Magno Santos Leite

Alterações estruturais de corpos carotídeos de ratos expostos à
hiperoxigenação hiperbárica

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento
Saldiva

São Paulo
2006

**A Deus e todos os seus mensageiros
de luz que me guiaram ao longo de
toda essa jornada.**

**À memória de meu pai Carlos,
por todos os ensinamentos,
acima de tudo a perseverança.**

**A minha mãe Laiz, meu filho
Chilan e minha esposa Cris,
verdadeiros anjos a guiar o
meu caminho.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido realizado se não houvesse a participação de todos aqui mencionados. Agradecemos, verdadeiramente,

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela confiança depositada no trabalho a ser executado, na idéia a ser desenvolvida, nos ensinamentos profissionais e pessoais. Nunca, em momento algum, deixou de mostrar seu interesse no projeto. Mesmo nos momentos difíceis, manteve sempre a serenidade.

A Prof. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini, pelo auxílio e presteza em todos os momentos, colocando-se sempre à disposição e todo seu conhecimento no que fosse necessário para a concretização desta obra.

A Dra. Cláudia Naves Battlehner, pelo auxílio no estudo da estereologia.

A Dra Elnara Márcia Negri, pelo auxílio no estudo da patologia pulmonar.

A bióloga Nilsa Regina Damaceno Rodrigues, por todo o trabalho de execução da pesquisa, sem a qual, sem dúvida, esse trabalho não teria sido realizado.

A Heloisa, Dolores, Ana Júlia, Eliane Tigre, Rogério, Débora, Regiani, Macchione, Eliane, Ana Lúcia, Márcia, Dalva, Nildo, D. Emília e todos do Laboratório de Poluição Atmosférica, sempre prontos a ajudar no que fosse necessário para a realização deste trabalho.

A Mariana, Íris, Marcelo, Gisele, Aline, Juliana, Cristina, Valéria, Gildásio e todos do Laboratório de Biologia Celular, por participarem e ajudarem na obtenção dos resultados de microscopia óptica.

A Miriam, Maria Margarida (Margot), Cecília, Maria do Rosário, Hélio, Adão e todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por participarem e ajudarem na obtenção dos resultados de microscopia eletrônica.

A Fernanda Arantes, Fernanda Lopes, Beatriz, Francine, Rodolfo e todos do Laboratório de Terapêutica Experimental, também sempre prontos a ajudar no que fosse necessário para a realização deste trabalho.

A Ady, Cássia e Keila e todas suas colegas do Laboratório de Histopatologia, pela preparação das lâminas dos estudos iniciais com corpos carotídeos de ratos.

A Liduvina e todos da secretaria do Departamento de Patologia, pela ajuda inestimável em tudo que esteve ao seu alcance a fim de que este trabalho pudesse ser executado com êxito.

Ao Davi e ao Carlos do biotério, pelo auxílio constante na obtenção dos ratos.

A Valéria, Rogéria, Antonio, Milton, Arlane, Marinalva, Maria Céu, Francis e à memória da Carmelita, além de todos da biblioteca que de alguma forma sempre se colocaram à disposição para ajudar no que fosse preciso.

Ao Chagas, Siqueira, Luiz Carlos (General), Ferreira, Eugênio e todos do setor de vigilância por todos serviços prestados.

A todas as funcionárias da limpeza da Faculdade, sobretudo aquelas responsáveis pela limpeza do Laboratório de Poluição Atmosférica, também por todos os serviços prestados.

Ao Srs. Antônio Militão, Mazzeo, Rui e Alfredo Vidal, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, pela parceria no desenvolvimento do projeto da câmara hiperbárica.

Ao Sr. Patrick, da empresa Atlas, pelo aluguel da câmara hiperbárica experimental, sem o qual este trabalho não poderia ter sido finalizado dentro do prazo.

A Vânia, Amélia, Sueli, Cleuza, Vanderli, Tereza, Sr. Sebastião, Selma, Soninha Luana e todos funcionários que trabalharam no Posto de Saúde do Irohy, em Biritiba Mirim, nesses três anos por compreenderem os momentos mais difíceis.

A todos os meus pacientes, pela paciência que tiveram com os meus horários.

A Carolina, pela tolerância e compreensão que dispensou ao longo de todos esses anos.

A minha irmã Taís, meu cunhado Augusto e meus sobrinhos Rodrigo, Talita e Felipe, pelo apoio e incentivo constantes, mesmo naqueles momentos em que as dificuldades pareciam ser intransponíveis.

CONTEÚDO

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O QUE É HIPEROXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA?.....	1
1.2	CONTROLE QUÍMICO DA RESPIRAÇÃO EM REPOUSO.....	3
1.2.1	O papel do CO ₂	3
1.2.2	O papel do O ₂	9
1.3	OS QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS.....	10
1.4	OS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS.....	12
1.4.1	Histologia normal.....	12
1.4.2	Ultraestrutura.....	14
1.4.3	Descarga quimiorreceptora de repouso.....	16
1.5	ESTÍMULOS SENSÍVEIS AOS CORPOS CAROTÍDEOS.....	17
1.5.1	Atuação do CO ₂ sobre os quimiorreceptores carotídeos.....	17
1.5.2	Atuação do O ₂ sobre os quimiorreceptores carotídeos.....	18
1.5.3	A influência da hipóxia isquêmica.....	22
1.5.4	Pressão parcial tissular de O ₂ no corpo carotídeo em repouso.....	23
1.5.5	Consumo de O ₂ dos corpos carotídeos.....	24
1.5.6	A interação entre o O ₂ e o CO ₂	26
1.5.7	Outros fatores que influenciam a atividade quimiorreceptora carotídea.....	29
1.6	O PAPEL DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS.....	31
1.7	EFEITOS FISIOLÓGICOS DA INALAÇÃO DE O ₂ SOBRE A RESPIRAÇÃO.....	33
1.7.1	Diferenças entre efeitos fisiológicos e efeitos patológicos.....	35
1.8	A INTOXICAÇÃO PELO OXIGÊNIO.....	36

1.8.1	Histórico.....	38
1.8.2	Fatores que influenciam a toxicidade do oxigênio.....	39
1.8.3	A suscetibilidade individual.....	41
1.8.4	A intoxicação do SNC e seus efeitos sobre o pulmão.....	47
1.8.5	Efeitos do excesso de O ₂ sobre a resposta ventilatória carotídea.....	52
2.	OBJETIVOS.....	56
3.	MATERIAL E METODOS.....	57
3.1	ANIMAIS.....	57
3.2	PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO.....	57
3.3	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS.....	58
3.3.1	Microscopia óptica.....	59
3.3.2	Microscopia eletrônica.....	60
3.4	PROCEDIMENTOS MORFOMÉTRICOS.....	60
3.4.1	Cálculo do volume dos corpos carotídeos.....	61
3.4.2	Cálculo das densidades numérica e volumétrica.....	62
3.4.3	Cálculo da relação entre as áreas luminal e da parede das arteríolas (relação L/W).....	63
3.5	ANALISE ESTATÍSTICA.....	64
4.	RESULTADOS.....	66
4.1	ANÁLISE QUALITATIVA.....	66
4.1.1	Pulmões.....	66
4.1.2	Corpo carotídeo.....	66
4.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	69
4.2.1	Volume dos corpos carotídeos.....	69
4.2.2	Densidade volumétrica dos capilares e do estroma intersticial.....	69
4.2.3	Avaliação do grau de vasoconstrição arteriolar – relação Luz-Parede	

(L/W).....	70
4.2.4 Avaliação das proporções celulares.....	71
5. DISCUSSÃO.....	74
5.1 EFEITOS TÓXICOS DO OXIGÊNIO SOBRE A HISTOLOGIA PULMONAR..	74
5.2 EFEITO DA HIPERÓXIA SOBRE A CIRCULAÇÃO GLÔMICA CAROTÍDEA.....	80
5.3 EFEITOS TÓXICOS DA HIPERÓXIA SOBRE A ESTRUTURA DOS CORPOS CAROTÍDEOS.....	97
5.4 FALÊNCIA RESPIRATÓRIA TERMINAL.....	101
6. CONCLUSÕES.....	103
7. ILUSTRAÇÕES.....	104
7.1 TABELAS	
7.2 FIGURAS	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

OHB – oxigenoterapia hiperbárica

O₂ – gás oxigênio

CO₂ – gás carbônico ou dióxido de carbono

PO₂ – pressão parcial de O₂

PCO₂ – pressão parcial de CO₂

PaO₂ – pressão parcial de O₂ no sangue arterial

PvO₂ - pressão parcial de O₂ no sangue venoso

PaCO₂ – pressão parcial de CO₂ no sangue arterial

PvCO₂ - pressão parcial de CO₂ no sangue venoso

PAO₂ – pressão parcial de O₂ no ar alveolar

PACO₂ – pressão parcial de CO₂ no ar alveolar

[H⁺] – concentração de íons hidrogênio (ou concentração de prótons)

[HCO₃⁻] – concentração de bicarbonato

APUD – abreviação de “amine-precursor uptake and decarboxilation”

CC – corpo (ou corpúsculo) carotídeo

CA – corpo (ou corpúsculo) aórtico

PA – pressão arterial

RVS – resistência vascular sistêmica periférica

SNC – sistema nervoso central

SNA – sistema nervoso autônomo

SNS – sistema nervoso autônomo simpático

SNP – sistema nervoso autônomo parassimpático

LCR – líquido cefalorraquidiano

FSC – fluxo sanguíneo cerebral

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

NSC – nervo do seio carotídeo

NGG – nervo ganglioglomerular

Hb (ou Hb⁻) – hemoglobina

HbO₂ – oxiemoglobina

HHb – hemoglobina reduzida

HbCO₂⁻ – carbamino-hemoglobina

HbCO – carboxiemoglobina

V_E – volume-minuto respiratório expirado (ou volume-minuto)

CV – capacidade vital

EROS – espécies reativas do oxigênio (ou radicais ativados do oxigênio)

GABA – ácido gama-aminobutírico

RVH – resposta ventilatória à hipóxia

PIV – peptídeo intestinal vasoativo

ON – óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

RESUMO

Leite MS. Alterações estruturais de corpos carotídeos de ratos expostos à hiperoxigenação hiperbárica. Tese (Doutorado). São Paulo. Faculdade de Medicina. 2006; 138p.

Procurou-se confirmar a existência de alterações estruturais em corpos carotídeos de ratos expostos à hiperóxia que pudessem explicar a atenuação da resposta fisiológica à hipóxia nessas condições descrita na literatura. Também testamos a hipótese de haver um desvio de fluxo sanguíneo para os capilares intraglômicos em situações de hiperoxigenação hiperbárica. 15 ratos machos Wistar adultos foram divididos em 3 grupos e expostos a 2,4 ATA por 6 horas, a 3,0 ATA por 6 horas e a ar ambiente (grupo controle). Os resultados obtidos através de análise histológica e morfométrica mostraram: a) nenhuma alteração da arquitetura dos corpos carotídeos, mas as células expostas à dose mais elevada apresentaram-se com citoplasma desarranjado, confirmado pela microscopia eletrônica; b) um aumento significativo da densidade volumétrica de capilares preenchidos por hemácias, mas não do estroma intersticial, no grupo exposto à dose mais elevada de O_2 ; c) uma vasoconstrição significativa das arteríolas maiores em todas as doses de oxigênio empregadas no estudo e das arteríolas menores na dose mais elevada de O_2 ; d) variações significativas na proporção das variantes de células glômicas no grupo exposto a menor dose de O_2 ; e) mitocôndrias com poucas cristas, tanto nas células glômicas quanto nas terminações nervosas, embora nas primeiras apresentem-se bem deformadas; f) proliferação membranosa citoplasmática com aumento de REG e Golgi nas células glômicas e sustentaculares. Esses resultados sugerem um desvio do fluxo dos vasos mais calibrosos em direção aos capilares intraglômicos, confirmando nossa hipótese inicial e indicam que o oxigênio, dependendo da dose utilizada, exerce um efeito tóxico importante sobre os corpos carotídeos, com alterações significativas da ultraestrutura das células glômicas e terminações nervosas.

