórmula padrão desenvolvida ainda continha uma concentração menor de proteínas, semelhante de gordura e um pouco mais elevada de carboidratos em relação ao leite da coelha, sendo a sua densidade calórica semelhante (155 kcal não protéica/100ml, e a de leite de coelha- 150-200 kcal totais/100ml).

Devido às características descritas acima, pela impossibilidade de acrescentar quantidades maiores de proteínas à fórmula e à dificuldade de dissolver a caseína, considerando a elevada osmolaridade que esta poderia atingir, esta fórmula final foi escolhida para ser utilizada como dieta padrão, pois seu uso possibilitou melhores taxas de sobrevivência em relação às tentativas com outras dietas artificiais.

Para a realização da restrição nutricional, a mesma foi reduzida em 30% de todos os seus componentes. Portanto, nos grupos de estudo, utilizou-se a dieta padrão em um grupo e, no outro, uma restrição nutricional

de 30% em relação ao alimentado com dieta padrão, conforme o objetivo desta pesquisa.

Estabeleceu-se o volume de administração da dieta, correspondendo a um volume de 20% do peso de nascimento a partir do 3º dia de vida até o 11º dia de vida, baseando-se em relatos anteriores de modelo experimental em coelhos pré-termo (Aprille; Rulfs, 1976; Lorenzo, 1985). Com o objetivo de elevar a oferta calórica, administrou-se maiores volumes diários de fórmula. No entanto, esse procedimento levou a uma maior mortalidade e, portanto, não foi utilizado.

Ambos os grupos foram alimentados através de uma sonda orogástrica, duas vezes ao dia. É descrito na literatura o hábito dos filhotes de coelhas alimentarem-se uma vez ao dia (Zarrow et al, 1965; Aprille; Rulfs, 1976; Lorenzo, 1985). Neste estudo, experimentou-se dividir o volume diário em duas e três alíquotas, além de administrar-se a dieta uma vez ao dia, numa tentativa de diminuir a incidência de distensão abdominal importante. Com isto, obteve-se uma menor mortalidade, com a administração da dieta em duas alíquotas e intervalos de 12 horas entre elas.

A fim de diminuir a ocorrência de diarreia e infecção, utilizou-se água destilada esterilizada, através de autoclave, para diluir a dieta.

5.1.1.2. Evolução ponderal

A evolução ponderal, analisada através das curvas de crescimento das médias de peso diário de todos os coelhos do estudo, bem como das curvas das médias de peso diário dos coelhos que foram sacrificados aos 7

e 11 dias, demonstraram que a instituição de uma restrição nutricional global de 30 % dos nutrientes oferecidos, durante os primeiros 11 dias de vida, causou uma redução do ganho ponderal em coelhos pré-termo submetidos a esta restrição nutricional (Gráficos 2, 3,4)(Anexos A,B,C,D).

Inicialmente, ocorreu uma perda de peso em todos os grupos, sendo que, a partir do 3º dia de vida, observou-se nestes uma elevação nas médias diárias de peso (Gráfico 2). Esta perda de peso inicial, provavelmente foi decorrente de perda de líquidos, como também devido à administração insuficiente de nutrientes, semelhante ao descrito na literatura (Zarrow et al, 1965; Aprille; Rulfs,1976; Lorenzo, 1985).

Da mesma forma, foi descrito em coelhos a termo, alimentados com leite de coelha, ou mesmo os que sugaram nas suas respectivas mães, uma perda de peso nas primeiras 24 horas de vida e, a partir deste momento, um ganho de peso diário (Zarrow et al, 1965; Lorenzo, 1985).

Também Aprille; Rulfs (1976) descreveram, em coelhos recém-nascidos a termo, sugando em coelhas que não eram suas mães, ou recebendo uma dieta isocalórica, uma perda de peso durante as primeiras 24 horas de vida. Em ambos os grupos, a partir do segundo dia de vida, notou-se ganho de peso diário, observando-se uma melhor evolução ponderal entre os coelhos que receberam leite de coelhas. No 7º dia de vida, os que receberam leite de coelhas apresentaram um ganho de peso de 70% em relação ao peso de nascimento, enquanto os que receberam dieta isocalórica, apresentaram pesos semelhantes aos de nascimento.

Lorenzo (1985) desenvolveu um modelo experimental em coelhos pré-termo de 28 dias de idade gestacional, no qual estes foram randomizados em 2 grupos, sendo um alimentado com fórmula e o outro com leite de coelha. Verificou uma menor perda de peso até o 2º dia de vida, bem como um maior ganho de peso a partir deste dia, entre os coelhos alimentados com leite de coelha. Porém, quando comparou a taxa de crescimento à de fetos de mesma idade gestacional, verificou que esta foi menor neste grupo. O grupo alimentado com leite de coelha, apresentou ganho de peso a partir do 3º dia de vida, enquanto o que recebeu fórmula, ganhou peso somente a partir do 5º dia de vida.

Em resumo, estes estudos sugerem uma melhor evolução ponderal pós-natal nos coelhos alimentados com leite de coelha.

Neste estudo, no grupo submetido à restrição nutricional e ar ambiente (GIIA), ocorreu uma menor média de peso, em relação ao que recebeu dieta padrão e ar ambiente (GIA) ($p = 0,013$), detectável a partir do 8º dia vida, que se manteve até o 11º dia (Gráficos 2 e 4).

Da mesma forma, nos grupos mantidos em hiperoxia, a média dos pesos diários foi menor no submetido à restrição nutricional (GIIB) em relação ao dieta padrão (GIB) ($p < 0,0001$), do 4º ao 11º dia de vida (Gráfico 2, 3 e 4).

Estes resultados são semelhantes aos descritos na literatura, em modelos experimentais em coelhos alimentados com fórmula (Aprille; Rulfs, 1976; Lorenzo, 1985) e reforçam os efeitos negativos da restrição nutricional sobre os pesos médios diários.

Quanto aos efeitos da hiperoxia, tanto nos grupos com dieta padrão (GIA e GIB), quanto nos restrição nutricional (GIIA e GIIB), esta não parece ter influenciado de forma significativa as médias diárias de peso.

A verificação de que as médias diárias de peso entre os grupos submetidos à restrição nutricional, mas em diferentes concentrações de oxigênio, não diferiram de forma estatisticamente significativa, nos reforçou a conclusão de que apenas a restrição nutricional teve um efeito negativo sobre a evolução ponderal, embora ainda seja discutido na literatura um efeito restritivo da hiperoxia sobre o crescimento.

Não existem na literatura estudos com modelos experimentais de restrição nutricional e hiperoxia em coelhos prematuros, o que dificulta a comparação de nossos resultados, somente dispondo-se para tal, de modelos experimentais em outros animais.

Assim, em modelo experimental de restrição nutricional em ratos recém-nascidos, submetidos à restrição nutricional por 7 dias, Frank; Groseclose (1982) relataram uma perda de peso de 21% nos mantidos em ar ambiente e, de 14% entre os ratos recém-nascidos que receberam dieta adequada, mas sob hiperoxia. A perda de peso, no entanto, foi mais importante entre os que, além da restrição nutricional, foram submetidos à hiperoxia (34%). Além disso, discute-se que, em animais prematuros, com insuficiência respiratória importante, como a que ocorre em coelhos submetidos à hiperoxia, haveria uma maior necessidade calórica para manter um ganho de peso adequado (Wenstein, Oh; 1981), o que justificaria um menor ganho de peso nessa situação.

Como nesta pesquisa, o grupo submetido à restrição nutricional e ar ambiente (GIIA) apresentou um peso de nascimento médio maior do que o do grupo dieta padrão e ar ambiente (GIA), para avaliar se a restrição nutricional influenciou o ganho de peso, realizou-se a diferença das médias entre o peso médio de nascimento e o peso médio no momento do sacrifício, considerando-se os 7 e os 11 dias de vida (Gráfico 5)(Tabelas 4 e 5) (Anexo D).

Nos coelhos sacrificados aos 11 dias de vida, a diferença das médias foi maior no grupo dieta padrão em relação à restrição nutricional, tanto nos mantidos em ar ambiente ($p = 0,001$), quanto nos mantidos em hiperoxia ($p = 0,001$).

Portanto, apesar das diferenças de peso de nascimento médio entre os grupos, podemos afirmar que a restrição nutricional de 30% durante 11 dias de vida em coelhos pré-termo, influenciou negativamente o ganho de peso, caracterizando o modelo de restrição nutricional desejável para este estudo.

Lorenzo (1985) calculou, a partir do ganho de peso diário intra-uterino e da densidade calórica do leite de coelha, uma necessidade calórica de 16,4 kcal/dia ou 7,9 ml de leite de coelha por dia, para se obter um ganho de peso semelhante ao intra-útero. Neste estudo, os grupos dieta padrão, no máximo, receberam 8- 12 kcal/dia.

Portanto, nesse modelo de restrição nutricional, mesmo o grupo alimentado com dieta padrão recebeu, provavelmente, uma dieta quantitativamente inadequada nutricionalmente, para apresentar um crescimento semelhante ao intra-útero. Mas este crescimento foi suficiente

para sobrevivência por 11 dias e, seguramente, foi muito superior ao do grupo com restrição nutricional.

5.1.2 . Restrição nutricional e hiperoxia

Atribui-se um papel principal na fisiopatologia da lesão pulmonar do recém-nascido pré-termo, tanto à hiperoxia, como ao barotrauma. Observa-se lesão pulmonar com padrões alterados de inflação, lesões de vias aéreas e alterações fibroproliferativas no parênquima pulmonar, tanto associadas à hiperoxia, quanto à ventilação mecânica.

Várias espécies animais, como: coelhos, ratos, ovelhas, babuínos desenvolvem doença de membrana hialina, quando realiza-se cesárea eletiva antes do momento do nascimento. Não se consegue manter ratos, coelhos e ovelhas prematuros, com doença de membranas hialinas, vivos durante muito tempo.

Sabe-se que ratos, coelhos, camundongos recém-nascido são mais resistentes à hiperoxia do que os animais adultos. Apesar disto, vários autores desenvolveram modelos experimentais de lesão pulmonar por hiperoxia em ratos a termo, com concentrações de oxigênio que variaram de 100% (Bonikos et al, 1975), 95% (Randell et al, 1989; Randell et al, 1990; Warner et al, 1998), 80% (Pappas et al, 1983). Descreveram alterações, que variam de acordo com a concentração de oxigênio utilizada e conforme a duração da exposição à hiperoxia. Observaram áreas de atelectasia, que se alternavam com áreas de hiperinsuflação, bronquiolite necrosante, processo

fibroproliferativo com proliferação de tecido conectivo, hemorragias, diminuição do número de alvéolos, espessamento do septo alveolar e diminuição da área de superfície de trocas gasosas, que são alterações estruturais descritas na displasia broncopulmonar.