SUMMARY

Leite MS. Structural alterations of rat carotid body exposed to hyperbaric oxygenation. Tese (Doutorado). São Paulo. Faculdade de Medicina. 2006; 138p.

We sought to confirm the existence of structural alterations in rat carotid bodies exposed to hyperoxia that could explain the attenuation of the ventilatory hypoxic drive (HD) by hyperoxic conditions described in the literature. We also tested the hypothesis of there being a deviation of blood flow toward intraglomerular capillaries in situations of hyperbaric oxygenation (HBO). 15 adult male Wistar rats were divided in 3 groups and exposed to O₂ at 2.4 ATA for 6 hours, at 3.0 ATA for 6 hours and to air at 1.0 ATA (control group). The results obtained through histological and morphometric analysis showed: a) no alteration in the architecture of the carotid bodies, but the cytoplasm of the cells exposed to the highest dose were disarranged, a feature confirmed by electron microscopy; b) a significant increase in volume density of capillaries filled out by red blood cells but not of interstitial stroma in the group exposed to O₂ at the highest dose; c) a significant vasoconstriction of larger arterioles in all doses of oxygen employed in the study and of smaller arterioles at the highest dose of O₂; d) significant variations in the proportion of glomerular cell variants in the group exposed to the lowest dose of O₂; e) mitochondria with few cristae, so in glomerular cells as in nerve-endings, although in the former they were very deformed; f) cytoplasmic membranous proliferation with an increase of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in glomerular and sustentacular cells. These results suggest a deviation of blood flow from more calibrated vessel toward intraglomerular capillaries, confirming our initial hypothesis and indicate that oxygen, depending on the dose used, exerts an important toxic effect on rat carotid body with significant alterations of glomerular cell and nerve-endings ultrastructure.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O QUE É HIPEROXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA?

A hiperoxigenação hiperbárica consiste na inalação de oxigênio (O_2) puro a pressões ambientais acima da pressão atmosférica normal, com o intuito de se respirar grandes quantidades de oxigênio a pressões parciais maiores que uma atmosfera, como se buscasse aumentar a concentração de O_2 acima de 100% ao nível do mar, o que só é possível com o aumento da pressão ambiente, mantendo-se o volume e a temperatura do mesmo constante. Portanto, há a necessidade de um ambiente confinado e rígido para que tais alterações ambientais ocorram, de onde surgiram as câmaras hiperbáricas, vasos de pressão construídos especificamente para esta finalidade, seja para tratamento ou para pesquisa científica. Quando utilizada com fins terapêuticos a hiperoxigenação hiperbárica recebe outra denominação, mais conhecida como oxigenoterapia hiperbárica (OHB) (Iazzetti, 1998).

A utilização da OHB como método terapêutico baseia-se no fato de que a quantidade de dissolução de um gás em um líquido (sangue, por exemplo) é proporcional à pressão exercida por esse gás (Lei de Henry), tanto maior a uma dada pressão quanto maior for a concentração desse gás. Dessa forma, a inalação de oxigênio puro a 100% a pressões duas a três vezes maior que a pressão atmosférica, ou seja, 2 a 3 atmosferas absolutas (ATA), pode resultar em tensões arteriais de oxigênio acima de 2000mmHg, cujo aumento acima de 100mmHg ocorre, sobretudo, na fração de O_2 dissolvida no sangue, não ligado à hemoglobina, a qual permanece 100% saturada (Basset e Bennett, 1977). Com isso são atingidas tensões tissulares maiores que 400mmHg, o que pode resultar em inúmeros efeitos bioquímicos, celulares e fisiológicos, benéficos em várias situações patológicas (Tibbles e Edelsberg, 1996; Iazzetti, 1992).

Os mecanismos básicos de ação terapêutica da OHB residem na substituição, pela fração dissolvida, do transporte de oxigênio através da hemoglobina, seja em situações de queda abrupta da concentração da mesma (anemia pós-choque hemorrágico com dificuldade de transfusão) (Tibbles e Edelsberg, op. cit.), seja em situações de sua inabilidade funcional (intoxicações por monóxido de carbono, cianeto e outras metaemoglobinemias) (Tibbles e Edelsberg, op. cit.; Oriani et al, 1996). Na

restauração da difusão do O₂ dos capilares às células, compensando a hipóxia celular, em situações em que há diminuição da perfusão tecidual (isquemia aguda ou crônica, principalmente lesões refratárias) ou um aumento da distância de difusão (edemas, secreção purulenta etc) (Tibbles e Edelsberg, 1996; Oriani et al, 1996; Iazzetti, 1998). Vale ressaltar que para tecidos com um consumo de oxigênio em torno de 6ml/100mg/min, a distância de difusão em ar ambiente é cerca de 60 µm ao passo que a 3 ATA chega a mais de 240µm, devido ao maior gradiente de difusão tecidual (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998). Também reside na ação bactericida direta contra bactérias anaeróbias estritas (*Clostridium perfringens*) (Hill e Osterhout, 1972) e bacteriostática para bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa* (Brown, 1972; Boehm et al., 1976), bem como no efeito sinérgico com alguns antibióticos (sulfonamidas, aminoglicosídeos, cefalosporinas entre outros), além de devolver o poder bactericida de células fagocitárias hipóxicas (Kindall e Goldmann, 1970; Mader, 1988). Ou ainda no efeito mecânico direto da pressão, no caso de embolias gasosas e doença descompressiva, pela diminuição do tamanho da bolha e restabelecimento da circulação, corrigindo a hipóxia tecidual. Por fim, seu efeito fisiológico vasoconstritor (chega a uma redução de 25% do fluxo cerebral e 33% do fluxo renal a 2 ATA) constitui-se numa ação anti-edematogênica importante em casos de síndrome compartimental, no edema cerebral e queimaduras térmicas (Pierce e Jackson, 1977; Tibbles e Edelsberg, op. cit.). As indicações estabelecidas para o uso clínico da OHB no país constam na Resolução 1457/95 do Conselho Federal de Medicina (1995).

Aqui no Brasil, o Prof. Ozorio de Almeida (1935, 1938) foi o pioneiro da atividade e com uma câmara hiperbárica instalada no então hospital Gaffré-Guinle, no Rio de Janeiro, publicou trabalhos sobre o uso da OHB em algumas patologias como câncer e lepra lepromatosa. No entanto, o primeiro serviço universitário só foi criado em 1986, no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, sob a coordenação do Dr. Paulo Eduardo Iazzetti, ficando esta lacuna preenchida por atividades praticamente restritas à Marinha Brasileira, no hospital da Base Almirante Castro e Silva, na ilha de Mocanguê, no Rio de Janeiro (Iazzetti, 1992). Atualmente existem várias unidades hiperbáricas espalhadas pelo país, mas concentradas principalmente no eixo Rio-São Paulo.

Apesar das inúmeras aplicações terapêuticas da oxigenoterapia hiperbárica, ela não é isenta de riscos, pois o oxigênio, indispensável à manutenção dos processos aeróbicos celulares, torna-se tóxico se administrado em concentrações acima do ar

atmosférico ao nível do mar (0,21 ATA), ou seja, em situações de hiperóxia. Foi observado que a 0,33 ATA, uma exposição prolongada de 30 dias causa hemólise em animais e intolerância à glicose no homem (Larkin et al. 1972, Love et al., 1971). Na realidade, todas as células, tecidos e órgãos expostos à hiperóxia teoricamente são atingidos, mas na faixa de pressão e tempo de exposição normalmente utilizados, que constituem a dose de oxigênio ofertada, os órgãos mais atingidos são os pulmões e o SNC (Clark e Lambertsen, 1971a). Mais recentemente, descobriu-se que os corpos carotídeos também não estão imunes aos efeitos tóxicos do oxigênio (Lahiri et al., 1987; Arieli et al., 1988; Liberzon et al., 1989; Torbati et al., 1989; Mokashi e Lahiri, 1991).

Antes, porém, de proceder ao estudo mais detalhado da toxicidade do oxigênio e seus reflexos sobre os corpos carotídeos, serão revisados alguns temas relacionados ao controle químico da respiração, do funcionamento dos corpos carotídeos em condições normais de repouso, bem como seu papel no controle ventilatório, tendo em vista a grande complexidade do assunto, na tentativa de facilitar a compreensão das possíveis implicações fisiopatológicas decorrentes das alterações estruturais desses diminutos órgãos encontradas neste trabalho.

1.2 CONTROLE QUÍMICO DA RESPIRAÇÃO EM REPOUSO

1.2.1 O papel do CO₂

Tendo em vista a influência do estado metabólico tecidual sobre a respiração e que alterações no nível metabólico tecidual se acompanham de alterações locais do equilíbrio ácido-básico e da oxigenação, é de se esperar que o controle químico da respiração em repouso seja realizado pelos fatores envolvidos nesse processo, quais sejam o CO₂, o H⁺, o bicarbonato (HCO₃⁻) e o O₂ (Lambertsen, 1978d). Comparativamente, uma hiperventilação voluntária pode elevar a ventilação a 166 Litros/min em indivíduos adultos jovens, enquanto que o exercício aumenta em média a 100 Litros/min (Dripps e Comroe, 1947). Já a inalação a 30% de CO₂, medida em 4 pacientes psiconeuróticos de meia-idade, chega a 90 Litros/min, ao passo que a hipóxia severa (4,2% de O₂ em N₂) eleva a ventilação a 30 Litros/min (Lambertsen, 1978d). Por estes dados, percebe-se que o estímulo mais intenso à ventilação em repouso é ocasionado pelo aumento da PCO₂ no ar inspirado (Lambertsen, 1978d). Em vista disso,

durante muito tempo, a própria molécula de CO_2 foi considerada como o agente estimulante dos centros respiratórios. Entretanto, nunca se demonstrou que uma mudança da PCO_2 altere a respiração sem que haja uma alteração correspondente da concentração de H^+ (Lambertsen et al., 1961).

Atualmente se acredita que o mecanismo final de excitação dos neurônios quimiossensíveis, localizados numa região bilateral a uma fração de milímetro da superfície ventral do bulbo, no tronco cerebral, tem como agente estimulante o H^+ , oriundo do CO_2 presente no líquido extracelular que banha esses neurônios, o qual, ao reagir com a água, aumenta a concentração de H^+ do meio (West, 1991). Ou então, proveniente diretamente do sangue arterial, uma vez que a molécula de CO_2 circulante no sangue arterial, altamente difusível, atravessa sem dificuldade a barreira hematoencefálica e alcança rapidamente a região quimiossensível do centro respiratório, de maneira que alterações da PCO_2 arterial são facilmente detectadas (West, op. cit.). Entretanto, ao nível dos quimiorreceptores periféricos, sobretudo carotídeos, ainda não há definição quanto ao possível papel estimulante da molécula de CO_2 , (Fidone e Gonzalez, 1986), mas certamente, variações do pH intracelular devem estar envolvidas, já que foi confirmada a presença da enzima anidrase carbônica no interior das células glômicas (Ridderstrale e Hanson, 1984). Talvez seja esse um dos motivos que levou a natureza a escolher o CO_2 como principal modulador do controle ventilatório, pois toda alteração na sua pressão parcial reflete-se diretamente numa alteração da concentração de H^+ em qualquer compartimento, intra ou extracelular, o qual parece ser a molécula realmente responsável pela geração do estímulo, ao menos a nível central (West, op. cit.). No entanto, tal fato de nada adiantaria se a molécula de CO_2 não fosse altamente solúvel em líquidos, tendo por conta disso um elevado coeficiente de difusão tecidual, 20 vezes maior que o O_2 , penetrando assim facilmente todas as barreiras e membranas (Lambertsen, 1978b). Além disso, apesar de influenciar diretamente o pH, o CO_2 é tamponado por todos os fluidos corporais, o que permite um amortecimento do efeito de suas variações (Lambertsen, 1978b).

Durante muito tempo se admitiu que os efeitos da queda do pH seriam mediados pelos quimiorreceptores periféricos, desde os clássicos trabalhos de Eyzaguirre e Lewin (1961) e Hornbein e Roos (1963) que demonstraram que a acidose metabólica estimula os aferentes quimiorreceptores carotídeos, ao passo que a alcalose os inibe. Isso porque teoricamente partículas carregadas teriam dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica, cuja penetração do bicarbonato parece ter uma meia-vida de 24hs

(Severinghaus et al., 1963). Entretanto, Estudos realizados em gatos, a partir de registros diretos da atividade elétrica quimiorreceptora carotídea e da ventilação com PCO_2 constante, demonstraram que o efeito estimulatório da respiração provocado pela queda do pH arterial não poderia ser conseqüente apenas da estimulação periférica, podendo ser atribuído à estimulação de mecanismos centrais (Lahiri e DeLaney, 1975b). Estes experimentos mostraram a necessidade de se haver alguma região de controle ventilatório no SNC que fosse “desprovida” de barreira, permitindo que a molécula de H^+ presente no sangue arterial atingisse tal região e a estimulasse diretamente, considerando a baixa permeabilidade da barreira hematoencefálica a moléculas eletricamente carregadas (Robin e Bromberg, 1959; Leusen, 1972). Estudos realizados em cães mostraram que o início e a velocidade de desenvolvimento da resposta respiratória a uma alteração da $[\text{H}^+]$, mantendo-se a PCO_2 arterial constante, são tão rápidos quanto os efeitos dependentes da queda da PaCO_2 , com manutenção do pH arterial, indicando a existência de alguma região sensível diretamente ao H^+ , provavelmente “desprovido” de barreira (Domizi et al., 1959). Lambertsen et al. (1961) verificaram em indivíduos normais expostos à variações de pH, mantendo-se constante a PaCO_2 e a PCO_2 central, que a respiração é fortemente influenciada pela queda do pH, mesmo na ausência de elevações de PCO_2 no sangue ou no cérebro, cerca de 10 vezes mais que em pacientes com acidose diabética. No caso dos pacientes diabéticos, há um acúmulo de ácidos fixos no organismo, ao mesmo tempo em que se observa uma estimulação respiratória discreta, porém regular, que aumenta com o agravamento da acidemia. Paralelamente são encontradas tensões arteriais e alveolares de CO_2 muito baixas, as quais, provavelmente, são a causa da elevação respiratória discreta, pois de outro modo a ventilação estaria grandemente aumentada. No entanto, apesar da baixa PaCO_2 que deveria cursar com inibição ventilatória, o resultado final é o oposto (Lambertsen et al., 1961). Atualmente se sabe ser decorrente da estimulação direta da região central bulbar quimiossensível (West, 1991).

Em relação à participação quimiorreflexa periférica, vários trabalhos, tanto no homem quanto em animais, demonstraram que ela deve ser pequena. Esses trabalhos foram baseados em estimativas obtidas por alteração súbita da tensão inspirada de O_2 conhecidas como teste de O_2 de Dejours (Dejours, 1962; Downes e Lambertsen, 1966). Nesse teste o indivíduo realiza três respirações consecutivas em O_2 puro e se observa a queda da ventilação. Para Déjours, esse procedimento evitaria o estímulo ventilatório paradoxal da hiperóxia, discutido adiante. O objetivo foi avaliar o efeito inibitório da

administração de 100% de O_2 sobre a resposta ventilatória, com uma PaO_2 igual a 600mmHg e mantendo-se constante a PCO_2 alveolar (Downes e Lambertsen, 1966) ou permitindo que ela variasse naturalmente (Dejours, 1962). Neles, os autores observaram uma contribuição realmente pequena dos quimiorreceptores periféricos no controle da ventilação, em torno de 10 a 14%.

Para outros autores, a contribuição quimiorreflexa periférica seria maior, em torno de 30% (Lugliani et al., 1971) ou até 75% (Lambertsen, 1978d). Entretanto, pesquisas realizadas com animais anestesiados podem superestimar a contribuição reflexa periférica, pelo fato dos agentes anestésicos em geral deprimirem muito mais os quimiorreceptores centrais. Por conta disso, valores de 40% de contribuição obtidos em gatos nessas condições não devem refletir a realidade (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Estudos baseados na desnervação carotídea apontam para uma contribuição ao redor de 20%. Ocorre que esse procedimento leva a hipoventilação, com aumento da $PaCO_2$ e queda da PaO_2 , a qual, pelo efeito depressor central também deve interferir nos resultados (Fitzgerald e Lahiri, op. cit.). Vale ressaltar que variações interespecíficas devem contribuir sobremaneira com a variabilidade dos resultados (Fitzgerald e Lahiri, op. cit.). O fato é que a real contribuição dos quimiorreceptores periféricos no controle da ventilação ainda é motivo de controvérsia.

Estudos realizados no homem sobre o efeito de altas concentrações de CO_2 no ar inspirado evidenciaram intensa e progressiva estimulação respiratória com concentrações entre 10 e 15% (Dripps e Comroe, 1947), mas após este ponto, a inclinação da curva tende a diminuir de maneira que aumentos adicionais da pressão parcial (P_p) de CO_2 ocasionam aumentos relativamente pequenos na ventilação, atingindo, ainda assim, valores elevados ao redor de 90 Litros/min em pacientes psiquiátricos (Lambertsen, 1978d). Fica evidente que elevações na tensão arterial de CO_2 induz uma estimulação ventilatória muito maior que a queda na tensão arterial O_2 , conforme já mencionado. Entretanto, a inalação de altas doses de CO_2 é comprovadamente tóxica e acima de 7% no ar inspirado induz uma respiração progressivamente mais rápida e vigorosa, seguida de dispnéia, irritabilidade, cefaléia intensa, rebaixamento do nível de consciência e tendência ao desmaio (Hyacinthe, 1992). Total inconsciência ocorre com 15% de CO_2 , associada à rigidez muscular e tremores e com concentrações entre 20 e 30% há o aparecimento de convulsões generalizadas (Lambertsen, 1971; Hyacinthe, 1992). Quando da inalação de 30% de CO_2 há súbita elevação da PCO_2 alveolar ($PACO_2$). Em pouco mais de 1 min a PCO_2 alveolar atinge 200mmHg e o volume-minuto respiratório acima de

90 Litros/min, o qual é intempestivamente interrompido pelo início abrupto da crise convulsiva, interrompendo a elevação da taxa ventilatória, a qual declina rapidamente em menos de 1 minuto, culminando com uma apnéia (Lambertsen, 1978d). Esse fato se contrapõe à afirmação de que uma alta concentração de CO_2 no gás inspirado leva à depressão respiratória, pois é mais provável que a apnéia tenha sido uma consequência da crise convulsiva, interferindo mecanicamente com o movimento ventilatório. Sendo isso verdade, é possível que a depressão da curva entre volume-minuto e concentração inspiratória de CO_2 a níveis elevados do mesmo subestime a capacidade de estimulação ventilatória do CO_2 , a qual poderia atingir até os limites físicos da respiração (Lambertsen, op. cit.).

Por outro lado, baixas concentrações inspiradas de CO_2 são bem toleradas e quando se relaciona o volume-minuto respiratório à PCO_2 alveolar correspondente à concentração de CO_2 inspirado entre 1 e 7% ou, ainda melhor, em relação a PCO_2 arterial (PaCO_2), a curva se mostra linear, tendo em vista a variabilidade na amostragem direta da PCO_2 alveolar na última porção de cada exalação, mais significativa quanto menor for o volume corrente. Isso ocorre devido a uma menor mistura com o ar do espaço morto dada lavagem incompleta deste último (Lambertsen, 1978a). Há um aumento da ventilação proporcional ao aumento da PCO_2 alveolar que tende, por sua vez, a corrigir este aumento, diminuindo a PCO_2 nos alvéolos (Lambertsen, 1978a). Portanto, existe uma relação inversa entre a extensão da ventilação e da PCO_2 alveolares, a níveis constantes de produção metabólica de CO_2 , de maneira que uma queda da ventilação aumenta a PCO_2 , enquanto seu aumento diminui a última. A níveis de PCO_2 alveolar inferiores ao normalmente encontrado em repouso (em torno de 40mmHg), a linearidade também se verifica, mas com uma relação inversa, diminuindo o volume-minuto respiratório e tendência à elevação da PCO_2 alveolar. Esta relação se estende até um determinado valor da PaCO_2 acima de zero. A partir deste ponto, diminuições subseqüentes na PaCO_2 não causam qualquer diminuição da ventilação (Lambertsen, 1978d; Lahiri e DeLaney, 1975b). Duas conclusões significativas podem ser retiradas dessas observações. Primeiro, ao menos a nível central, parece haver um limiar de atuação correspondendo a um nível mínimo de PCO_2 arterial (Lambertsen, 1978d; Lahiri e DeLaney, op. cit.). Segundo, em repouso, a tensão arterial normal de CO_2 mantém um mínimo de excitabilidade neuronal do centro respiratório estritamente vinculado à atividade respiratória normal. Qualquer acréscimo na concentração de CO_2 inspirado induz uma estimulação ventilatória (Lambertsen, 1978d). Sendo assim, o papel do CO_2 parece ser o

de evitar uma queda acentuada da ventilação, abaixo do nível normal de repouso e insuficiente para corresponder às necessidades da taxa metabólica na manutenção da homeostase (Lambertsen, 1978d). A atuação do CO_2 sobre a ventilação se dá em ambos parâmetros que determinam o volume-minuto respiratório, frequência respiratória e volume corrente, de sorte que para ambos a relação também se mostra linear (Lambertsen, 1960). Entretanto, foi verificada a existência de uma variabilidade individual considerável na relação PCO_2 -ventilação, alguns indivíduos apresentando alta sensibilidade ao CO_2 enquanto outros com sensibilidade muito baixa, cujos níveis elevados PCO_2 alveolar em repouso, ao redor de 42mmHg, são similares aos encontrados em alguns pacientes com enfisema pulmonar (Lambertsen, 1960). Outra característica interessante desta relação é o fato da PCO_2 alveolar aumentar durante o sono. Isso ocorre devido a uma diminuição da reatividade dos mecanismos de controle respiratório, resultante de uma redução no bombardeio de impulsos aferentes, que se associam ao estado de vigília, sobre a formação reticular (Fink, 1961; Bulow, 1963). O que vale dizer que quando acordado, o indivíduo já se encontra com sua respiração estimulada, sendo observado durante o sono o nível de excitação realmente basal do centro respiratório (Lambertsen, 1978d).

As alterações respiratórias induzidas pelo CO_2 têm duração limitada, de maneira que é muito intensa nas primeiras horas, mas posteriormente entra em declínio gradual e após 2 dias de exposição contínua a desvios da PaCO_2 , os centros respiratórios centrais perdem aproximadamente 80% da sua sensibilidade ao mesmo (Guyton, 2000). Isto ocorre tanto em indivíduos expostos cronicamente a elevadas tensões arteriais de CO_2 , como nos pacientes portadores de DPOC, quanto na aclimatização dos alpinistas. Estes últimos, após aproximadamente 48 horas à exposição contínua a baixas concentrações de O_2 no ar inspirado, conseguem aumentar muito sua ventilação devido à manutenção do estímulo hipóxico reflexo periférico, às expensas de quase não haver mais inibição dos centros respiratórios centrais (apenas 20% do efeito) pela queda da PCO_2 central provocada pela hiperventilação hipóxica inicial. A explicação para esse fenômeno se deve tanto a compensação metabólica produzida pelos rins, que na presença de acidose ou alcalose respiratória induzem, respectivamente, a uma alcalose ou acidose metabólica compensatória, diminuindo ou aumentando a excreção renal de bicarbonato e cátions, no caso lançando mão desta última a fim de compensar a alcalose arterial e central inicial (Lambertsen, 1978b). Mas também, no decorrer de várias horas, pela lenta passagem do bicarbonato pelas barreiras hematoliquórica e hematoencefálica em direção à corrente

sanguínea, vindo a neutralizar os desvios acidobásicos, sobretudo no meio extracelular circundante dos quimiorreceptores centrais, tendendo a restaurar a $[H^+]$ local em direção aos níveis normais e, com isso, diminuindo o efeito inibitório à ventilação provocado pela alcalose central inicial (Lambertsen et al., 1961; Guyton, 2000). Estimativas experimentais da passagem do bicarbonato pelas barreiras centrais dão conta do aumento da concentração de bicarbonato no LCR (líquido cefaloraquidiano) a uma taxa de 1mEq/litro/30min aproximadamente (Michel, 1964).