Existem poucos modelos experimentais de lesão pulmonar por hiperoxia descritos na literatura, utilizando animais pré-termo (Coalson et al, 1982; Coalson et al, 1992; Coalson et al, 1999; Mascaretti et al, 2003). São alterações comuns a todos: uma diminuição do número de alvéolos, com diminuição da área de superfície de trocas gasosas e espessamento de septo alveolar, além de alterações na deposição de fibras elásticas e colágeno.

Para avaliar o papel modulador da nutrição na patogênese da lesão pulmonar pelo oxigênio, neste estudo, além do grupo submetido à restrição nutricional, desenvolveu-se, conforme descrito anteriormente, um grupo também submetido à hiperoxia.

Na idade gestacional de 28 dias, o pulmão encontra-se em fase sacular e, em alguns locais, já em alveolização, observando-se um amadurecimento pulmonar apical inicialmente e, posteriormente, em lobos médios e inferiores (Kikkawa et al, 1971; Karnak et al, 1999; Fukuda et al, 2000).

Estes coelhos pré-termo foram expostos à hiperoxia, com concentrações de oxigênio de 95% durante 11 dias. Optou-se por este período de exposição, pois não se sabia qual o tempo necessário para produzir lesões pulmonares, nestes animais. Não havia relato na literatura

de lesão pulmonar por hiperoxia, em coelhos prematuros, devido à exposição prolongada a elevadas concentrações de oxigênio, no momento do estudo.

Conforme discutido anteriormente, optou-se pelos coelhos, devido ao custo e à facilidade de manipulação. No entanto, discute-se que a suscetibilidade ao oxigênio é variável entre as espécies, além das diferenças entre os vários períodos da vida. Sabe-se também que os coelhos prematuros, com doença de membranas hialinas, têm dificuldades para aumentar as concentrações de enzimas antioxidantes durante a hiperoxia (Sosenko; Frank 1991). Discute-se se esta característica não torna os coelhos prematuros mais susceptíveis à lesão pulmonar por oxigênio que outras espécies. No entanto, os resultados de estudo com coelhos pré-termo expostos à hiperoxia (Mascaretti et al, 2003) e deste, são semelhantes aos descritos na literatura, em outras espécies animais.

5.1.3. Sobrevida

A sobrevida geral entre os coelhos randomizados para o estudo foi de 20,8%, o que indica que houve uma mortalidade muito elevada. Analisando-se, no entanto, a sobrevida em cada grupo, observou-se que esta foi maior nos submetidos à restrição nutricional e ar ambiente (GIIA) (63%) (Tabela 1 e Gráfico 1). Esta sobrevida é semelhante à descrita por Lorenzo (1985), entre coelhos pré-termo com a mesma idade gestacional (28 dias), alimentados com leite de coelha, aos 7 dias de vida (70%), embora este tenha obtido uma

sobrevida muito inferior (26%) à observada neste estudo entre coelhos pré-termo, com 28 dias de idade gestacional e que receberam fórmula.

Em relação à hiperoxia, tanto entre os alimentados com dieta padrão, quanto entre os submetidos à restrição nutricional, a sobrevida foi menor em relação aos mantidos em ar ambiente, sugerindo que a hiperoxia seja um fator que contribuiu a uma maior mortalidade (Tabela 1).

Conforme citado anteriormente, não há na literatura modelo de restrição nutricional ou restrição nutricional associada à hiperoxia, em coelhos pré-termo, para efeitos de comparação de nossos resultados.

Em ratos pré-termo, submetidos à hiperoxia ($FiO_2 = 100\%$), Tanswell et al (1989) descreveram uma sobrevida de 41% aos 8 dias de vida e, de 23%, aos 14 dias de vida. Já em ratos recém-nascidos a termo, Frank e Groseclose (1982) descreveram uma sobrevida de 73% entre os ratos recém-nascidos a termo, mantidos em hiperoxia e, de 44%, entre os submetidos à hiperoxia e restrição nutricional, ressaltando que a mesma foi de 100% nos submetidos apenas à restrição nutricional.

A maior sobrevida observada nesta pesquisa, entre os coelhos mantidos em ar ambiente e restrição nutricional, em relação aos que receberam ar ambiente e dieta padrão, resultado aparentemente contrário ao esperado, pode ser elucidada em alguns pontos.

Deve ser salientado que a randomização foi iniciada pelos grupos GIA e GIB e, portanto, quando os grupos GIIA e GIIB foram estudados, os problemas de infra-estrutura, mais graves, ocorridos na primeira fase, já haviam sido resolvidos, tais como a incidência de infecções. Além disso, à

medida em que se desenvolveu o projeto, foi aprimorada a técnica de cuidados com os animais, inclusive com a contratação de um técnico responsável por estes, o que uniformizou os cuidados básicos ministrados.

A hiperoxia influenciou negativamente a sobrevivência, enquanto a restrição nutricional por si só não a afetou. Estudos a partir de modelos experimentais, em ratos submetidos à hiperoxia, descrevem uma mortalidade elevada nos primeiros dias de vida, quando mantidos em concentrações de oxigênio semelhante a 100% (Crapo, 1986), enquanto ocorre uma melhora nesta sobrevivência, quando são utilizadas concentrações de oxigênio próximas a 60%. Portanto, a lesão oxidativa provavelmente acelera mecanismos de lesão de vários órgãos, que culminam com o óbito do animal.

5.2. Efeitos pulmonares

5.2.1. Crescimento pulmonar

Durante a vida intrauterina, em fetos de coelhos, foi descrito na literatura, uma elevação significativa do peso e do volume pulmonares entre o 20º e 27º dias de gestação, da mesma forma que um aumento importante nos respectivos pesos corpóreos neste mesmo período. Após o 27º dia, até o nascimento com 31 dias de gestação, não foram verificadas variações importantes nestes parâmetros (Karnak et al, 1999). Também a relação Peso pulmonar/ Peso corpóreo elevou-se, nesses animais, entre 20 e 25

dias de gestação, mas manteve-se inalterada do 25^o ao 27^o dia e, a partir daí, houve uma diminuição importante desta relação.

Concomitantemente a essas modificações no tamanho do pulmão, ocorre uma diferenciação celular e amadurecimento pulmonar. Nos fetos de coelhas, no 21^o dia de gestação, o pulmão encontra-se na fase glandular, no 25^o no estágio canalicular e, no 28^o dia, surgem os primeiros alvéolos (Kikkawa et al, 1997; Karnak et al, 1999; Fukuda et al, 2000). Todas essas transformações sugerem um crescimento e desenvolvimento pulmonares semelhantes aos de outras espécies, como os ratos (Burri, 1974), apesar de não haverem descrições relativas a coelhos, após o nascimento.

Em ratos, no período pós-natal, são relatadas alterações estruturais importantes no parênquima, devido à formação alveolar, com aumento da área de trocas gasosas e amadurecimento vascular, ocorrendo um maior aumento dos espaços aéreos, em proporção ao crescimento dos tecidos. Até o final da segunda semana pós-natal, há uma hiperplasia celular, com um aumento no conteúdo de DNA pulmonar e uma relação DNA/ proteína constante, representando uma fase de rápida divisão celular, quando o tamanho celular permanece inalterado. Após este período, os conteúdos de DNA e proteína se elevam, mas em velocidades diferentes, com um predomínio da hipertrofia celular (Winick; Noble, 1965).

Vários parâmetros, como peso pulmonar, relação peso pulmonar / peso corpóreo, DNA pulmonar total e número de alvéolos, podem ser utilizados para a análise do desenvolvimento e crescimento pulmonares.

5.2.1.1. Peso Pulmonar

A variabilidade do peso pulmonar relaciona-se ao crescimento e conteúdo pulmonares, além do padrão de crescimento corpóreo, sendo que, alguns autores sugerem que o crescimento e o conteúdo pulmonares tenham uma influência mais importante sobre o peso desse órgão do que o crescimento somático em geral (Wigglesworth et al, 1987).

Os pesos pulmonares observados nesse estudo, nos grupos dieta padrão aos 7 e 11 dias, foram semelhantes aos descritos em fetos de coelhos pré-termo aos 27 dias de gestação (0,98 gramas \pm 0,10)(Karnak et al, 1999), o que sugere que a dieta utilizada, apesar de possuir menor conteúdo protéico que o da dieta ideal, permitiu pesos pulmonares aos 7 e 11 dias de vida semelhantes aos de fetos de coelhas, aos 27 dias de idade gestacional.

Entre os grupos submetidos à restrição nutricional, os pesos pulmonares aos 7 dias de vida, foram menores do que os relatados por Karnak (1999), aos 27 dias de gestação em coelhos pré-termo. Já, aos 11 dias, os coelhos do grupo restrição nutricional e hiperoxia apresentavam maiores pesos pulmonares do que os descritos por Karnak (1999), evidenciando uma contribuição da hiperoxia a essa evolução.

Os pesos pulmonares foram menores nos grupos restrição nutricional em relação aos que receberam dieta padrão, independentemente da concentração de oxigênio administrada aos 7 dias de vida, sugerindo neste período um efeito da dieta sobre o peso pulmonar. No entanto, aos 11 dias de vida, os que receberam restrição nutricional e hiperoxia, apresentaram os

maiores pesos pulmonares, indicando a ocorrência de outros efeitos, além dos nutricionais, sobre esse parâmetro (Tabelas 5 e 6, Gráfico 6 e Anexo E).

Vários autores descreveram os efeitos da restrição nutricional sobre o peso pulmonar, em ratos no período neonatal, reforçando os dados obtidos neste estudo.

Winick; Noble (1966) descreveram uma redução de 48% no peso corpóreo e de 35% no peso pulmonar, como também uma diminuição do conteúdo pulmonar de proteínas, DNA e RNA em ratos recém-nascidos mantidos sob restrição nutricional, do nascimento ao 21º dia de vida. Estes resultados sugerem que, a restrição nutricional no período pós-natal precoce afetou principalmente o número de células, pois as relações DNA / peso pulmonar e DNA/ proteínas permaneceram inalteradas em relação aos controles.

Da mesma forma, Kalenga et al (1987, 1989, 1995) demonstraram diminuição dos pesos corpóreo e pulmonar, conteúdo pulmonar de proteínas e de DNA, como também das relações proteínas/ gramas de pulmão e DNA/ peso pulmonar, além de uma redução proporcional de todos os componentes do parênquima pulmonar, durante restrição nutricional, protéica, em ratos, no período neonatal precoce.

Massaro et al (1985) também demonstraram que a restrição nutricional, em ratos, durante 14 dias, no período pós-natal precoce, crítico para o desenvolvimento pulmonar, diminuiu peso pulmonar e corpóreo, como também o conteúdo de DNA pulmonar.

Estes resultados sugerem que a diminuição do peso pulmonar, conseqüente à restrição nutricional no período neonatal precoce, conforme o observado nesta pesquisa, seria decorrente principalmente, de uma diminuição do número de células, por uma redução na divisão celular, já que esta ocorreu num período de intensa hiperplasia celular.

Não existem na literatura pesquisas sobre a influência da hiperoxia sobre a evolução dos pesos pulmonares em coelhos.

Neste estudo, a hiperoxia, isolada, não afetou o peso pulmonar, o que difere dos resultados descritos na literatura, os quais observaram uma diminuição deste parâmetro durante exposição à hiperoxia (Frank; Groseclose, 1982), utilizando outros modelos animais.

Estes resultados sugerem um efeito aditivo da restrição nutricional sobre o peso pulmonar, quando associada à hiperoxia, o que poderia ser conseqüente à ação de outros fatores, talvez mais relacionados à lesão pulmonar, além dos diretamente associados ao crescimento pulmonar.

De acordo com isto, dentre os grupos que receberam dieta padrão, não houve diferenças quanto aos pesos pulmonares em relação aos mantidos em ar ambiente e aos sob hiperoxia, tanto aos 7, quanto aos 11 dias.

As variações dos pesos pulmonares, no decorrer deste estudo, foram semelhantes nos grupos dieta padrão aos 7 e 11 dias de vida, sugerindo não haver um crescimento importante neste período. Este resultado reforça a hipótese de que possa ter havido a ação de outros fatores, nesse mesmo período, quando se associou a restrição nutricional e a hiperoxia, como uma

hipercelularidade ou um edema intersticial em resposta a uma agressão pulmonar (Gráfico 6), justificando o aumento de peso observado.

Contrariamente às nossas observações, Frank; Groseclose (1982) descreveram menores pesos, conteúdo protéico e de DNA pulmonares, nos grupos hiperoxia e dieta normal, como também nos restrição nutricional e ar ambiente, em ratos recém-nascidos, mantidos em hiperoxia e/ou restrição nutricional por 7 dias. Essa redução foi mais importante nos grupos hiperoxia e restrição nutricional, evidenciando efeitos inibitórios sobre o crescimento pulmonar, mais intenso quando foram associadas à hiperoxia e restrição nutricional, no período pós- natal.

5.2.1.2. Relação peso pulmonar / peso corpóreo

No período intrauterino, em fetos de coelhos, as descrições da evolução do peso pulmonar e da relação PP/PC mostram que estas elevam-se entre o 20^o e 25^o dias de gestação. Entre o 25^o e o 27^o dias de gestação, ocorre ainda uma elevação no PP, mas o PP/PC mantém-se inalterado, sendo que, após, há uma diminuição significativa do PP/PC ($0,02 \pm 0,00$), provavelmente por maiores elevações no peso corpóreo em relação ao peso pulmonar (Karnak et al,1999).

Neste estudo, em relação ao grupo restrição nutricional, aos 7 dias de vida, observou-se menores pesos pulmonares, como também, menores médias de pesos corpóreos em relação ao grupo dieta padrão. Portanto, os menores PP/PC, no grupo restrição nutricional neste momento, sugerem que a restrição nutricional contribuiu, tanto para menores pesos pulmonares,

como para menor crescimento somático, talvez com efeito mais intenso sobre o peso pulmonar (Tabela 5, Gráfico 7, Anexo F). A restrição nutricional realizada neste modelo, reduziu todos os componentes da dieta padrão em 30%, o que seguramente produziu um menor crescimento celular.

Entre os grupos dieta padrão, PP/PC foram semelhantes nos mantidos em ar ambiente e nos submetidos à hiperoxia, aos 7 e 11 dias. Nos grupos restrição nutricional, observou-se maiores PP/PC aos 7 e 11 dias entre os também em hiperoxia em relação aos em ar ambiente (Tabelas 5 e 6, Gráfico 7, Anexo F).

Portanto, a hiperoxia, isolada, não alterou Peso pulmonar/ Peso corpóreo mas, quando associada à restrição nutricional, elevou esta relação, sugerindo, também aqui um efeito aditivo.

O fato dos PP/PC serem maiores no grupo restrição nutricional e hiperoxia, em relação aos outros grupos sugere maiores elevações do peso pulmonar em relação ao peso corpóreo no mesmo período, reforçando um efeito desacelerador mais acentuado do crescimento somático, acrescido de uma provável produção de respostas inflamatórias, a uma agressão pulmonar pela hiperoxia, com edema e hiper celularidade, constituindo um efeito mais específico no pulmão. Portanto, como peso pulmonar/ peso corpóreo é uma relação, o aumento do peso pulmonar seria a expressão de outras modificações estruturais.

Em relação à evolução do PP/ PC entre os 7 dias e os 11 dias, observou-se nos grupos mantidos com dieta padrão, que esta se reduziu. Provavelmente, isto ocorreu, porque as médias de peso corpóreo elevaram-

se em maior velocidade que os peso pulmonares, no decorrer do estudo, entre os grupos que receberam dieta padrão (Gráfico 7).

Estes resultados são reforçados pelo fato de que, no grupo restrição nutricional, dos 7 aos 11 dias, a variação do peso pulmonar não foi proporcional à variação ponderal, neste período (Gráfico 7).

No entanto, entre os com restrição nutricional e hiperoxia, houve uma elevação significativa do peso pulmonar aos 11 dias em relação aos 7 dias, com uma menor elevação das médias de peso corpóreo neste período, sugerindo que realmente esta elevação do PP/PC neste grupo, aos 11 dias de vida se deva a um aumento no peso pulmonar, que não corresponde, necessariamente, a crescimento, mas à multiplicação de outros componentes da arquitetura pulmonar, que se tornam mais evidentes aos 11 dias, conforme mencionado anteriormente, provavelmente por uma ação mais prolongada da hiperoxia.

Deve ser acrescentado ainda, que provavelmente ocorram repercussões sobre a atividade de enzimas, responsáveis pelo crescimento tecidual e metabolismo pulmonar, pois estas variam em função exponencial ao tamanho do órgão (Baldwin; Sainz, 1995).

Além disso, provavelmente, durante a restrição nutricional, ocorra uma diminuição das enzimas antioxidantes (Frank,1987), possibilitando a exacerbação da resposta inflamatória pela hiperoxia.

5.2.1.3. Volume pulmonar total (VPT)

O volume pulmonar é determinado pelas densidades de volume dos espaços aéreos, dos alvéolos, dos capilares, do parênquima e das células intersticiais, endoteliais e epiteliais (Burri, 1974).

Na literatura, é descrita uma elevação no volume pulmonar desde o nascimento. No entanto, verificando-se as taxas de crescimento das estruturas pulmonares, os vários compartimentos não parecem crescer proporcionalmente.

Em crianças, Zeltner; Burri(1987) e Zeltner et al (1987) descreveram 2 fases distintas de desenvolvimento e crescimento pulmonar pós-natal, ocorrendo a primeira, desde o nascimento até 18 meses de idade, caracterizada por elevação do volume dos compartimentos envolvidos com o transporte de oxigênio, que são os capilares e os espaços aéreos. Este aumento acontece em maior proporção que o volume pulmonar total e às custas de uma diminuição de massa tecidual septal. Enquanto os compartimentos endotelial e epitelial mantêm um crescimento proporcionado, o interstício diminui de forma importante, com redução do compartimento celular.

Comparando-se os volumes pulmonares totais entre os grupos dieta padrão e restrição nutricional, nesta pesquisa, observou-se, aos 7 dias de vida, maiores volumes pulmonares totais nos grupos dieta padrão, em ambas as concentrações de oxigênio administradas, observando-se uma influência negativa da restrição nutricional sobre o volume pulmonar total (Tabela 5, Gráfico 8, Anexo G).

Da mesma forma, vários autores descreveram uma diminuição importante no volume pulmonar total, em ratos submetidos à restrição nutricional no período neonatal (Das, 1984; Massaro et al, 1985; Kalenga et al, 1995).

Também aos 11 dias, o maior volume pulmonar ocorreu no grupo dieta padrão e ar ambiente em relação à restrição nutricional e ar ambiente (Tabela 6, Gráfico 8). Já entre os grupos sob hiperoxia, independentemente da dieta, este foi semelhante, embora menor do que o do grupo dieta padrão e ar ambiente.

Diferentemente de Burri; Weibel (1971), nesta pesquisa foi observado que a hiperoxia não alterou o volume pulmonar, pois entre os grupos dieta padrão, este foi semelhante entre os submetidos a diferentes concentrações de oxigênio, aos 7 e 11 dias (Tabelas 5 e 6, Gráfico 8). Isto também ocorreu entre os submetidos à restrição nutricional e diferentes concentrações de oxigênio, aos 11 dias, o que provavelmente reflete um efeito compensatório da redução do volume produzido pela restrição nutricional e o aumento decorrente das modificações estruturais impostas pela hiperoxia.

5.2.1.4. Volume pulmonar específico (VPE)

Verificou-se menores volumes pulmonares específicos, entre os que sofreram restrição nutricional, em relação à dieta padrão, independentemente da concentração de oxigênio administrada, aos 7 dias de vida, como também aos 11 dias de vida, somente nos mantidos em ar

ambiente, sugerindo uma influência negativa da restrição nutricional sobre o volume pulmonar específico, pois mesmo corrigindo-se o volume pulmonar para o crescimento corpóreo, foram mantidos os menores valores nos grupos restrição nutricional (Tabelas 5 e 6, Gráfico 9, Anexo H).

Já nos grupos hiperoxia, aos 11 dias, este parâmetro foi semelhante, independentemente da dieta utilizada.

Diferentemente dos dados obtidos neste estudo, onde houve uma diminuição no volume pulmonar específico nos animais submetidos à restrição nutricional, alguns autores (Das, 1984; Kalenga et al, 1995) descreveram um aumento no volume pulmonar específico, em ratos recém-nascidos que sofreram restrição nutricional. Eles sugerem que a restrição nutricional não afetou o pulmão e a massa corpórea de forma proporcionada, ocorrendo provavelmente, uma maior depleção de tecidos menos essenciais, como tecidos gorduroso e muscular, em benefício de órgãos vitais, como o pulmão. Outra causa para um maior volume pulmonar em relação ao corpóreo, elevando o volume pulmonar específico, seria o desenvolvimento de lesões enfisematosas, no parênquima pulmonar e, conseqüentemente, maior volume pulmonar.

Os diferentes resultados quanto à influência da restrição nutricional sobre o volume pulmonar específico, também poderiam ser devidos a procedimentos técnicos envolvidos na avaliação do tamanho pulmonar e da massa corpórea, como a diferentes graus de restrição nutricional, bem como a momentos diversos da instalação desta restrição.

Neste estudo, não se observou influência da hiperoxia sobre o volume pulmonar específico, já que este foi semelhante entre os grupos dieta padrão, em ambas as concentrações de oxigênio, aos 7 dias e 11 dias.

Ocorreram maiores volumes pulmonares específicos no grupo restrição nutricional e ar ambiente em relação à restrição nutricional e hiperoxia, aos 7 dias, mas este parâmetro foi semelhante entre estes grupos aos 11 dias de vida. Portanto, a hiperoxia não influenciou de forma importante o volume pulmonar específico, quando isolada. Talvez, apenas quando associada à restrição nutricional, reduza esta relação, através de seus efeitos sobre outros componentes pulmonares, como o número de alvéolos.