1.2.2 O papel do O_2

A partir dos clássicos trabalhos de Heymans e colaboradores, entre 1927 e 1929, que lhe renderam um prêmio Nobel em 1945 por sua descoberta de que a estimulação da respiração pela hipóxia teria uma origem exclusivamente reflexa periférica e de De Castro, em 1928, que confirmaram o papel dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos como órgãos sensíveis a alterações da PO_2 , PCO_2 e $[H^+]$ no sangue arterial (Fitzgerald e Lahiri, 1986), foi possível estudar os efeitos diretos da hipóxia separadamente sobre o SNC, utilizando-se de animais quimiorreceptores carotídeos e aórticos denervados, com centros respiratórios intactos ou analisando-se a resposta ventilatória em pacientes que tiveram seus nervos do seio carotídeo seccionados e seus corpos carotídeos removidos (Holton e Wood, 1965). As conclusões destes estudos foram (Lambertsen, 1978d):

- O efeito da hipóxia é de uma depressão progressiva dos centros respiratórios centrais que produz uma depressão ventilatória proporcional ao grau de hipóxia, na ausência de estimulação quimiorreceptora carotídea. Os quimiorreceptores aórticos sozinhos parecem não conseguir sustentar ou produzir uma estimulação central que resulte em aumento ventilatório (Holton e Wood, op. cit.). Se a exposição hipóxica se prolonga nesses animais denervados, é observado um aumento da frequência respiratória que não consegue resultar em aumento ventilatório significativo (Lambertsen, 1978d).
- A presença dos corpos carotídeos intactos faz com que a depressão respiratória hipóxica seja superada pelo bombardeio estimulatório sobre os centros respiratórios centrais proveniente dos quimiorreceptores periféricos. Por conta disso, os centros deprimidos centrais podem comandar a respiração a níveis mais elevados que o normal (Lambertsen, 1978d). Entretanto, essa superação parece ocorrer até certo nível, pois um estudo de Lahiri e DeLaney

(1975b) mostrou que, sob hipóxia severa ($\text{PaO}_2 < 25\text{mmHg}$), a ventilação foi menor que com uma PaO_2 de 32mmHg , mantendo-se a PCO_2 em valores iguais, sugerindo haver uma competição entre a depressão central hipóxica e a estimulação carotídea, mesmo que esta última pareça vencer, mas a níveis mais baixos que o esperado, ou seja, haveria um aumento real da ventilação, mas não tanto quanto se poderia esperar.

- Tanto a atividade quimiorreceptora quanto a resposta respiratória reflexa por ela desencadeada são caracterizadas por uma interação positiva entre hipóxia e hipercapnia (Nielsen e Smith, 1952; Lloyd et al., 1958), muito embora ambas não sejam necessariamente proporcionais (Lahiri e DeLaney, 1975b).

1.3 OS QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS

Os quimiorreceptores periféricos são estruturas ricamente vascularizadas, com uma histologia bastante complexa (Fidone e Gonzalez, 1986; Heath, 1991). Existem diversas destas estruturas espalhadas pelo pescoço, tórax e abdômem, pertencentes ao sistema paraganglionar não cromafínico, como designam os patologistas, pelo fato de seus tumores raramente secretarem catecolaminas (Cotran et al., 1999). Destas, duas são mais importantes, formando verdadeiros nódulos, os corpos carotídeos e os corpos aórticos. Embora sejam atualmente reconhecidos como órgãos quimiorreceptores, no passado já foram considerados como glândulas endócrinas em virtude de possuírem inúmeros neurotransmissores, os quais, entretanto, atuam apenas localmente (Heath, 1991). Compostos basicamente por 2 tipos celulares, as células principais (tipo I ou glômicas) e as células sustentaculares (tipo II), as primeiras são estruturalmente consideradas como pertencentes ao sistema APUD (“amine-precursor uptake and decarboxilation”) (Heath, 1991; Cotran et al., op. cit.).

Embora sejam sensíveis a praticamente os mesmos estímulos, ambos possuem funções quimiossensoras um tanto distintas, assumindo papéis diferentes no controle da respiração. Trabalhos de Lahiri e DeLaney (1975b), Lahiri (1980) Lahiri et al. (1981b) demonstraram que os corpos carotídeos respondem a alterações da tensão de O_2 no sangue arterial, os quais representam os valores da pressão alveolar de oxigênio (PAO_2) e conseqüentemente da eficiência ventilatória, ao passo que os corpos aórticos respondem às variações do conteúdo de O_2 no sangue arterial e, portanto, refletindo a

eficiência da oxigenação tecidual periférica. Estes últimos ainda parecem ter uma responsividade muito baixa ao CO_2 , de maneira que um aumento da PaCO_2 em ar ambiente ou em condições de hiperóxia, que normalmente já tem atenuado sua resposta quimiorreceptora periférica global, produz um aumento mínimo da atividade dos receptores aórticos (Lahiri et al., 1981b). Por conta disso parecem ter um papel secundário no controle ventilatório, pois como já visto, são incapazes de sustentar a respiração na ausência de estímulo carotídeo. A diferença entre ambos recai, portanto, no tipo e no grau da resposta respiratória evocada. Enquanto corpos aórticos atuam a nível central alterando apenas a frequência respiratória, sem interferir no volume corrente, a resposta carotídea se manifesta por um aumento tanto da frequência respiratória quanto do volume corrente, independente da causa do estímulo, com uma intensidade sobre a respiração aproximadamente sete vezes maior (de Burgh Daly e Ungar, 1966).

Por outro lado, é possível que existam outros quimiorreceptores periféricos particularmente sensíveis a alterações da PCO_2 alveolar ou do sangue venoso misto que seriam importantes, sobretudo, na hiperpnéia do exercício, embora ainda não haja comprovação anatômica dessas estruturas no homem (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Como em pássaros estas estruturas foram localizadas no pulmão, acredita-se que este seria o sítio mais provável de localização no homem, em virtude da presença dos corpos neuroepiteliais pulmonares, os quais contém células similares às células tipo I carotídea. Entretanto sua função quimiorreflexa ainda não está estabelecida (Fitzgerald e Lahiri, op. cit.).

No entanto, a ausência crônica de corpos carotídeos parece induzir a um aumento da atividade dos outros quimiorreceptores periféricos, notadamente os corpos aórticos, que passam a comandar a função quimiorreflexa respiratória periférica, mostrando haver uma considerável plasticidade do sistema de controle ventilatório (Prabhakar e Peng, 2004). Camundongos mostraram uma resposta ventilatória normal à hipóxia, após deservação crônica dos corpos carotídeos, mediada por outros aferentes que não do corpo carotídeo, inervados pelo nervo vago (Kline et al., 2002). Por outro lado também foi observada uma restauração da sensibilidade ventilatória à hipóxia do nervo do seio carotídeo (NSC) (Martin-Body et al., 1986). O mecanismo dessa mudança funcional ainda é desconhecido, mas parece envolver um aumento da atividade dos receptores sensoriais ao O_2 (Prabhakar e Peng, op. cit.).

Em relação às respostas cardiocirculatórias, através de experimentos em que foi possível isolar as repostas evocadas de um ou de outro quimiorreceptor periférico,

constatou-se que os corpos aórticos atuam mais intensamente que os corpos carotídeos, elevando tanto a PA quanto a frequência cardíaca (Lambertsen, 1978c). Já o quimiorreflexo carotídeo parece ativar, simultaneamente, tanto o sistema nervoso simpático quanto o nervo vago cardíaco, resultando numa bradicardia que antecede o aumento da PA ocasionado pela vasoconstrição simpática sistêmica (Kara et al., 2003).

1.4 OS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS

Corpos carotídeos são estruturas nodulares, altamente vascularizadas, localizadas no ângulo de bifurcação das artérias carótidas comuns que funcionam como quimiorreceptores, respondendo reflexamente às variações da pressão parcial de oxigênio, da pressão parcial do CO₂ e do pH arteriais, mas também a outros fatores como temperatura, osmolaridade e pressão arterial (Fitzgerald e Lahiri, 1986). No entanto, são sensíveis principalmente à hipóxia, respondendo com um aumento do volume-minuto respiratório associado a reflexos cardiocirculatórios (Levitzky, 1995). Constituem-se no principal órgão quimiossensorial periférico em várias espécies, inclusive no homem, a responder a alterações da PO₂ arterial (Honda, 1985; Fitzgerald and Lahiri, 1986; West, 1991), sendo considerado um sensor responsável pela monitoração do fluxo de O₂ respiratório (Lahiri, 1980).

São formações anatômicas individualizadas minúsculas, com forma normalmente ovalada, mas podendo assumir outros formatos, até bilobulações (Smith et al., 1982; Heath, 1991). Laidler e Kay (1975) encontraram um volume médio dos corpos carotídeos de ratos igual a 47,16µm³, variando de 35,91µm³ a 68,92µm³.

1.4.1 Histologia normal

A histologia normal e em condições de hipóxia aguda e crônica já foi brilhantemente abordada em tese anterior deste laboratório, devendo ser consultada para uma revisão mais completa (Vinahes, 1998). No entanto, vale a pena ressaltar alguns detalhes da inervação dos corpos carotídeos não abordados anteriormente. A inervação dos corpos carotídeos é feita pelo nervo do seio carotídeo (NSC ou nervo de Hering) e pelo nervo ganglioglemerular (NGG), simpático, os quais formam um plexo periglômico na superfície do órgão (Fidone e Gonzalez, 1986). Deste plexo partem fibras que penetram o

parênquima glômico acompanhando normalmente os vasos sanguíneos. As fibras do NGG são quase que totalmente fibras não mielinizadas pós-ganglionares que inervam o corpo carotídeo e os vasos sanguíneos adjacentes (Eyzaguirre e Uchizono, 1961). Algumas poucas fibras são mielinizadas pré-ganglionares e admite-se que terminem em algumas poucas células ganglionares presentes no interior dos corpos carotídeos (McDonald e Mitchell, 1975).

Já o nervo do seio carotídeo consiste de fibras não mielinizadas (tipo C) e mielinizadas (tipo A), sendo que as primeiras constituem maioria numa proporção em torno de 4 a 5:1, tanto no rato (McDonald, 1977) quanto no gato (Eyzaguirre e Uchizono, 1961), sobretudo na entrada do nervo no corpo carotídeo, mas cai para 2:1 dentro do parênquima glômico (Eyzaguirre e Uchizono, op. cit.). Ainda segundo esses autores ambas fibras emitem inúmeros ramos colaterais que trafegam em fusos através do estroma, formando o chamado plexo intersticial de De Castro. Bandas estreitas, com apenas 4 a 8 axônios, partem do plexo e se ramificam antes de adentrar nos clusters glomerulares para formar um plexo perilobular composto principalmente de fibras não mielinizadas. No interior dos lóbulos, fibras muito finas emitem ramos terminais que fazem sinapses de várias configurações com as células glômicas, desde botões até em formato de cálice. Tanto um único axônio pode terminar em várias células tipo I quanto uma mesma célula glômica pode receber terminações nervosas de mais de um axônio (Nishi e Stensaas, 1974; Kondo, 1976). Usando técnicas eletrofisiológicas, Fidone e Sato (1969) observaram que 61% das fibras mielinizadas (tipo A) do NSC de gato eram referentes aos quimiorreceptores carotídeos, enquanto as 39% restantes referir-se-iam aos barorreceptores. Dentre as não mielinizadas (tipo C), 17% eram quimiorreceptoras, 29% barorreceptoras e as outras 54% foram consideradas como fibras eferentes autônomas, sejam oriundas do gânglio cervical superior, via anastomose com o nervo ganglioglomerular, sejam oriundas de outros centros autonômicos periféricos ou centrais.