Da mesma forma que neste estudo, Frank (1987), analisando os efeitos da hiperoxia durante 14 dias, em ratos, no período neonatal, não observou influência da mesma sobre os volumes pulmonares totais e específicos.

5.2.2. Morfometria pulmonar

5.2.2.1. Número de alvéolos, Intercepto linear médio (ILm), Área de superfície interna (ASI)

Em várias espécies, apesar da septação dos ductos alveolares iniciar-se ainda no período fetal, a maior produção de alvéolos, por esta via, ocorre após o nascimento, caracterizando uma fase de rápida produção alveolar (Burri, 1974; Massaro et al, 1985).

No período neonatal, com a subdivisão dos sáculos, ocorre uma diminuição das dimensões alveolares (ILm) e da espessura dos septos interaveolares, contribuindo para o aumento da superfície de trocas gasosas (ASI) (Burri et al, 1974).

Apesar do processo de septação terminar, a área de superfície de trocas gasosas continua a aumentar, com formação de alvéolos maiores, através de mecanismos outros, além da septação. Não está claro ainda, se este aumento no tamanho alveolar ocorra devido a um aumento das dimensões de alvéolos já existentes, à formação de novos e grandes alvéolos, ou através de ambos os processos (Massaro et al, 1985).

Em ratos, a septação completa-se ao final da segunda semana de vida pós-natal e produz uma grande expansão da área de superfície de trocas gasosas no pulmão, sem um aumento tão intenso, proporcional, do volume pulmonar (Burri, 1974).

Dentre os parâmetros existentes, pode-se avaliar as mudanças que ocorrem durante a alveolização, utilizando-se: a contagem dos alvéolos; a soma das médias dos interceptos (intercepto linear médio)(ILm), a qual reflete o tamanho alveolar e a distância entre as paredes dos alvéolos, e a área de superfície interna (ASI), que representa a interface alvéolo-capilar, refletindo a superfície de trocas gasosas (Dunnill, 1962; Margraf et al, 1991; Massaro; Massaro, 2002).

Neste estudo, entre os grupos submetidos à restrição nutricional, como também entre os submetidos à hiperoxia, aos 7 e aos 11 dias, verificou-se uma diminuição do número de alvéolos (Tabela 7, Gráfico 10, Anexo I).

Ao contrário do descrito na literatura (Burri, 1974), não se observou um aumento do número de alvéolos no 11º dia de vida, em relação ao 7º dia em todos os grupos (Tabela 7, Gráfico 10).

Quanto aos interceptos lineares médios (ILm), nos grupos restrição nutricional e dieta padrão, estes foram semelhantes, aos 7 e aos 11 dias, não evidenciando, um efeito da restrição nutricional sobre as dimensões alveolares (Tabela 8, Gráfico 11, Anexo J).

No entanto, observou-se uma elevação dos mesmos, nos grupos submetidos à hiperoxia, independentemente da dieta, aos 7 e aos 11 dias. Este resultado sugere a presença de alvéolos maiores, como também de um espessamento septal, aumentando a distância entre os alvéolos, sob a ação da hiperoxia.

Apenas no grupo ar ambiente e restrição nutricional, ocorreu uma diminuição desta medida, aos 11 dias em relação aos 7 dias, reproduzindo a evolução esperada da alveolização, de acordo com a literatura (Gráfico 11).

Em relação à área de superfície interna (ASI), aos 7 dias de vida, nos grupos restrição nutricional, tanto em ar ambiente quanto em hiperoxia, ocorreu uma diminuição em relação aos dieta padrão. No entanto, aos 11 dias, estas foram semelhantes (Tabela 9, Gráfico 12, Anexo K).

Portanto, a restrição nutricional diminuiu o número de alvéolos, sem alterar as dimensões (ILm) destes, aos 7 e aos 11 dias, com diminuição da área de troca gasosa (ASI) e da espessura do septo interalveolar, apenas aos 7 dias. Neste momento, a diminuição da ASI foi concomitante à diminuição do volume pulmonar específico (Tabela 5, Gráfico 9).

Vários estudos experimentais têm descrito uma associação entre restrição nutricional e alterações estruturais do parênquima pulmonar.

Das (1984), Massaro et al (1985), assim como neste estudo, descreveram uma redução do número de alvéolos sob a influência da restrição nutricional, em ratos, no período neonatal precoce. Massaro et al (1985) sugerem que esta altere a formação alveolar, através de outras vias formadoras de alvéolos, que não a septação, já que estes autores, também não detectaram alterações nas dimensões alveolares (ILm).

Provavelmente, a depleção tecidual, nesta fase de rápida produção alveolar, modifique a programação genética para a formação de um determinado número de alvéolos, devido à deficiência de substratos.

Conforme descrito na literatura, a restrição nutricional produz uma redução do conteúdo de DNA pulmonar (Winick; Noble, 1965; Massaro et al, 1985; Kalenga et al, 1987) associado a uma intensificação da apoptose das células das paredes alveolares (Massaro et al, 2001), com uma desaceleração da hiperplasia celular em um momento de intensa formação alveolar, e de outros tecidos pulmonares, causando uma redução importante no número de alvéolos.

Em relação aos efeitos da restrição nutricional sobre as dimensões alveolares, os resultados são heterogêneos, sendo que alguns descreveram um aumento (Kalenga et al, 1995a; Das, 1984), outros uma diminuição (Bruce et al, 1989), enquanto outros não observaram alterações nestas dimensões (Massaro et al, 1985).

Quanto a estes resultados heterogêneos descritos na literatura, deve-se salientar que as técnicas que utilizam cortes histológicos únicos para medir dimensões alveolares, podem ser insensíveis para detectar diferenças no tamanho alveolar, que resultariam em modificações na área de superfície (Burri, 1974). Da mesma forma, discute-se a precisão da medida da ASI para refletir alterações na superfície de trocas gasosas, devido ao fato de que os espaços aéreos podem não ser precisamente distintos dos ductos alveolares em cortes histológicos únicos, tornando imprecisa, a média dos interceptos (ILm) e, portanto, este parâmetro, determinado desta maneira, pode representar, em uma extensão não mensurável, a combinação de alvéolos e ductos alveolares (Massaro et al, 1985; Randell et al, 1989).

Nos grupos submetidos à hiperoxia, ocorreu um aumento da espessura dos septos interalveolares, aos 7 e 11 dias, independentemente da dieta administrada e uma diminuição da espessura destes aos 7 dias, no grupo restrição nutricional e ar ambiente, em relação aos dieta padrão e ar ambiente (Tabela 10, Gráfico 13, Anexo L).

Neste estudo, a hiperoxia diminuiu o número de alvéolos, com aumento das dimensões dos mesmos (ILm) e espessamento dos septos interalveolares, aos 7 e 11 dias, embora não tenha alterado a área de superfície interna (ASI) e o volume pulmonar específico.

Vários autores têm descrito que, animais expostos à hiperoxia por vários dias, evoluem com uma redução do número de alvéolos e da área de superfície de trocas gasosas, com uma inibição da septação e diminuição do

desenvolvimento dos capilares alveolares (Randell et al, 1989; Coalson et al, 1992; Warner et al, 1998; Coalson et al, 1999).

Em relação à ação da hiperoxia sobre as dimensões alveolares, no período neonatal, os estudos descreveram resultados diversos, em ratos, sendo que alguns (Randell et al, 1989) não observaram alterações, sugerindo que a hiperoxia inibiria também outros mecanismos de formação alveolar, além de sua ação sobre a septação.

Já, Warner et al (1998) descreveram um alargamento dos espaços aéreos terminais, além de aumento de espessura dos septos interalveolares, com importante processo fibroproliferativo.

Estas alterações descritas por Warner et al (1998), também foram verificadas por Coalson et al (1992, 1999), em modelos experimentais de displasia broncopulmonar, utilizando babuínos pré-termo submetidos à hiperoxia e ventilação mecânica por 21 até 125 dias.

Estes resultados sugerem um papel importante da hiperoxia sobre estas alterações estruturais pulmonares, principalmente em relação à inibição do desenvolvimento alveolar, associada a uma redução dos índices de proliferação celular pulmonares (Warner et al, 1998).

Além disso, Massaro; Massaro (2002) sugerem uma redução da área de superfície de trocas gasosas causada, por uma modulação das necessidades diminuídas de oxigênio, em um ambiente com grandes concentrações deste substrato.

Portanto, como a hiperoxia produz uma agressão pulmonar importante, com respostas inflamatórias através do afluxo de células, edema

intersticial e talvez interação com receptores que modulem o crescimento e o desenvolvimento pulmonares, além de alterar concomitantemente o crescimento somático, alguns discutem se esta redução do número de alvéolos poderia refletir, tanto uma diminuição das necessidades de oxigênio, devido a um meio rico deste como dos efeitos de uma toxicidade direta do mesmo sobre o parênquima pulmonar.

Quando a restrição nutricional e a hiperoxia foram associadas, a redução do número de alvéolos foi ainda mais intensa e verificou-se uma tendência à diminuição da área de superfície interna (ASI) aos 11 dias, em relação aos dieta padrão e hiperoxia. Entre os 7 e 11 dias, não se detectaram diferenças nos grupos (Tabela 9, Gráfico 12). Portanto, a restrição nutricional e a hiperoxia diminuíram o número de alvéolos, sendo seu efeito mais intenso, quando associadas.

Provavelmente, o efeito aditivo da restrição nutricional associada a hiperoxia sobre a arquitetura pulmonar seja consequente a uma desaceleração da divisão celular, causada, tanto pela restrição nutricional, quanto pela hiperoxia, modulando as alterações decorrentes do processo inflamatório durante a hiperoxia. Aqui, provavelmente a deficiência de substratos, como calorias, proteínas, oligoelementos levaria a uma diminuição de enzimas responsáveis por um desenvolvimento pulmonar normal, e uma resposta adequada à hiperoxia, como as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase, a catalase, a glutation – peroxidase e a COA. A deficiência destas, levaria a uma exacerbação da resposta inflamatória, modulando receptores e moléculas, como a proteína ligada ao

ácido retinóico, a GMP cíclica- fosfodiesterase envolvidos na septação e na morfogênese pulmonar, causando assim, alterações irreversíveis no parênquima pulmonar (Massaro; Massaro, 2002).

Talvez, associados, desencadeiem mecanismos que intensifiquem a produção de fator transformador de crescimento β , o qual estaria envolvida com a inibição de alguns processos durante a morfogênese (Warburton et al, 1999; Cardoso, 2000).

Acompanhando esta modulação estaria o fato de que o período neonatal precoce, durante o qual ocorre a formação rápida dos alvéolos por septação e uma hiperplasia celular, com concomitante aumento de parênquima pulmonar, seja um período sensível a efeitos de fatores que possam inibir e/ou modificar este desenvolvimento.