Dentro dos clusters observam-se contatos especializados entre as células glômicas (tipo I) e as terminações nervosas e entre outras células tipo I adjacentes. Ambos contatos são envelopados por células sustentaculares (tipo II), as quais não fazem qualquer tipo de contato, seja com outras células tipo II, seja com células tipo I ou terminações nervosas (McDonald, op. cit.; Verna, 1979). No entanto, envelopam as fibras nervosas intralobulares de maneira semelhante às células de Schwann (Hess e Zapata, 1972; Kondo, op. cit.).

Recebem suprimento sanguíneo por um ou mais ramos da artéria carótida interna ou externa, ou ainda da occipital (Acker, 1980, Fidone e Gonzalez, 1986). Entretanto, foram verificadas variações anatômicas na irrigação dos corpos carotídeos inter e intraespecíficas de maneira significativa que por si só poderiam influenciar a taxa de fluxo ao nível desses órgãos e justificar em parte os diferentes valores de fluxo encontrados na literatura medidos experimentalmente (Acker, 1980). Seidl (1976) encontrou variações anatômicas importantes no suprimento arterial entre gatos germânicos e norte-americanos procedentes de Cleveland. Enquanto no primeiro algumas poucas artérias irrigam os corpos carotídeos em ramos mais calibrosos que derivam das artérias carótida externa e faríngea ascendente e, posteriormente, penetram no parênquima do corpo carotídeo em um a três pontos, no segundo, várias arteríolas cursam ao longo da borda do corpo carotídeo e emitem ramos colaterais que adentram o tecido glômico lateralmente.

Ao nível microscópico, os corpos carotídeos também possuem uma rede capilar bastante peculiar, com capilares que penetram nos lóbulos e outros que os rodeiam, originando a forma lobular característica do parênquima glômico (McDonald e Larue, 1983). Os capilares em contato com as células glômicas são fenestrados, mas não parece haver alguma barreira anatômica à difusão entre sua luz e o espaço intersticial extracelular (Fidone e Gonzalez, 1986). Embora aparentemente não são verdadeiros capilares sinusóides (Biscoe e Stehbens, 1966). Além disso, estudos de McDonald (1983) e McDonald e Larue (op. cit.) em corpos carotídeos de ratos revelaram que sua vasculatura apresenta alto grau de complexidade, existindo ao menos 3 vias pelas quais o sangue arterial poderia atingir as veias: a) grandes capilares glomerulares, em íntima associação com as células parenquimatosas, com paredes finas, diâmetro máximo médio de 17,8 μm , mas variando de calibre ao longo do seu comprimento e formas bastante irregulares, com múltiplas conexões com as vênulas; b) pequenos capilares, com diâmetro máximo de 7,5 μm , assemelhando-se aos capilares normalmente encontrados em outros tecidos, não estando tão intimamente relacionados às células glômicas, não penetrando nos clusters de células parenquimatosas, possuindo um calibre uniforme ao longo de todo seu trajeto e desembocando em apenas uma ou duas vênulas. Ambos tipos seriam originados das mesmas arteríolas e ambos precedidos por esfíncteres pré-capilares. Uma terceira via, composta de anastomoses artério-venosas “*bypassaria*” ambos tipos de capilares.

1.4.2 Ultraestrutura

Do ponto de vista ultraestrutural, os corpos carotídeos apresentam características bastante peculiares que merecem destaque. Ao nível do microscópio eletrônico, as células tipo I no gato aparecem em secções ovaladas ou arredondadas, entre 8 a 12 μm de diâmetro (Ross, 1959), possuindo vários prolongamentos citoplasmáticos digitiformes, de comprimentos variados que chegam a atingir 40 μm (McDonald e Mitchell, 1975). São envelopadas pelas células tipo II apenas nas faces que não estão em contato com outra célula tipo I, ou com uma terminação nervosa, ou fazendo face com o espaço intersticial ou com a parede de algum capilar.

Caracteristicamente, apresentam vesículas com núcleo elétron-denso envoltas por halo claro e membrana única, de diâmetro ao redor de 100nm em ratos e camundongos e entre 150 a 200nm em gatos, cachorros e no homem (Biscoe e Stehbens, 1966; Fidone e Gonzalez, 1986). Entretanto, alguns estudos em ratos revelaram a presença de vesículas com tamanhos diferentes, distribuídas também diferentemente nas células glômicas, motivando os autores a classificar as células glômicas em dois tipos celulares conforme a predominância de um ou outro tamanho de vesícula, células A, com vesículas maiores e células B, com vesículas menores (McDonald e Mitchell, op. cit.). Além disso, as células A seriam em maior número, praticamente o dobro das células B e possuiriam uma maior densidade de vesículas, também o dobro. Mais interessante ainda, os autores verificaram que enquanto praticamente todas as células A são inervadas, apenas poucas células B o são, resultados que foram contestados por Kondo (1976). Este autor, ao invés de utilizar-se de uma análise randomizada dos cortes, fez uma análise de secções seriadas de corpos carotídeos de ratos e, em lóbulos contendo até 19 células tipo I, encontrou apenas uma célula, ainda que incompletamente reconstituída, sem inervação. Além disso, corpos carotídeos de ratos apresentam grande quantidade de sinapses recíprocas (McDonald, 1980), diferente do gato onde as mesmas são escassas, mas possuindo uma percentagem muito pequena de células tipo I não inervadas (McDonald e Mitchell, op. cit.).

Em relação à inervação carotídea, Fidone e Gonzalez (1986) fizeram uma ampla revisão e concluíram que existem nos corpos carotídeos os seguintes contatos sinápticos:

- a) Terminações nervosas sensoriais pós sinápticas à célula tipo I.
- b) Terminações nervosas sensoriais pré-sinápticas à célula tipo I.
- c) Sinapses recíprocas.
- d) Terminações nervosas autônomas pré-sinápticas à célula tipo I.

e) Dendritos de células ganglionares pós-sinápticos à célula tipo I.

Além dessas sinapses com células tipo I, as terminações nervosas ainda estabelecem contatos com:

- f) Vasos sanguíneos intraglômicos: terminações nervosas sensoriais do NSC situadas na adventícia de artérias, arteríolas e shunts arteriovenosos, contendo arborizações terminais semelhantes às terminações barorreceptoras do seio carotídeo. Seriam fibras, provavelmente, barorreceptoras, mas cujo significado funcional ainda é discutível.
- g) Vasos sanguíneos intraglômicos: terminações nervosas pós-ganglionares oriundas do gânglio cervical superior. Foi demonstrado, por meio de H^3 , que estas fibras acumulam norepinefrina.
- h) Vasos sanguíneos intraglômicos: terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas pós-ganglionares oriundas das células ganglionares intraglômicas. As células ganglionares simpáticas receberiam eferências pré-ganglionares através do nervo ganglioglomerular e as parassimpáticas, via NSC.
- i) Fibras sensoriais: fibras eferentes de origem desconhecida, talvez central, estabeleceriam contato sináptico axoaxonal, sendo consideradas responsáveis pelo controle eferente da descarga quimiorreceptora. Entretanto, para McDonald (1980), seriam simplesmente processos digitiformes das células glômicas.

Com base nessa complexa inervação, atualmente se admite que a descarga quimiorreceptora carotídea recebe uma modulação eferente tanto simpática quanto parassimpática (Fidone e Gonzalez, 1986).

1.4.3 Descarga quimiorreceptora carotídea de repouso

Estudos experimentais realizados no gato puderam confirmar a existência de uma atividade elétrica normal de 0 a 15 impulsos/seg nas fibras quimiorreceptoras A, a maioria entre 2 a 5 impulsos/seg; e de 0 a 2 impulsos/seg para fibras quimiorreceptoras C, eventualmente 4-5 impulsos/seg (Fidone e Sato, 1969). Em ambas, não foi observada periodicidade da atividade quimiorreceptora de repouso, ou seja, a descarga de uma única fibra, seja em preparações *in situ* ou *in vitro*, mostrou-se randomizada, de acordo com a distribuição de Poisson. Entretanto, os experimentos *in situ* verificaram a existência de uma oscilação da descarga, com amplitude de $\pm 20\%$ da taxa média de descarga, em conformidade com a frequência respiratória e com as variações cíclicas da PaO_2 e da

PaCO_2 decorrentes da respiração (Band et al., 1970), seja em fibras isoladas ou em preparações com múltiplas fibras de gatos anestesiados respirando livremente (Biscoe e Purves, 1967; Band e Wolf, 1978). Portanto, a probabilidade de ocorrer uma descarga de uma fibra isolada variaria com a periodicidade da respiração, mas não com o tempo decorrido desde o último impulso, por isso a randomização.

Ainda é incerto se essas características oscilatórias da atividade quimiorreceptora têm alguma importância sobre o controle ventilatório, em repouso ou no exercício. Mesmo assim esses fatos, associados às observações da existência de atividade elétrica nos nervos do seio carotídeo com PaO_2 acima de 500mmHg (Lahiri e DeLaney, 1975b) denotam a presença de intensa atividade elétrica dos quimiorreceptores periféricos em condições normais de PO_2 e PCO_2 arterial, configurando a existência de um tônus neural definido que contribui certamente com o ajuste fino da regulação da ventilação em condições normais de respiração, ao menos, em repouso (Lambertsen, 1978c).

1.5 ESTÍMULOS SENSÍVEIS AOS CORPOS CAROTÍDEOS

Os quimiorreceptores periféricos, particularmente os corpos carotídeos são sensíveis tanto a estímulos químicos quanto de natureza física (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Dentre os primeiros, sem dúvida, as alterações da tensão de O_2 e os desvios do equilíbrio acidobásico, ambos no sangue arterial são os principais, muito embora outras substâncias químicas, como a nicotina, também causam estimulação carotídea (Lambertsen, op. cit.). Por sua vez, fatores físicos como alterações da temperatura, da osmolaridade e da pressão arterial afetam igualmente a resposta quimiorreceptora carotídea (Fitzgerald e Lahiri, op. cit.).

1.5.1 Atuação do CO_2 sobre os quimiorreceptores carotídeos

Diferentemente do que parece ocorrer com a ventilação, onde a presença de uma PCO_2 arterial mínima se faz necessária para que haja estímulo respiratório, os quimiorreceptores periféricos ainda mostram alguma atividade elétrica com níveis bem reduzidos de PaCO_2 (Eyzaguirre e Lewin, 1961; Eyzaguirre e Koyano, 1965). Mesmo com a diminuição da atividade elétrica quimiorreflexa à respiração de O_2 puro a 1atm, valores mínimos só são atingidos quando a PaCO_2 cai abaixo de 30mmHg (Eyzaguirre e Koyano,

op. cit.). Por outro lado, aumentos na PaCO_2 induzem tanto a elevações da atividade quimiorreceptora de maneira proporcional em fibras isoladas (Lahiri e Delaney, 1975b; Fitzgerald e Dehghani, 1982) quanto ao recrutamento de novas fibras de acordo com a intensidade do estímulo (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Contudo, níveis muito altos de PCO_2 arterial parecem resultar em aumentos progressivamente menores, fazendo com que a curva assumira um aspecto sigmóide na sua porção superior, como se atingisse um limite máximo de descarga, esgotando a descarga neural (Fitzgerald e Lahiri, op. cit.).