5.2.2.2. Densidade de fibras elásticas e de colágeno no parênquima pulmonar

Durante o desenvolvimento pulmonar fetal, há uma elevação progressiva do conteúdo de tecido elástico parenquimatoso. O período em que detectam-se maiores quantidades de elastina no parênquima pulmonar, coincide com a fase de formação alveolar rápida (Starcher, 1986). Sugere-se que o desenvolvimento sacular seja guiado por uma localização pré-programada das fibras elásticas, nas extremidades dos septos secundários e, provavelmente, as fibras colágenas também estejam envolvidas neste processo (Burri, 1997).

Considerando-se os resultados deste estudo, em relação às fibras elásticas aos 7 dias e a densidade do colágeno aos 7 e 11 dias, nos grupos submetidos à restrição nutricional, a redução sugere ação desaceleradora da restrição nutricional, sobre estes depósitos (Tabelas 11 e 12, Gráficos 14 e 15, Anexos M e N).

Quando a restrição nutricional foi associada à hiperoxia, também ocorreu uma redução semelhante à descrita anteriormente, quando comparados com o grupo restrição nutricional e ar ambiente.

Portanto, observou-se uma redução dos depósitos de colágeno e de fibras elásticas, sob a ação da restrição nutricional isolada e também, quando associada à hiperoxia.

Este efeito da restrição nutricional tem sido descrito na literatura e, interpretado como consequência da depleção de substratos (Das, 1984; Kalenga et al, 1989).

Já a associação de hiperoxia com alterações do conteúdo de fibras elásticas do parênquima pulmonar, é mais contraditória. Bruce et al (1993), observaram uma redução do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar, durante período de hiperoxia, sugerindo que o processo inflamatório aumentaria a produção de enzimas, responsáveis pela degradação proteolítica das fibras elásticas. Reforçando estes resultados, os mesmos autores detectaram redução do RNA mensageiro para tropoelastina em ratos expostos à hiperoxia, durante o período neonatal precoce.

Já Warner et al (1998) descreveram uma elevação do conteúdo de colágeno no parênquima pulmonar e não detectaram alterações de elastina.

Alguns estudos, em modelos experimentais de displasia broncopulmonar, utilizando ventilação mecânica e hiperoxia, descreveram elevações dos conteúdos de elastina e de colágeno pulmonares (Coalson et al, 1999; Albertine et al, 1999; Thibeault et al, 2000; Thibeault et al, 2003).

Todos estes descreveram, além de alterações no conteúdo destas fibras no parênquima pulmonar, modificações importantes na disposição destas nos sáculos, além de um aspecto grosseiro e fragmentado, diferente do seu habitual, fino e rendilhado. Neste estudo, também observou-se esse aspecto fragmentado e grosseiro, como também uma disposição desorganizada das fibras colágenas, além de fibras elásticas espessadas e grosseiras no parênquima pulmonar, no grupo submetido à hiperoxia.

A restrição nutricional provoca deficiência global dos nutrientes e, principalmente a deficiência protéica, calórica e de cobre, estão envolvidas na produção de proteínas e da enzima lysyl- oxidase (Tinker; Rucker, 1985), as quais atuam na secreção de miofibrilas para a matriz extracelular, sendo esta a primeira etapa na formação de um local para posterior deposição de elastina e, também na transcrição nuclear, translação e produção de pontes entre as diferentes moléculas, para a formação da elastina.

Dessa maneira, a nutrição desempenha um papel importante na produção e na deposição de elastina, sendo a restrição nutricional um fator modificador deste processo.

Acredita-se que a hiperoxia diminua a atividade da lysyl- oxidase e altere os depósitos de fibras elásticas e colágeno, reduzindo também a produção das mesmas, além de promover sua degradação, através do

influxo de neutrófilos, com liberação de enzimas proteolíticas, como as proteases, elastase e tropoelastases, além de diminuição das enzimas inibidoras da elastase (Bruce et al, 1989).

Como as fibras elásticas estão envolvidas em uma das vias de formação alveolar, a septação, a interferência em seus depósitos contribuiria também para a diminuição dos números de alvéolos, conforme resultados observados anteriormente.

5.3. Considerações finais

Atualmente, com a maior sobrevivência de recém-nascidos pré-termo extremo, observa-se um aumento desta população nas unidades de terapia intensiva neonatal.

Estes recém-nascidos têm em comum uma imaturidade pulmonar, encontrando-se ainda em uma fase de desenvolvimento pulmonar, anterior à alveolização, ou ainda em seu início. Portanto, esta imaturidade torna-os vulneráveis à ação de fatores que possam alterar, tanto a septação, quanto o arranjo estrutural deste parênquima. Dentre estes, estão a hiperoxia, o barotrauma, o volutrauma, e o uso de medicações, como o uso de corticosteróide ante e pós-natal.

A expressão clínica dessas modificações estruturais, conseqüentes a uma distorção ou inibição de diversos aspectos do crescimento e

desenvolvimento pulmonares, corresponde à assim chamada “nova” displasia broncopulmonar.

Intermediando todo esse processo e, provavelmente, constituindo um mecanismo ou fator modulador deste, nesta fase, encontra-se a nutrição. Este estudo, bem como outros presentes na literatura, constituem evidências de que distúrbios dessa nutrição, como nas situações de restrição nutricional aqui exemplificada, podem intensificar o grau de acometimento pulmonar por ação de fatores adversos.

Novos estudos ainda se fazem necessários, no sentido de diferenciar os efeitos quantitativos das deficiências seletivas de nutrientes, sobre essa evolução. Com base nos resultados destes, novas recomendações sobre a nutrição desses recém-nascidos no período neonatal poderão ser feitas, contribuindo para uma melhor evolução clínica destes, a curto e a longo prazo.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. Em coelhos pré-termo, submetidos à hiperoxia e/ ou restrição nutricional

6.1.1. A restrição nutricional

- repercutiu sobre o crescimento somático, através da redução do ganho de peso e não influenciou a sobrevivência;
- alterou o crescimento e a morfologia pulmonares, através da redução dos volumes pulmonares total e específico, do número de alvéolos e da deposição de fibras elásticas e de colágeno, aos 7 e 11 dias;
- apenas aos 7 dias, reduziu o peso pulmonar, a relação PP/PC, a área de superfície interna, como também a espessura dos septos interalveolares;
- não teve efeitos sobre o intercepto linear médio

6.1.2. A hiperoxia, isolada

- elevou a mortalidade e não alterou a evolução ponderal;
- modificou a arquitetura pulmonar, reduzindo o número de alvéolos e aumentando suas dimensões, bem como a espessura dos septos interalveolares, aos 7 e aos 11 dias de vida;
- também, reduziu o depósito de colágeno, aos 11 dias;
- não alterou o peso pulmonar, PP/PC, volume pulmonar total, VPE, deposição de fibras elásticas, aos 7 e aos 11 dias.

6.1.3. A restrição nutricional associada à hiperoxia

- influenciou a evolução ponderal, de forma semelhante à restrição nutricional e não alterou a mortalidade;
- apresentou repercussões sobre o crescimento e a arquitetura pulmonares, através da elevação do peso pulmonar e da relação PP/PC, aos 11 dias, assim como da redução dos volumes pulmonares total e específico aos 7 dias;
- aos 11 dias, apenas apresentou redução destes parâmetros, em relação ao grupo dieta padrão e ar ambiente;
- reduziu o número de alvéolos e aumentou as dimensões destes, a espessura dos septos interalveolares, como também reduziu o depósito de colágeno, aos 7 e 11 dias;
- não alterou o depósito de fibras elásticas.

6.1.4. *A hiperoxia influenciou a sobrevivência e a restrição nutricional, o crescimento de coelhos pré-termo; de forma variável, a arquitetura pulmonar. Associadas, seus efeitos sobre o crescimento, número de alvéolos e a deposição de colágeno foram intensificados. Isto ilustra o papel da nutrição como modulador da lesão pulmonar pela hiperoxia, pelo menos de forma seletiva.*

7. ANEXOS

ANEXO A - MÉDIA(DP), MEDIANA DE PESOS DIÁRIOS

Grupo	Aval	n	Minimo	Maximo	mediana	Media	Dp
GIA	D0	120	18,23	46	31,5	31,25	5,45
	D1	88	17,4	42,7	29,09	29,76	5,5
	D2	79	18,7	42,62	29,6	29,82	5,57
	D3	70	17,7	45,7	30,75	30,75	5,73
	D4	69	17,88	50,19	32,8	32,99	6,65
	D5	66	18	51,8	33,45	34,2	6,68
	D6	63	18,4	49,65	35,8	35,87	6,93
	D7	55	17,9	48,4	35,84	36,07	7,1
	D8	27	24,6	50,07	40,2	39,17	6,44
	D9	23	26,6	50	39	39,07	6,53
	D10	21	26,5	52,6	40,6	40,16	6,65
D11	19	26	54,6	41,5	40,88	8,08	
GIB	D0	232	15,7	47,73	32,04	31,59	5,7
	D1	186	15,3	46,2	30,39	30,33	5,49
	D2	169	17,3	47,7	30,51	30,34	5,56
	D3	157	16,9	49	31,7	31,67	5,78
	D4	146	21,39	51,09	33,82	33,64	5,86
	D5	138	22,7	50,3	35,55	35,24	5,6
	D6	123	26	55,1	37,7	37,55	6,02
	D7	106	26,9	55,5	39,15	39,27	5,88
	D8	72	27,6	58	40,5	40,68	6,02
	D9	41	27,9	59,6	42,2	41,87	6,11
	D10	23	29,4	63,6	42	42,4	7,62
D11	17	29,5	65	39,3	41,44	8,42	
GIIA	D0	72	17,79	45,59	32,5	32,6	6,29
	D1	57	15,2	43,3	32,4	31,26	5,97
	D2	55	13,5	42,8	31,1	30,1	6,19
	D3	52	15	43,7	32,2	31	5,92
	D4	50	21,5	44,1	33,55	32,87	5,86
	D5	48	23	43	34,8	33,13	5,61
	D6	47	22,5	43,9	33,8	33,5	5,41
	D7	46	23	43,53	35,7	34,58	5,27
	D8	25	26,2	42,2	38	36,94	4,59
	D9	25	25,2	44	37,2	36,7	5,17
	D10	25	25,4	45,3	39,6	38,24	5,64
D11	24	26	46,6	39,5	38,45	5,2	
GIIB	D0	368	11,7	47,78	30,56	30,95	5,99
	D1	330	15,1	46	29	29,28	5,93
	D2	315	13,5	45,6	28,5	28,88	6,07
	D3	300	4,5	48,3	28,7	29,25	6,43
	D4	283	3,6	46,4	30	30,34	6,12
	D5	230	13,2	47	31,3	31,7	5,83
	D6	160	20	47	32,4	32,89	5,7
	D7	124	20	46,8	34,4	33,74	5,48
	D8	71	25	48	35,2	35,18	4,56
	D9	44	26,6	47,7	35	35,13	5,26
	D10	32	26,1	46,3	33,55	34,44	4,91
D11	23	27,2	50,5	34,25	36,23	5,78	

**ANEXO B – MÉDIA(DP), MEDIANA DOS GRUPOS SACRIFICADOS AOS 7 DIAS
DE VIDA**

Grupo	Dias	n	minimo	maximo	mediana	media	dp
GIA	0	19	21.65	37.59	30.89	30.12	4.91
	1	19	19.40	36.80	27.50	27.67	4.66
	2	19	18.70	36.70	28.30	27.74	4.76
	3	19	17.70	37.20	29.00	28.36	5.22
	4	19	17.88	42.30	31.10	30.10	6.11
	5	19	18.00	40.70	32.20	31.20	6.06
	6	19	18.40	42.40	33.70	31.70	6.60
	7	19	17.90	42.40	32.10	30.84	6.39
GIB	0	19	27.31	40.42	32.27	32.16	3.48
	1	19	25.30	38.70	30.30	30.35	3.33
	2	19	23.80	38.69	29.30	30.02	3.51
	3	19	23.70	39.10	30.20	30.54	4.24
	4	19	25.00	40.07	30.40	31.24	4.09
	5	19	26.70	42.50	32.10	32.69	4.09
	6	19	28.60	45.90	34.10	34.97	4.88
	7	19	29.70	49.80	34.80	35.63	4.95
GIIA	0	21	22.21	45.59	32.21	32.08	5.68
	1	21	21.60	43.30	30.40	30.15	5.27
	2	21	21.10	42.80	30.00	29.50	5.44
	3	21	22.00	43.70	30.40	29.75	5.35
	4	21	21.50	42.80	31.00	30.84	5.20
	5	21	23.00	43.00	31.20	31.15	5.54
	6	21	22.50	43.90	32.20	31.37	5.23
	7	21	23,00	43,5	32,3	32,35	5,04
GIIB	0	23	22.31	41.27	32.90	32.40	5.24
	1	23	19.30	40.80	30.80	30.15	5.59
	2	23	18.00	39.00	28.80	29.40	5.92
	3	23	17.40	40.50	28.80	29.43	6.03
	4	23	18.20	42.80	30.60	30.42	6.09
	5	23	18.90	42.90	29.30	31.09	6.00
	6	23	20.00	40.40	30.40	31.89	5.53
	7	23	20.00	41.70	33.60	32.03	5.57

ANEXO C – MÉDIA(DP), MEDIANA DOS GRUPOS SACRIFICADOS AOS 11 DIAS DE VIDA

Grupo	Dias	N	minimo	Maximo	mediana	media	dp
GIA	0	19	24.19	42.32	33.33	32.91	5.09
	1	19	21.50	40.70	30.44	30.77	5.23
	2	19	20.30	40.33	30.20	30.30	5.46
	3	19	21.20	41.20	30.60	31.15	5.74
	4	19	22.10	45.00	32.90	33.65	6.37
	5	19	22.80	45.40	33.40	34.02	6.16
	6	19	23.50	47.80	35.70	35.14	6.02
	7	19	24.70	47.68	37.00	36.29	6.49
	8	19	24.60	47.80	38.20	37.43	6.59
	9	19	26.60	50.00	38.30	38.31	6.82
	10	19	26.50	52.60	40.60	39.63	6.74
	11	19	26.00	54.60	40.40	40.47	7.78
GIB	0	17	25.64	42.70	32.50	33.16	4.74
	1	17	24.70	43.10	29.00	30.91	5.13
	2	17	22.90	43.60	29.30	30.62	5.50
	3	17	22.80	46.30	30.20	31.95	6.33
	4	17	24.00	46.70	31.80	33.85	6.18
	5	17	24.20	49.30	32.50	34.57	6.61
	6	17	26.00	55.10	35.40	37.31	7.22
	7	17	26.90	55.50	36.70	38.12	7.09
	8	17	27.60	58.00	39.60	40.30	7.49
	9	17	27.90	59.60	40.40	40.94	7.76
	10	17	29.40	63.60	41.60	41.97	8.26
	11	17	29.50	65.00	39.60	41.96	8.30
GIIA	0	24	24.99	42.72	36.77	35.66	4.54
	1	24	24.20	40.90	35.15	34.00	4.25
	2	24	24.50	39.80	34.25	33.47	4.30
	3	24	23.00	41.20	34.35	33.93	4.56
	4	24	23.30	44.10	35.40	35.69	5.47
	5	24	24.90	41.00	37.10	35.33	4.79
	6	24	25.70	43.00	37.05	35.60	4.85
	7	24	24.80	43.53	37.20	36.44	4.88
	8	24	26.20	42.20	38.00	36.98	4.68
	9	24	25.20	44.00	38.70	37.13	5.30
	10	24	25.40	45.30	39.60	38.13	5.76
	11	24	25.40	46.60	39.49	37.91	5.74
GIIB	0	23	27.33	41.86	33.43	33.52	4.25
	1	23	24.70	40.60	30.40	31.70	4.36
	2	23	22.90	40.70	30.50	31.14	5.04
	3	23	21.80	42.30	31.60	31.72	5.52
	4	23	22.20	42.20	31.80	32.15	5.66
	5	23	22.60	44.30	31.70	33.00	5.18
	6	23	24.20	45.50	32.30	33.87	5.61
	7	23	25.20	46.80	34.00	33.77	5.31
	8	23	25.40	48.00	34.20	35.14	5.82
	9	23	26.60	47.20	34.00	34.84	5.59
	10	23	28.00	46.30	34.50	35.10	5.20
	11	23	27.20	50.50	34.20	36.06	5.71

ANEXO D – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DO PESO DE NASCIMENTO E DO PESO AOS 7 DIAS E AOS 11 DIAS DE VIDA, CONFORME OS GRUPOS DE ESTUDO

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
GIA (7 dias)	19	- 4,58	6,41	0,78	0,72	3,29
GIIA (7 dias)	21	- 2,49	6,09	- 0,14	0,27	2,21
GIB (7 dias)	19	- 0,87	9,38	3,24	3,47	2,16
GIIB (7 dias)	23	- 4,07	3,22	- 0,23	- 0,37	2,37
GIA (11 dias)	19	1,81	13,5	7,02	7,56	3,33
GIIA(11 dias)	24	- 2,78	8,69	2,27	2,25	3,30
GIB(11 dias)	17	1,38	22,30	7,68	8,80	4,45
GIIB (11 dias)	23	- 1,26	10,33	1,94	2,54	2,60

ANEXO E – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DO PESO PULMONAR NOS GRUPOS ESTUDADOS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
PP	GIA 7D	17	0.63	1.34	0.80	0.83	0.19
	GIB 7D	17	0.59	1.61	0.93	0.96	0.28
	GIIA 7D	21	0.40	1.03	0.62	0.64	0.16
	GIIB 7D	22	0.51	1.27	0.71	0.77	0.21
	GIA 11D	18	0.57	1.61	0.78	0.83	0.24
	GIB 11D	17	0.70	1.21	0.91	0.92	0.14
	GIIA11D	24	0.46	0.97	0.74	0.74	0.15
	GIIB11D	23	0.69	1.59	1.02	1.06	0.25

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS PESOS PULMONARES

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7= GIB7	0.1063
GIIA7=GIIB7	0.0197
GIA7=GIIA7	0.0014
GIB7=GIIB7	0.0227
GIA11=GIB11	0.1896
GIIA11=GIIB11	<.0001
GIA11= GIIA11	0.1408
GIB11= GIIB11	0.0239
GIA11= GIA7	0.9441
GIB11= GIB7	0.5944
GIIA11= GIIA7	0.0366
GIIB11= GIIB7	<.0001

ANEXO F – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO-PADRÃO DO PP/PC NOS GRUPOS

Variável	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
PP/PC	GIA7	17	0.019	0.039	0.026	0.027	0.006
	GIB7	17	0.019	0.046	0.024	0.027	0.008
	GIIA7	21	0.014	0.027	0.019	0.019	0.004
	GIIB7	22	0.015	0.036	0.025	0.024	0.005
	GIA11	18	0.015	0.034	0.019	0.020	0.005
	GIB11	17	0.016	0.028	0.022	0.022	0.003
	GIIA11	24	0.013	0.025	0.019	0.019	0.003
	GIIB11	23	0.022	0.048	0.029	0.029	0.006

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS PP/PC

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7= GIB7	0.9191
GIIA7 = GIIB7	0.0014
GIA7 = GIIA7	<.0001
GIB7 = GIIB7	0.1603
GIA11 = GIB11	0.1977
GIIA11 = GIIB11	<.0001
GIA11 = GIIA11	0.4007
GIB11 = GIIB11	<.0001
GIA11 = GIA7	0.0002
GIB11 = GIB7	0.0199
GIIA11 = GIIA7	0.7431
GIIB11 = GIIB7	0.0029

ANEXO G – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO-PADRÃO DO VPT (ml) NOS GRUPOS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
VPT	GIA7	17	0.44	5.50	2.20	2.42	1.22
	GIB7	17	0.75	8.80	1.63	2.65	2.20
	GIIA7	21	0.88	3.08	1.32	1.53	0.54
	GIIB7	22	0.44	1.89	1.14	1.10	0.48
	GIA11	18	0.44	6.60	2.20	2.63	1.83
	GIB11	17	0.88	3.30	1.76	1.93	0.80
	GIIA11	24	0.44	3.90	1.08	1.54	1.05
	GIIB11	23	0.42	3.08	1.76	1.58	0.93

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS VPT

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7 = GIB7	0.7009
GIIA7 = GIIB7	0.0061
GIA7 = GIIA7	0.0060
GIB7 = GIIB7	0.0049
GIA11 = GIB11	0.1429
GIIA11= GIIB11	0.8784
GIA11= GIIA11	0.0254
GIB11= GIIB11	0.2066
GIA11 = GIA7	0.6912
GIB11 = GIB7	0.2054
GIIA11 = GIIA7	0.9811
GIIB11 = GIIB7	0.0287

ANEXO H – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO-PADRÃO DO VPE (ml/100g)

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
VPE	GIA7	17	2.46	15.35	7.68	7.77	3.57
	GIB7	17	2.31	22.98	4.70	7.30	5.80
	GIIA7	21	2.60	9.05	4.58	4.77	1.61
	GIIB7	22	1.30	7.12	3.11	3.43	1.48
	GIA11	18	1.01	14.19	5.89	6.36	3.59
	GIB11	17	1.91	7.72	4.06	4.67	1.74
	GIIA11	24	1.17	9.75	3.20	4.13	2.76
	GIIB11	23	1.16	9.96	4.46	4.40	2.66