Apesar do efeito estimulatório da hipercapnia sobre a descarga elétrica quimiorreceptora carotídea, o efeito da hipocapnia parece ser proporcionalmente mais acentuado em diminuir a atividade elétrica carotídea, numa mesma PO_2 (Eyzaguirre e Lewin, 1961). Corroborando esses resultados, também foi observado que a desnervação parece ter efeitos proporcionalmente maiores sobre a inibição da atividade dos corpos carotídeos, provocada pela queda da PCO_2 arterial, do que sobre a sua estimulação pelo aumento da PaCO_2 , ou seja, prejudicando muito mais a inibição do que a estimulação respiratória (Dejours, 1962). Provavelmente a explicação para este fenômeno reside nos mecanismos de estimulação das células quimiorreceptoras carotídeas pelo CO_2 e pelo H^+ , os quais, entretanto, ainda não foram esclarecidos (Prabhakar e Peng, 2004; Lahiri et al., 2006). Tanto elevações da PCO_2 arterial, mantendo-se pH constante, quanto aumento da concentração de H^+ , com PaCO_2 constante, estimulam a atividade quimiorreceptora (Hornbein e Roos, 1963; Eyzaguirre e Koyano, 1965). Contudo, nunca se comprovou um efeito estimulatório direto da molécula do CO_2 sem que esse efeito estivesse associado ao aumento da $[\text{H}^+]$ (Fidone e Gonzalez, 1986), de maneira que ou elevações da $[\text{H}^+]$ intra e extracelulares podem excitar as células quimiossensíveis ou as moléculas de H^+ ou de HCO_3^- conseguiriam atravessar facilmente a membrana dessas células. Certamente, variações do pH intracelular devem estar envolvidas, já que foi confirmada a presença da enzima anidrase carbônica no interior das células glômicas (Ridderstrale e Hanson, 1984). O acúmulo de metabólitos não parece necessário para que ocorra uma estimulação dos quimiorreceptores periféricos, pois a ocorrência de parada cardio-circulatória na vigência de anóxia respiratória grave não provocou qualquer aumento adicional na atividade quimiorreceptora carotídea (Eyzaguirre e Koyano, op. cit.).

1.5.2 Atuação do O_2 sobre os quimiorreceptores carotídeos

Uma conclusão importante dos estudos sobre os efeitos da hipóxia a nível central diz respeito aos diferentes papéis dos corpos carotídeos e dos corpos aórticos frente às diferentes causas de hipóxia. Embora alguns estudos iniciais identificaram uma relação inversa entre o conteúdo de O_2 no sangue e a atividade quimiorreceptora carotídea similar à curva da hemoglobina (Hb) (Euler et al., 1939), estudos anteriores de Comroe e Schmidt em cães (1938) e, posteriormente, de Chiodi et al. (1941) no homem mostraram que uma concentração de carboxiemoglobina (HbCO) até 50% não estimulava a ventilação, sugerindo uma ausência de estimulação quimiorreceptora carotídea. Duke et al. (1952) confirmaram que uma concentração de HbCO até 80% não estimulava os corpos carotídeos se a PO_2 inalada fosse mantida em níveis normais, estando de acordo com a observação clínica de que pacientes portadores de anemia severa não apresentam hiperventilação (Davis et al., 1981). Mais impressionante, numa preparação experimental com perfusão desses órgãos com uma solução livre de Hb, mas com uma PO_2 de 150 mmHg, não houve estimulação da ventilação (Lambertsen, 1978d). Entretanto, alguns experimentos demonstraram uma estimulação ventilatória, tanto pela HbCO quanto pela anemia (Mills e Edwards, 1968), mas que foram atribuídos à estimulação dos corpos aórticos e não dos corpos carotídeos (Paintal, 1967) e confirmados posteriormente por Lahiri et al. (1981a). Dessa forma, ficou constatado que tanto em casos de anemia ou de intoxicação por CO, onde a quantidade de O_2 ligado à hemoglobina encontra-se prejudicada, mas a PO_2 se mantém normal ou mesmo aumentada, ou seja, hipóxias do tipo anêmicas, não há estimulação quimiorreceptora carotídea, mas sim dos corpos aórticos, ao passo que a queda da PO_2 arterial estimula ambos quimiorreceptores (Lahiri et al., 1981b). Além disso, a simpatectomia não interfere com esses resultados (Davies et al., op. cit.).

Heymans e co-autores (1931) foram os primeiros a descobrir que os corpos carotídeos eram responsáveis pelo efeito dispnéico do cianeto, por via reflexa, após De Castro ter sugerido uma função quimiossensorial aos mesmos (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Desde então, várias outras substâncias tóxicas, tanto ao nível da cadeia respiratória quanto ao nível do metabolismo intracelular, mostraram-se potentes estimulantes dos corpos carotídeos (Mulligan e Lahiri, 1981, 1982). Esses experimentos permitiram concluir que são estruturas sensíveis a variações da PaO_2 e apenas situações de hipóxia que interfiram com a mesma ou com o aproveitamento final do O_2 na cadeia respiratória lhes servirão de estímulo, sendo assim suscetíveis de serem estimulados em hipóxias do tipo hipóxica e histotóxica (Fidone e Gonzalez, 1986). Nem a presença de intoxicação por CO

ou redução do hematócrito, ou mesmo a simpatectomia, alteram a resposta dos quimiorreceptores carotídeos à hipóxia hipóxica. Ao passo que os corpos aórticos são responsáveis por medir alterações do conteúdo de O_2 do sangue arterial e, assim, sensíveis às hipóxias anêmicas (Lahiri, 1980; Lahiri et al., 1981a). Como a PaO_2 é um dos componentes do conteúdo total de O_2 no sangue arterial, é natural que estes últimos respondam a qualquer tipo de estímulo hipóxico, mesmo que em algumas situações com menos intensidade que os corpos carotídeos (Lahiri et al., 1981b).

Experimentos realizados em preparações tanto com fibra única quanto com múltiplas fibras de corpos carotídeos de gatos, demonstraram que, diferentemente do efeito proporcional sobre a atividade quimiorreceptora carotídea provocado por alterações da $PaCO_2$, a resposta quimiorreceptora periférica à hipóxia, sob PCO_2 arterial constante, ocorre de maneira a produzir uma relação exponencial entre a atividade elétrica quimiorreceptora e a PO_2 (Lahiri e DeLaney, 1975b). Nos estudos com nervos inteiros foi observada uma queda na descarga quimiorreceptora com níveis muito baixos de PO_2 , menores que 25mmHg, não confirmada pelos estudos com fibras isoladas, embora nestes últimos tenha sido observada uma diminuição da amplitude da espícula da descarga elétrica, a qual pode ter sido a causa da queda observada com nervos inteiros (Biscoe et al, 1970b; Lahiri e DeLaney, op. cit.). Por outro lado, foram obtidas atividades elétricas com valores de PaO_2 acima de 600 mmHg (Biscoe et al, 1970a). No entanto, não se observa aumento até que a PO_2 atinja valores entre 400 e 140 mmHg, com média de 190 mmHg, o qual foi considerado como valor limiar (Biscoe et al., 1970a; Lahiri e DeLaney, op. cit.). Valores de PO_2 arterial pouco abaixo de 100mmHg já mostram um aumento significativo da atividade elétrica medida em impulsos/minuto e uma nítida elevação é observada com PaO_2 abaixo de 60mmHg (Lahiri e DeLaney, op. cit.). Além disso, a atividade quimiorreceptora carotídea apresenta duas outras características importantes: possui uma latência muito baixa, 3 a 4s no animal intacto após uma mudança na PO_2 inalada (Leitner et al., 1965) e de 0,3 a 0,8s em preparações com perfusão local (Black et al., 1971). E não sofre adaptação sob condições sustentadas, a menos que uma hipóxia severa comprometa metabolicamente as terminações nervosas sensoriais (Paintal, 1967; Black et al., op. cit.).

Em termos de resposta ventilatória, o efeito estimulatório da hipóxia provocado pela ativação quimiorreceptora periférica, apresenta também uma curva exponencial de maneira que a relação entre a intensidade da descarga quimiorreceptora carotídea e a ventilação se manifesta de forma aproximadamente linear. Entretanto, o aumento da

ventilação só se torna evidente em níveis de PaO_2 abaixo de 60mmHg, mas é totalmente abolido pela secção total de ambos os nervos do seio carotídeo, confirmando a origem reflexa periférica do estímulo hipóxico (Lahiri e DeLaney, 1975b).

Como na prática as alterações nas tensões dos gases respiratórios são dinâmicas, até hoje a real contribuição dos reflexos respiratórios desencadeados pelos quimiorreceptores periféricos em resposta às alterações da PO_2 arterial ainda é motivo de discussão. Sobretudo pelo fato das respostas ventilatórias à hipóxia não serem tão acentuadas quando comparadas aos efeitos respiratórios desencadeados pelos desvios da PaCO_2 , diferente do que ocorre ao nível dos quimiorreceptores periféricos, os quais apresentam um aumento progressivo da descarga elétrica com a diminuição da PaO_2 , como discutido acima. A limitação ventilatória é decorrente da hipocapnia arterial e central resultante da estimulação ventilatória hipóxica (Dejours, 1962). No homem, a respiração de 10% ou de 8% de O_2 produz uma queda de 7 e 15mmHg, respectivamente, nos valores normais da PCO_2 central, limitando os efeitos estimulatórios hipóxicos (Ketty e Schmidt, 1948; Lambertsen et al., 1957). Junte-se a isso, o próprio efeito depressor central da hipóxia, além da vasodilatação cerebral associada que acentua a queda da PCO_2 central (Lambertsen, 1978d). Dessa forma, como afirma Lambertsen (1978d) “a hipóxia, portanto, reduz a concentração do estímulo respiratório central, ao mesmo tempo em que induz uma estimulação quimiorreflexa”. Mesmo uma estimulação máxima anoxêmica não é tão acentuada quanto o potente efeito estimulador do CO_2 sobre o controle ventilatório, podendo uma hipocapnia severa atenuar ou quase abolir a estimulação hipóxica (Lambertsen, op. cit.).

Contrariamente, para os quimiorreceptores periféricos as alterações da PaO_2 constituem estímulo verdadeiramente importante, certamente o principal (Acker, 1989; Lahiri, 1980). Apesar de aparentemente possuírem uma taxa metabólica elevada, os corpos carotídeos parecem retirar todo o O_2 necessário à manutenção das suas atividades metabólicas apenas da fração dissolvida, o que é conseguido às custas do seu elevado fluxo sanguíneo, o maior de todo o organismo por grama de tecido (20ml/g de tecido/min), maior até que o fluxo cerebral (Daly et al., 1954; West, 1991), de maneira que a diferença artério-venosa do conteúdo de O_2 através dos corpos carotídeos são quase inexistentes e difíceis de serem medidas (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Entretanto, esses valores têm sido objeto de bastante discussão, sobretudo pelo fato de, sendo sensíveis a variações da PaO_2 , é provável que também o sejam das variações da PO_2 tecidual local. Esta, por sua vez, é função não só da PaO_2 , mas também do fluxo sanguíneo local, da

taxa metabólica tecidual e da estrutura vascular. Durante a hipóxia, a PO_2 local dos corpos carotídeos cai para valores baixos (Acker et al., 1977). Se esse fato se constitui no estímulo que atua sobre o quimiorreceptor, todos os fatores determinantes ou que regulam a PO_2 local devem influenciar a resposta reflexa desencadeada.

1.5.3 A influência da hipóxia isquêmica

De Castro (1951) observou variações na morfologia vascular quando o órgão era estimulado fisiológica ou farmacologicamente. Algumas pesquisas que se seguiram indicavam que uma queda da PA por hemorragia estimulava intensamente os corpos carotídeos e de maneira reversível com o retorno da PA aos níveis normais (Landgren e Neil, 1951). Mas também induzia uma variação do fluxo sanguíneo dos corpos carotídeos dependente da mesma (Daly et al., 1954). Estes resultados eram conflitantes com a falta de resposta destes sensores à hipóxia anêmica. Entretanto, Eyzaguirre e Lewin (1961) obtiveram resposta semelhante apenas em alguns de seus experimentos sob hipotensão e oclusão carotídea, concluindo que a responsividade carotídea a tais estímulos era altamente variável. Por outro lado, foi observado que os corpos aórticos respondiam prontamente à queda da PA (Lee et al., 1964).