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS VPE

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7 = GIB7	0.7761
GIIA7 = GIIB7	0.0049
GIA7 = GIIA7	0.0016
GIB7 = GIIB7	0.0080
GIA11 = GIB11	0.0758
GIIA11 = GIIB11	0.7385
GIB11= GIIB11	0.6955
GIA11= GIIA11	0.0298
GIA11 = GIA7	0.2465
GIB11= GIB7	0.0754
GIIA11 = GIIA7	0.3362
GIIB11 = GIIB7	0.1302

ANEXO I – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DO NÚMERO DE ALVÉOLOS

Variável	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
ALVEOLOS	GIA 7	17	7.71	20.93	11.67	12.43	3.07
	GIB 7	17	6.98	12.30	8.76	8.85	1.46
	GIIA 7	21	5.90	9.60	7.40	7.33	0.88
	GIIB 7	22	3.60	9.40	6.10	6.36	1.53
	GIA 11	18	8.35	17.21	10.92	11.45	2.34
	GIB 11	17	4.91	16.30	8.20	8.53	2.76
	GIIA 11	24	4.70	8,90	7,70	7,72	1.07
	GIIB 11	23	3.30	8.10	5.15	5.38	1.16

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS NÚMEROS DE ALVÉOLOS

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7=GIB7	<.0001
GIIA7=GIIB7	0.0042
GIA7=GIIA7	<.0001
GIB7=GIIB7	<.0001
GIA11=GIB11	0.0010
GIIA11=GIIB11	<.0001
GIA11=GIIA11	<.0001
GIB11=GIIB11	<.0001
GIA7=GIA11	0.3015
GIB7=GIB11	0.6718
GIIA7=GIIA11	0.4995
GIIB7=GIIB11	0.0540

ANEXO J – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DO ILM (μm) DOS GRUPOS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Ilm	GIA7	17	49.2	80.5	56.6	59.1	9.1
	GIB7	17	56.5	98.4	70.3	73.7	13.4
	GIIA7	21	43.8	86.8	60.5	60.3	10.5
	GIIB7	22	53.0	105.9	78.4	75.9	14.5
	GIA11	18	42.8	110.1	54.6	60.5	18.2
	GIB11	17	48.8	160.3	73.5	85.3	27.3
	GIIA11	24	42.6	65.5	52.7	52.7	6.5
	GIIB11	23	40.2	108.4	69.8	73.1	15.7

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS ILM DOS GRUPOS

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7 = GIB7	0.0003
GIIA7= GIIB7	0.0002
GIA7= GIIA7	0.7120
GIB7= GIIB7	0.6234
GIA11= GIB11	0.0021
GIIA11= GIIB11	<.0001
GIA11=GIIA11	0.0836
GIB11=GIIB11	0.1030
GIA11 = GIA7	0.7657
GIB11= GIB7	0.1188
GIIA11 = GIIA7	0.0076
GIIB11= GIIB7	0.5433

ANEXO K – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DA ASI (cm^2) DOS GRUPOS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
ASI	GIA7	17	1,5	8,8	3,66	4,2	2,2
	GIB7	17	1,1	18,3	2,10	4,2	4,3
	GIIA7	21	0,8	6,0	2,30	2,60	1,2
	GIIB7	22	0,5	3,4	1,70	1,70	0,7
	GIA11	18	1,3	6,2	3,0	3,2	1,4
	GIB11	17	1,4	7,2	2,8	3,1	1,4
	GIIA11	24	0,8	6,7	3,0	3,1	1,5
	GIIB11	23	0,8	6,1	2,1	2,4	1,5

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DAS ASI DOS GRUPOS

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7 = GIB7	0.9891
GIIA7= GIIB7	0.0071
GIA7= GIIA7	0.0081
GIB7= GIIB7	0.0192
GIA11=GIB11	0.6673
GIIA11=GIIB11	0.0933
GIA11= GIIA11	0.7496
GIB11= GIIB11	0.1284
GIA11= GIA7	0.1382
GIB11= GIB7	0.3119
GIIA11=GIIA7	0.2052
GIIB11= GIIB7	0.0398

ANEXO L – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DA ESPESSURA DOS SEPTOS INTERALVEOLARES (μm) DOS GRUPOS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
SEPTO	GIA7	17	6.50	16.70	9.05	9.62	2.48
	GIB7	17	5.98	24.76	12.45	12.59	4.68
	GIIA7	21	1.70	16.96	4.47	5.23	3.41
	GIIB7	22	3.96	28.29	9.31	12.48	7.01
	GIA11	18	3.32	8.21	5.78	5.82	1.28
	GIB11	17	6.11	26.85	14.39	14.65	5.79
	GIIA11	24	2.38	17.62	4.95	6.38	4.04
	GIIB11	23	5.25	34.62	12.30	14,737	8.19

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DA ESPESSURA DOS SEPTOS INTERALVEOLARES

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7=GIB7	0.0225
GIA7=GIIA7	0.0001
GIIA7=GIIB7	<.0001
GIB7=GIIB7	0.8702
GIA11=GIB11	<.0001
GIA11= GIIA11	0.4310
GIIA11=GIIB11	<.0001
GIB11= GIIB11	0.8507
GIA7= GIA11	<.0001
GIB7= GIB11	0.2551
GIIA7= GIIA11	0.2803
GIIB7= GIIB11	0.3718

ANEXO M – MÉDIAS, MEDIANAS E DP DOS DEPÓSITOS DE FIBRAS ELÁSTICAS

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
FIBRAS ELÁSTICAS	GIA7	17	0.219	0.725	0.455	0.481	0.121
	GIB7	17	0.221	0.936	0.373	0.411	0.190
	GIIA7	21	0.230	0.460	0.331	0.340	0.073
	GIIB7	22	0.101	0.450	0.274	0.275	0.118
	GIA11	18	0.309	0.984	0.408	0.507	0.188
	GIB11	17	0.177	1.010	0.369	0.397	0.200
	GIIA11	24	0.182	0.660	0.362	0.369	0.110
	GIIB11	23	0.190	1.200	0.339	0.400	0.229

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS DEPÓSITOS DE FIBRAS ELÁSTICAS

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7=GIB7	0.2066
GIIA7=GIIB7	0.0325
GIA7=GIIA7	<.0001
GIB7=GIIB7	0.0104
GIA11=GIB11	0.0960
GIIA11=GIIB11	0.5619
GIA11=GIIA11	0.0062
GIB11=GIIB11	0.9615
GIA11=GIA7	0.6233
GIB11=GIB7	0.8273
GIIA11=GIIA7	0.3003
GIIB11=GIIB7	0.0245

ANEXO N – MÉDIAS, MEDIANAS E DESVIO PADRÃO DOS DEPÓSITOS DE COLÁGENO

Variável	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
COLÁGENO	GIA7	17	0.071	0.891	0.198	0.296	0.222
	GIB7	17	0.046	0.551	0.164	0.198	0.133
	GIIA7	21	0.060	0.172	0.120	0.120	0.030
	GIIB7	22	0.034	0.173	0.088	0.095	0.036
	GIA11	18	0.131	0.688	0.383	0.393	0.186
	GIB11	17	0.068	0.413	0.167	0.184	0.085
	GIIA11	24	0.045	0.210	0.138	0.139	0.049
	GIIB11	23	0.024	0.187	0.089	0.089	0.040

ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DOS DEPÓSITOS DE COLÁGENO DOS GRUPOS

Label	Pr > F
Efeito de Grupo	<.0001
GIA7= GIB7	0.1218
GIIA7= GIIB7	0.0139
GIA7= GIIA7	0.0015
GIB7= GIIB7	0.0022
GIA11=GIB11	<.0001
GIIA11= GIIB11	0.0002
GIB11= GIIB11	<.0001
GIIA11= GIIA7	0.1205
GIA11= GIA7	0.1678
GIIB11= GIIB7	0.6109
GIB11= GIB7	0.7202

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Agresti A. *A categorical data analysis*. New York: John Wiley and Sons; 1990. p461

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

Alescio T, Cassini A. A induction in vitro of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J Exp Zool* 1962; 150: 83-94.

Anderson WR, Strickland MB, Tsai SH, Haglin JJ. Light microscopic and ultrastructural study of the adverse effects of oxygen therapy on the neonate lung. *Am J Pathol* 1973; 73: 327-48.

Aprille JR, Rulfs J. A convenient neonatal model for developmental studies requiring artificial diets. *Biol Neonate* 1976; 30: 109-15.

Baldwin RL, Sainz RD. Energy partitioning and modeling in animal nutrition. *Annu Rev Nut* 1995; 15: 191-211.

Barry BE, Crapo JD. Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% and 85% oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132 (3): 548-55.

Blanco LN, Massaro D, Massaro GD. Alveolar size, number and surface area: developmentally dependent response to 13% O₂. *Am J Physiol* 1991; 261: L370-7.

Bonikos DS, Bensch KG, Ludwin SK, Northway WH. Oxygen toxicity in the newborn: the effect of prolonged 100 per cent O₂ exposure on the lungs of newborn mice. *Lab Invest* 1975; 32: 619-35.

Bonikos DS, Bensch KG, Northway WH, Edwards DK. Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchitis and pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 1976; 7: 643-66.

Boyden EA, Tompsett DH. The changing patterns of the developing lungs of infants. *Acta Anat* 1965; 61:164- 92.

Brody JS, Vaccaro C. Postnatal formation of alveoli: interstitial events and physiologic consequences. *Federation Proc* 1979; 38: 215-23.

Bruce MC, Pawlowski R, Tomashefski JF. 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.

Bruce MC, Bruce EN, Janiga K, Chetty A. Hyperoxic exposure of developing rat lung decreases tropoelastin mRNA levels that rebound post exposure. *Am J Physiol* 1993; 265: L293-300.

Burri PH. The postnatal growth of the rat lung. III. Morphology. *Anat Rec* 1974;180: 77- 98.

Burri PH, Dbaly J, Weibel ER. The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. *Anat Rec* 1974; 178: 711-30.

Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In : MacDonald . *Lung biology in health and disease*. New York : Dekker; 1997. vol 100. p. 1-35.

Burri PH, Weibel ER. Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. Adaption of the growing rat lung hypoxia and hyperoxia. *Respir Physiol* 1971; 11: 247-64.

Cardoso WE. Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Dev Dyn* 2000; 219: 121-30.

Clark JM, Lambersten CJ. Pulmonary oxygen toxicity: a review. *Pharmacol Rev* 1971;23: 37-133.

Coalson JJ, Kuehl TJ, Escobedo MB, Hilliard JL, Smith F, Meredith K, Null DM, Walsh W, Johnson D, Robotham JL. A baboon model of bronchopulmonary dysplasia. II. pathologic features. *Exper and Mol Pathol* 1982; 37: 335-50.

Coalson JJ, Vicki TW, Siler Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely imature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1333-46.

Coalson JJ; Winter V; Gerstmann, DR; Idell S; King RJ, DeLemos RA. Pathophysiologic, morphometric, and biochemical studies of the premature baboon with bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 872-81.

Coates ME, Gregory ME, Thompson SY. The composition of rabbit's milk. *Brit J Nutr* 1964; 18: 583-6.

Cowie AT. Variations in the yield and composition of the milk during lactation in the rabbit and the galactopoietic effect of prolactin. *J Endocrinol* 1969; 44: 437-50.

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.

Crouch EC, Mecham RP, Davila RM, Noguchi A. A Collagens and elastic fiber protein in lung development. In : MacDonald J A, ed. *Lung biology in health and disease development of lung*. New York: Dekker. 1997. vol 100. p. 327-64.

Das RM. The effects of intermittent starvation on lung development in suckling rats. *Am J Pathol* 1984; 117: 326-32.

DeLemos RA, Coalson JJ. The contribution of experimental models to our understanding of the pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol* 1992; 19: 521-39.

Dolhnikoff M; Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin – induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160: 1750-7.

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

Erickson AM, De la Monte SM, Moore GW, Hutchins GM. The progression of morphologic changes in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Pathol* 1987; 127: 474-84.

Frank L, Groseclose E. Oxygen toxicity in newborn rats: the adverse effects of undernutrition. *J Appl Physiol* 1982; 55: 1248-55.

Frank Lee. Oxygen toxicity in neonatal rats: the effect of endotoxin treatment on survival during and post-O₂ exposure. *Pediatr Res* 1987; 21: 109-15.

Fukuda Y, Ishizaki M, Okada Y, Seiki m, Yamanaka N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase – 2 in fetal rabbit lung. *Am J Physiol* 2000; 279: L555-61.

Griffin M, Bhandari R, Hamilton G, Chan YC, Powell JT. Alveolar type II cel fibroblast interactions, synthesis and secretion of surfactant and type I collagen. *J Cell Sci* 1993; 105: 423-32.

Hallman M, Merrit TA, Pohjavuori M, Gluck L. Effects of surfactant substitution on lung effluent phospholipids in respiratory distress syndrome : evaluation of surfactant phospholipid turnover, pool size and the relationship to severity of respiratory failure. *Pediatr Res* 1986; 20 :1228-35.

Harrison GA. Ultrastructural changes in rat lung during long-term exposure to oxygen. *Exp Med Surg* 1971; 29: 96-107.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochem J* 1979; 11; 447-55.

Kalenga M, Eeckhout Y. Effects of protein deprivation from the neonatal period on lung collagen and elastin in the rat. *Pediatr Res* 1989; 26: 125 –7.

Kalenga M, Henquin JC. Protein deprivation the neonatal period impairs lung development in the rat. *Pediatr Res* 1987; 21: 45-9.

Kalenga M, Tschanz As, Burri Ph. Protein deficiency and the growing rat lung. I. Nutritional findings and related lung volumes. *Pediatr Res* 1995; 37: 783-88.

Kalenga M, Tschanz As, Burri Ph. Protein deficiency and the growing rat lung. II. Morphometric analysis and morphology. *Pediatr Res* 1995a; 37: 789-95.

Kapancy Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Baggiani G. "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: A possible regulator of ventilation/ perfusion ratio? *J Cell Biol* 1974; 60: 375-92.

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

Kauffman SL, Burri PH, Weibel ER. The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography. *Anat Rec* 1974; 180: 63-76.

Kerr JS, Riley DJ, Lanza- Jacoby S, Berg RA, Spilker HC, Yu SY, Edelman NH. Nutritional emphysema in the rat – influency of protein depletion and impaired lung growth. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 644-50.

Kikkawa Y, Kaibara M, Motoyama EK, Orzalesi MM, Cook CD. Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. *Amer J Path* 1971; 64: 423-2.

Kistler GS, Caldwell PRB, Weibel ER. Development of fine structural damage to alveolar and capillary lining cells in oxygen poisoned rat lungs. *J Cell Biol* 1967; 32: 605-28.

Loosli G, Potter EL. Pre- and postnatal development of the respiratory portion of the human lung. *Amer Rev Resp Dis* 1959; 80: 5-23.

Lorenzo AV. The preterm rabbit: a model for the study of acute and chronic effects of premature birth. *Pediatr Res* 1985; 19: 201-5.

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

Mascaretti RS, Mataloun MMGB, Dolhnikoff M, Rebello CM. A model of bronchopulmonary dysplasia in preterm rabbits. *Pediatr Res*, 2003; 53(4); 2464: 436 A

Massaro D, Massaro GD. Invited review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen" and others regulators. *Am J Physiol* 2002; 282: L345-58.

Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. Postnatal development of alveoli: Regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest* 1985; 76: 1297-305.

Massaro DJ, Massaro GD, Rodalva S, Cerch LB. Adult mice have endogenous programs for loss and regeneration of gas – exchange units. *FASEB J* 2001; 15: A164.

Massaro GD, Massaro D. Formation of pulmonary alveoli and gas – exchange surface area: quantitation and regulation. *Annu Rev Physiol* 1996; 59: 73-92.

McGinnis W., Kuziora M. The molecular architects of body design. *Sci AM* 1994; 270: 58-66.

McGinnis W, Kraumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 68: 283-302.

Mercer RR, Crapo JD. Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. *J Appl Physiol* 1990; 69(2): 756-65.

Mercer RR, Russell ML, Crapo JD. Alveolar septal structure in different species. *J Appl Physiol* 1994; 77(3): 1060-6.

Nogawa H, Ito T. Branching morphogenesis of embryonic mouse lung epithelium in mesenchyme – tree culture. *Development* 1995; 121: 1015-22.

Noguchi A, Firsching K, Kursar JD, Reddy R. Developmental changes in tropoelastin gene expression in the rat lung studied by in situ hybridization. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991; (5) : 571-8.

Pappas CTE, Obara H, Bensch KG, Northway WH. Effect of prolonged exposure to 80% oxygen on the lung of the newborn mouse. *Lab Invest* 1983; 48: 735-48.

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; L452-60.

Randell SH, Mercer RR, Young SL. Postnatal growth of pulmonary acini and alveoli in normal and oxygen – exposed rats studied by serial reconstructions. *Am J Anat* 1989; 186: 55-68.

Randell SH, Mercer RR, Young SL Neonatal hyperoxia alters the pulmonary alveolar and capillary structure of 40 day old rats. *Am J Pathol* 1990; 136: 1258-66.

Rosner BB. *Fundamentals of Biostatistics*. 2.nd Ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986. p. 442-80.

Sahebajami H, MacGee J. Changes in connective tissue composition of the lung in starvation and refeeding. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 644-7.

Sahebajami H, Vassalo CL. Effects of starvation and refeeding on lung mechanics and morphometry. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 443-51.

Sch, JD ; Prentice RL. *The statistical analysis of failure time data*. New York: John Wiley and Sons; 1980.

Scherle, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative Stereology. *Mikroskopie* 1970; S.57-60.

Seidner SR, Ikegami M, Yamada T, Rider ED, Castro R, Jobe AH. Decreased surfactant dose – response after delayed administration to preterm rabbits. *Am J Respir & Crit Care Medicine* 1995, 152(1):113-20.

Sobonya Re, Loguinoff MM, Taussig LM, Thenault . Morphometric analysis of the lung in prolonged bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1982; 16: 969-72.

Sogorb F, Damy SB, Rodrigues UP, Chaguri ICAG. Variação na composição do leite de coelha *Mem Inst Butantan* 1991; 53(2): 175-80.

Sosenko IRS, Frank Lee. Nutritional influences on lung development and protection against chronic lung disease. *Semin Perinat* 1991; 15:462-8.

Spooner BS, Wessells NK. Mammalian lung development: interactions in primordium formation and bronchial morphogenesis. *J Exp Zool* 1970; 175: 445-54.

Starcher BC. Elastin and the lung. *Thorax* 1986; 41: 577-85.

Stocker JT. Pathologic Features of Long Standing "healed" bronchopulmonary dysplasia: A study of 283 – to 40- month old infants. *Human Pathol* 1986; 17: 943-61.

Tanswell AK, Wong L, Possmayer F, Freeman BA. The preterm rat: a model for studies of acute and chronic neonatal lung disease. *Pediatr Res* 1989; 25: 525-9.

Thibeault D, Mabry SM, Ekekezie I, Zhang X, Truog WE. Collagen scaffolding during development and its deformation with chronic lung disease. *Pediatrics* 2003; 111: 766-76.

Thibeault DW, Mabry SM, Ikechukwu IE, Truog WE. Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics* 2000; 106: 1452-9.

Thurlbeck WM. The internal surface area of nonemphysematous lungs. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95: 765-3.

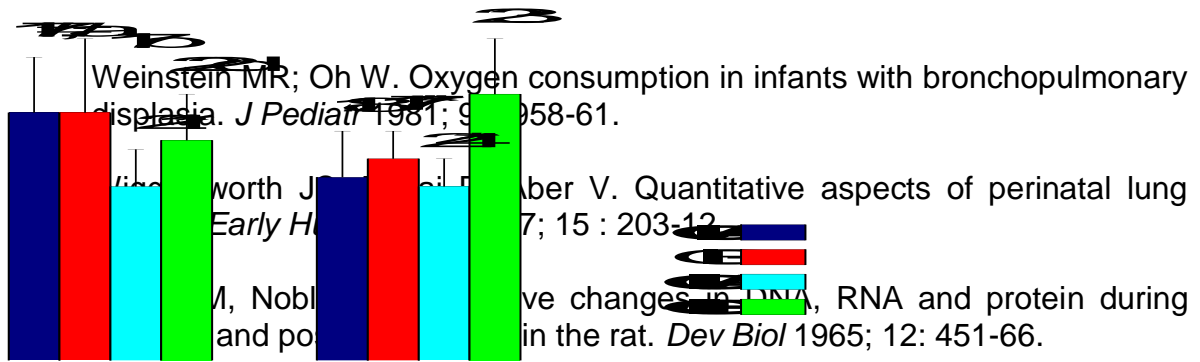
Timm NH. *Multivariate analysis with applications in education and psychology*. Belmont: Wadsworth Publishing Company; 1975. p. 444-71.

Tinker D, Rucker RB. Role of selected nutrients in synthesis, accumulation, and chemical modification of connective tissue proteins. *Physiol Reviews*, 1985, 65 (3): 607-57.

Vidie B, Burri PH. Quantitative cellular and subcellular changes in the rat type II pneumocyte during early postnatal development. *Am Rev Respir Dis* 1981;124: 174-8.

Warburton D, Zhao J, Berberich MA, Bernfield M. Molecular embryology of the lung : then, now, and in the future. *Am J Physiol* 1999; 276: L697-704.

Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: L110- 7.



Zarrow MX, Denenberg VH, Anderson CO. Rabbit: Frequency of suckling in the pup. *Science, NY* 1965: 1835-936.

Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol* 1987; 67: 269-82.

Zeltner TB, Caduff JH, Gehr P, Pfenninger J and Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphometry. *Respir Physiol* 1987; 67: 247-67.