Na busca de solucionar as dúvidas existentes, Biscoe et al. (1970a) estudaram o efeito da PA em corpos carotídeos perfundidos naturalmente ou artificialmente sob condições controladas de PaO_2 , $PaCO_2$ e pH_a e concluíram que os corpos carotídeos eram insensíveis às variações da PA dentro do range fisiológico, de maneira que uma queda da PA de 160 para 60 mmHg provocava apenas uma mínima e transitória estimulação quimiorreceptora, para uma queda do fluxo sanguíneo local acentuada de 60 para 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. Mas tornavam-se sensíveis com níveis de PA mais baixos, ou seja, inferiores a 50-60 mmHg. Já em relação à variação do fluxo com a PA, seus resultados confirmaram aqueles obtidos anteriormente por Daly et al. (op. cit.), mostrando uma relação linear entre ambos, porém contrariando os achados clássicos iniciais de De Castro (op. cit.), que havia observado microscopicamente *in vivo* que o fluxo dos corpos carotídeos era independente da pressão arterial. Mais recentemente, Lahiri (1980) observou em fibras isoladas de corpos carotídeos uma sensibilidade muito baixa à queda da PA de 116 para 56 mmHg, enquanto Mitchell e McCloskey (1974) confirmaram a existência de resposta quimiossensora carotídea a níveis de PA inferiores a 50-70 mmHg.

Esses resultados deixaram evidente que os corpos carotídeos respondem apenas a hipotensões severas, diferente do que ocorre com os corpos aórticos. Para Lahiri (1980), a diferença entre ambos seria um maior fluxo sanguíneo ao nível dos corpos carotídeos, cuja resposta hipotensora só se torna evidente quando a queda da PA é suficiente para induzir uma queda do fluxo de O_2 aos quimiorreceptores. É possível, então, que possa haver uma relação entre oferta e consumo de O_2 na estimulação quimiorreceptora carotídea ou, como afirmam Fidone e Gonzalez (1986), “qualquer condição que interfira com a taxa adequada de liberação de O_2 ao receptor ou sua utilização excitará os quimiorreceptores. Esta afirmação deve servir mais como um guia do que um ditado, uma vez que os dados experimentais são, às vezes, confusos”. Os dados a que se referem os autores estariam relacionados ao consumo de O_2 por parte dos quimiorreceptores, a pressão parcial de O_2 tissular e ao fluxo sanguíneo ao nível dos corpos carotídeos.

1.5.4 Pressão parcial tissular de O_2 no corpo carotídeo em repouso

Utilizando técnicas com micropipetas para monitorar a PO_2 tecidual local ou com eletrodos em agulha para a medição polarográfica da PO_2 ao nível do corpo carotídeo, Acker, Lübbers e colaboradores (Acker et al., 1971; Acker et al., 1977; Acker, 1980) e Whalen e co-autores (Whalen et al., 1973; Whalen e Nair, 1975; Whalen e Nair, 1976) chegaram a resultados diferentes. O primeiro grupo obteve baixos valores, entre 60-80 mmHg na superfície do órgão e entre 0 e 40 mmHg nas camadas profundas em cerca de 80 % das medidas efetuadas em gatos. Além disso, entre essas duas regiões, encontrou uma região abaixo da superfície, de aproximadamente 100 μ m de espessura cujos valores variaram de 0 a 10 mmHg apenas. Os autores a denominaram de “barreira ao oxigênio”. Por outro lado, o segundo grupo de pesquisadores obtiveram valores mais elevados em gatos ventilados artificialmente com ar, relatando uma PO_2 média na superfície de 101 mmHg (range de 85 a 120 mmHg) e de 73 mmHg (range de 42 a 105 mmHg) nas camadas mais profundas, além de não observarem seja a existência de alguma barreira ao O_2 , seja uma distribuição bimodal da PO_2 tissular nos corpos carotídeos. Outros pesquisadores também obtiveram valores ainda mais altos, sem a presença de qualquer barreira (Nair et al., 1980).

As discrepâncias nos valores obtidos nos diferentes grupos podem ter sido reflexo de alguns fatores como diferenças na metodologia experimental e também decorrente das

variações inter e intraespecíficas do suprimento circulatório a esses órgãos (Acker, 1980; Fidone e Gonzalez, 1986; Acker, 1989). Enquanto Whalen banhava *in situ* os corpos carotídeos expostos com solução salina enriquecida com O₂, Acker cobria os órgãos com óleo mineral aquecido ou simplesmente o mantinha umedecido com uma fina camada de salina. Esse procedimento visaria impedir que tanto o fluxo local quanto o meio externo circundante no interior dos tecidos (concentrações iônicas, equilíbrio osmótico etc) fossem afetados, como pode ter ocorrido no grupo de Whalen. Mas não necessariamente variações da PO₂ da solução salina, já que Whalen não havia observado alterações da PO₂ medida com mudanças da PO₂ salina. Acker (1980) ainda observou que a diferença no suprimento arterial e a posição do eletrodo de PO₂ determinaria a PO₂ medida, procurando sempre introduzir o eletrodo no lado oposto ao de entrada do suprimento arterial. Além disso, para este autor, a habilidade de se introduzir o eletrodo corretamente, controlando por meio de secções histológicas também pode ter influenciado nos resultados diferentes encontrados por outros grupos.

1.5.5 Consumo de O₂ dos corpos carotídeos

Daly et al. (1954) foram os primeiros a medir o consumo de oxigênio dos corpos carotídeos. Trabalhando com gatos, obtiveram um valor bastante alto, de 9mLO₂.100g-1.min-1, aproximadamente 2 a 3 vezes o consumo do tecido cerebral a 100 mmHg (Fidone e Gonzalez, 1986). Este valor foi confirmado posteriormente por Purves (1970a), o qual encontrou um valor de 0,147μLO₂.órgão-1.min-1 em gatos perfundidos natural ou artificialmente em condições de repouso. Estas medidas, no entanto, foram realizadas com base na diferença arterio-venosa (AV) de O₂, o que segundo Acker (1980) não seria adequado, pois o método é baseado nas detecções de pequenas mudanças nas diferenças na tensão e conteúdo de O₂ entre o sangue arterial e venoso do corpo carotídeo. Entretanto, salienta que em condições de normóxia, a maioria do sangue que flui ao corpo carotídeo seria shuntado via anastomoses AV e muito pouco sangue irrigaria localmente o parênquima glômico. Mesmo assim, utilizando-se deste método, Fay (1970) encontrou valores bem menores, ao redor de 1,5 mL O₂ . 100 g-1 . min-1, mas com perfusão de solução salina sob PO₂ entre 143 e 220 mmHg. Em suas pesquisas, no entanto, O'Reagan (1979, 1981) observou que a taxa de consumo inicial de O₂ pelos corpos carotídeos perfundidos com salina era alta e similar aos valores encontrados por Daly et al (op. cit.) e Purves (op. cit.), mas a medida em que a perfusão continuava o

consumo de O_2 ia caindo até atingir os baixos valores encontrados por Fay (1970). Para o autor, haveria algum fator presente normalmente no sangue, mas ausente no perfusato salino usado por Fay (1970), que elevaria o consumo metabólico de O_2 .

Por outro lado, os valores obtidos por outros pesquisadores baseados em métodos de confinamento foram bem inferiores e mais próximos aos encontrados por Fay (op. cit.). Nesses métodos, o consumo é monitorado tanto pelo decaimento da PO_2 no meio que banha os órgãos artificialmente quanto pela evolução temporal do decaimento da PO_2 intraglomérica, com o uso de micropipetas, após a interrupção da perfusão ou da superfusão do órgão. Dessa forma, Whalen e Nair (1976), após a interrupção do fluxo tanto de sangue quanto de salina, obtiveram valores médios de $1,1 \text{ mL } O_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ao passo que utilizando-se da diferença AV encontraram um valor médio de $6 \text{ mL } O_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Observaram ainda que quando interrompiam um fluxo de sangue, o decaimento da PO_2 era, às vezes, mais rápido que quando do uso de salina. Outras vezes isso não ocorria (Whalen e Nair, 1976). Starlinger e Lübbers (1976) e Acker e Lübbers (1977) também obtiveram baixas taxas de consumo de O_2 , em torno de $1,3 \text{ mL}$, utilizando-se do método de confinamento e decaimento da PO_2 . Estes últimos ainda observaram que o decaimento da PO_2 era similar entre perfusatos com sangue ou salina e sugeriram a existência de “plasma skimming” (plasma separado dos elementos figurados, ou seja, irrigação das células apenas com plasma) ao nível do parênquima glômico para explicar este fato. Idéia compartilhada por Whalen et al. (1981), os quais ainda observaram uma queda do consumo de $1,9 \text{ mL}$ para $1,4 \text{ mL}$ quando a perfusão do corpo carotídeo era feita com sangue ou salina equilibrada, ou não, com CO_2 .

Leitner e Liaubet (1971), entretanto, usando o mesmo método de confinamento encontraram valores de consumo de O_2 de corpos carotídeos de gatos três vezes maior que os relatados por Daly et al. (1954) e Purves (1970a), procurando confirmar a precisão do seu método com valores da literatura para o consumo cerebral de ratos. Os autores atribuíram muitas das diferenças das medidas de consumo encontradas ao peso do órgão usado pelos diversos autores, pois alguns estudos utilizaram estimativas antigas incorretas do peso, enquanto, em outros, a dissecação e limpeza das preparações devem ter sido, provavelmente, inadequadas. Juntamente com as imprecisões do método por diferença AV, todos esses fatores devem ter contribuído significativamente para a grande variação encontrada na obtenção do valor real do consumo de O_2 por parte dos corpos carotídeos, ainda sem um consenso.

Em suporte à idéia de “plasma skimming”, análises histológicas de amostras de tecidos de experimentos de decaimento da PO_2 com fluxo sanguíneo interrompido revelaram uma redução significativa de capilares com hemácias em comparação a corpos carotídeos normalmente perfundidos, sugerindo uma exclusão das hemácias durante a interrupção do fluxo (Acker, 1980). É importante salientar que em todos os trabalhos acima (exceto em Starlinger e Lübbers, 1976) foi observado que o consumo de O_2 nos corpos carotídeos é dependente da PO_2 do fluido de perfusão ou de superfusão.

1.5.6 A interação entre o O_2 e o CO_2 no controle da respiração

Como o fenômeno de “plasma skimming” ocorre em situações de hipóxia, pode-se afirmar que os corpos carotídeos estão praticamente expostos, o tempo todo, a tensões de O_2 similares àquela do sangue arterial, muito diferente dos tecidos em geral. Provavelmente, por conta disso, são sensores ideais para medir a quantidade de O_2 dissolvido no sangue, relacionada diretamente com a PaO_2 e conseqüentemente com a PAO_2 (Lahiri, 1980). Entretanto, para um efeito estimulatório máximo ao nível das células quimiorreceptoras carotídeas, há necessidade da combinação de hipóxia com a hipercapnia (Eyzaguirre e Lewin, 1961).

Por outro lado, a administração de O_2 abole o efeito estimulatório sobre os corpos carotídeos de um aumento da PCO_2 ou da $[H^+]$ arteriais (Downes e Lambertsen, 1966; Eyzaguirre e Lewin, op. cit.). De maneira análoga, foi observado que a atividade neural dos corpos carotídeos de gatos expostos a hipóxia isocápnica sofre uma queda acentuada, eventualmente abolida, com o abaixamento importante da $PaCO_2$, através de hiperventilação, para valores de 15mmHg ou menos (Fitzgerald e Lahiri, 1986). O fato de fibras isoladas do nervo do seio carotídeo transmitirem tanto impulsos estimulados por desvios da PCO_2 ou da $[H^+]$ quanto pela hipóxia sugere haver alguma etapa comum e convergente do processo de excitação das células quimiossensíveis, eventualmente um mecanismo comum de ativação (Lambertsen, 1978d). Esses dados sugerem a existência de interação entre o O_2 e o CO_2 , no mínimo, ao nível dos quimiorreceptores periféricos.

Desde o clássico estudo de Nielsen e Smith (1952), que observaram que o efeito estimulatório hipóxico sobre a ventilação de indivíduos acordados era aumentado pela hipercapnia moderada, diversos trabalhos realmente demonstraram a existência de interação entre o O_2 e o CO_2 sobre a respiração (Lloyd et al., 1958). Esses estudos mostraram que a inclinação da curva entre valores de $PaCO_2$ e volume-minuto respiratório

se acentua à medida que se diminuem os níveis de PO_2 alveolar, indicando a existência de uma interação positiva, ou multiplicativa (não apenas aditiva) entre a hipercapnia e a hipóxia, o efeito inverso ocorrendo em situações de hiperóxia. Com isso, várias pesquisas foram realizadas na tentativa de se explicar o mecanismo desse fenômeno e o local onde se daria essa interação, central ou periféricamente. Riedstra (1963), trabalhando com gatos anestesiados, procurou observar se o efeito tinha origem central ao perfundir separadamente áreas cerebrais e do seio carotídeo, concluindo que haveria interação positiva apenas ao nível dos quimiorreceptores periféricos. Ao passo que Lloyd (1966) concluiu que a interação entre O_2 e CO_2 sobre a ventilação no homem era maior que a demonstrada pela resposta quimiorreceptora carotídea do gato, formulando a hipótese de que o estímulo hipóxico multiplicava o estímulo da PCO_2 ou $[H^+]$ arteriais ao nível dos quimiorreceptores periféricos e a atividade final neural resultante era simplesmente adicionada à resposta central pelo CO_2 no controle da respiração.

Outros trabalhos também demonstraram a existência de interação entre o O_2 e o CO_2 na atividade dos quimiorreceptores carotídeos, mas em muitos deles a natureza da interação dos estímulos não pôde ser determinada devido às dificuldades técnicas. Mesmo assim, foi observado que a reatividade dos quimiorreceptores carotídeos *in situ* ou em preparações isoladas era exagerada quando da combinação de hipóxia com hipercapnia (Eyzaguirre e Lewin, 1961; Eyzaguirre e Koyano, 1965). Por outro lado, um aumento da PCO_2 em condições de hiperóxia não resultou em aumento considerável da descarga quimiorreceptora (Eyzaguirre e Lewin, op. cit.). Estudos posteriores de Fitzgerald e Parks (1971) e Lahiri e DeLaney (1975a), demonstraram que, de maneira similar à curva de ventilação, a inclinação da curva de resposta neural carotídea ao CO_2 também aumentava com a queda da PaO_2 . Fitzgerald e Parks (op. cit.) ainda observaram que a interação ocorria tanto em fibras nervosas isoladas como no nervo do seio carotídeo inteiro, mas havia uma considerável variabilidade na interação entre as fibras isoladas em níveis baixos de $PaCO_2$, diminuindo essa variabilidade sob normo ou hipercapnia. Posteriormente Lahiri e DeLaney (1975b) e Lahiri et al. (1978) mostraram que havia diferenças no limiar de excitação das diferentes fibras nervosas quimiorreceptoras carotídeas, concluindo que, ao menos no gato, a interação positiva dos estímulos do O_2 e do CO_2 , a nível periférico, era conseqüente tanto da resposta de uma única fibra como do recrutamento de várias delas, a limiares diferentes. Por isso, uma atividade máxima é encontrada na asfixia, dada a ausência de respiração, com queda da PO_2 e aumento da PCO_2 (Lambertsen, 1978d).

No entanto, Lahiri e DeLaney (1975b) ainda observaram que a interação sobre a resposta ventilatória também em gatos anestesiados nem sempre se mostrou positiva, mas naqueles animais em que a resposta mostrou interação multiplicativa, apenas a interação periférica não foi suficiente para explicar a resposta ventilatória total. Os autores concluíram, assim, que deveria haver:

a) uma interação multiplicativa dos estímulos PO_2 - PCO_2 ao nível dos quimiorreceptores periféricos; b) um limiar de estímulo PO_2 - PCO_2 para os quimiorreceptores carotídeos determinando qualquer possível recrutamento; c) uma interação multiplicativa entre a atividade quimiorreceptora periférica e a excitação central pelo CO_2 - H^+ ; d) a presença de um limiar central para a PCO_2 ; e) uma inibição central pela hipóxia.

Outros autores também obtiveram uma interação da resposta ventilatória de maneira sinérgica (multiplicativa) (Adams et al., 1978; Unger e Bouverot, 1980), enquanto Miller et al. (1974) obtiveram apenas uma interação aditiva. Cherniak et al. (1979), através do resfriamento focalizado e diferenciado de áreas quimiossensíveis centrais distintas também observaram apenas uma interação aditiva entre os quimiorreceptores centrais e periféricos. Por outro lado, alguns autores encontram uma relação negativa. Em gatos não anestesiados, Giese et al. (1978) encontraram uma interação freqüentemente negativa quando apenas um de seus corpos carotídeos foi perfundido com sangue hipóxico. Estes autores compararam as respostas a valores de PCO_2 de 30 e 60mmHg, sob as mesmas condições hipóxicas, mas não consideraram que um estímulo de 60mmHg de PCO_2 pode ter sido muito elevado, atingindo-se o máximo ventilatório desses animais. Além disso, quando se passa de uma situação de normocapnia para hipercapnia, os quimiorreceptores periféricos podem assumir cada vez menos importância na resposta ventilatória total, com os quimiorreceptores centrais assumindo um papel cada vez mais dominante (Lambertsen, 1978d). Dessa maneira, com valores elevados de PCO_2 , como no estudo acima, é possível que adicionar ou subtrair qualquer atividade quimiorreflexa periférica possa ter pouco ou nenhum efeito sobre a respiração, não fazendo a menor diferença (Fitzgerald e Lahiri, 1986). Outros trabalhos também concluíram a pouca contribuição dos quimiorreceptores periféricos no controle ventilatório em situações de $PaCO_2$ elevada, sendo que a máxima influência periférica ocorreu quando a hipóxia esteve associada à alcalose (Astrom, 1952; Lambertsen, 1987d). Por fim, outra explicação pode ser a presença de uma significativa atividade eferente direcionada aos quimiorreceptores carotídeos através do próprio nervo do seio

carotídeo, inibindo a atividade aferente em situações de elevada PaCO_2 (Fitzgerald e Lahiri, 1986).

Diferentemente, Schlaefke et al. (1979) observaram uma interação multiplicativa ao coagular uma área específica quimiossensível central denominada “S” (ou área intermediária quimiossensível do tronco cerebral) e comparar a resposta ventilatória de gatos controles, nos quais poderia haver interação entre os receptores centrais e periféricos e de gatos tratados, com a área central coagulada, pois a resposta à hipóxia nesses últimos foi a metade da observada nos controles. Fitzgerald et al. (1964), trabalhando com sangue hipercápnico-normóxico perfundindo ambos corpos carotídeos de gatos e Bellville et al. (1979), comparando indivíduos não anestesiados que tiveram seus corpos carotídeos ressecados em relação à indivíduos normais, também obtiveram interações positivas. Outros autores apontaram para o efeito depressivo da hipóxia e observaram experimentalmente em gatos que tanto a depressão central da sensibilidade ao CO_2 diminui com o aumento da atividade quimiorreceptora carotídea (Lee e Milhorn, 1975), quanto, na ausência de atividade periférica carotídea, os mecanismos centrais responsáveis pelo volume corrente (VT) encontram-se deprimidos, mesmo a níveis normais de PaO_2 , concluindo que nesses animais a atividade quimiorreflexa carotídea é essencial para manter níveis normais de ventilação (Miller e Tenney, 1975). O oposto foi observado em cães, onde se concluiu que apenas altos índices de hipóxia induzem à depressão respiratória, a qual não é influenciada pela hipo ou hipercapnia e muito pouco pela desnervação quimiorreceptora (Morrill et al., 1975). Sem dúvida, diferenças metodológicas e variações interespecíficas devem explicar, em parte, a variabilidade encontrada. Estudos posteriores tentaram esclarecer melhor esta questão, ao menos nos gatos, mas falharam, demonstrando haver provavelmente outros componentes não neurais envolvidos, como, por exemplo, a circulação cerebral e o estado acidobásico do meio circundante dos quimiorreceptores centrais, ambos influenciados pela PO_2 e PCO_2 . O fato é que até hoje a interação entre os quimiorreceptores centrais e periféricos permanece controversa e não esclarecida.

1.5.7 Outros fatores que influenciam a atividade quimiorreceptora carotídea

Além da interação entre os estímulos provenientes do O_2 e do CO_2 , a resposta respiratória reflexa está sujeita à influência de diversos outros fatores que indubitavelmente contribuem para a grande variabilidade da resposta observada. Esta

variabilidade pode ter origem em fatores atuando na gênese do impulso aferente ao nível dos quimiorreceptores periféricos; ao nível do tronco cerebral, modificando a integração da atividade neural e a resultante resposta reflexa efetora. E no aparelho efector respiratório, alterando a resposta mecânica final ou seus subcomponentes (volume, frequência, fluxo), de maneira que a resposta reflexa deve ser considerada como o produto de todos esses fatores agindo conjuntamente.

Dentre os fatores que afetam a origem do impulso periférico ao nível dos quimiorreceptores carotídeos, Fitzgerald e Lahiri (1986) destacam:

- Anestésicos: embora a maioria dos anestésicos exerça um efeito depressivo mais importante ao nível dos quimiorreceptores centrais, alguns agentes chegam a abolir a resposta neural carotídea à hipóxia, tanto no homem, como o halotano e o óxido nítrico, quanto em animais, como o halotano, clorobutanol, paraldeído e uretano. Enquanto outros apenas a diminuem, como o thiopental, ou mesmo intensificam a resposta, como é o caso do éter. Em todos os casos, a resposta à hipercapnia apresenta-se intacta ou bem menos atenuada.
- A digoxina em cães e a progesterona no homem demonstraram um aumento na quimiossensibilidade, ao passo que a dopamina normalmente provoca uma inibição ventilatória em seres humanos acordados e na atividade neural carotídea medida em gatos, coelhos e cães não anestesiados. Mas em doses elevadas, acima de 300µg, demonstrou efeito excitatório em animais.
- Outras aferências periféricas: Alguns estudos mostraram que não só os impulsos aferentes químicos, mas também outras aferências, principalmente vagais, dos receptores de estiramento pulmonar seriam importantes na manutenção da resposta ventilatória, pois em cães, ao serem abolidas por bloqueio vagal, a ventilação espontânea praticamente cessou (Sullivan et al., 1978).
- Fatores físicos: temperatura e osmolaridade são fatores que reconhecidamente estimulam os quimiorreceptores carotídeos. Gallego et al. (1979) constataram um aumento significativo da atividade quimiorreceptora carotídea tanto com a elevação da temperatura quanto com um aumento da osmolaridade sanguínea.
- Pressão arterial: Heath (1991) faz menção de um possível efeito barorreceptor por parte dos corpos carotídeos, tendo em vista a provável presença de

tensorreceptores em seus vasos, além da constatação de que uma parcela das fibras que inervariam os vasos sanguíneos carotídeos através do NSC seriam aferentes, possivelmente barorreceptoras (Fidone e Gonzalez, 1986). Por outro lado, apenas a hipotensão severa, como já discutido, com valores da PA abaixo de 60mmHg provocou estimulação da atividade carotídea (Lahiri, 1980), de maneira que uma possível função barorreceptora por parte dos corpos carotídeos ainda é discutível.

- Fatores ambientais: indivíduos sujeitos à hipóxia crônica decorrentes de patologias diversas ou residentes em altitude elevadas, que apresentam invariavelmente um aumento de volume e peso dos corpos carotídeos, podem apresentar uma resposta atenuada à hipóxia, embora os resultados sejam controversos (Vinhaes, 1998).

Para os autores, além desses fatores, o meio extracelular que circunda os neurônios responsáveis pelo controle respiratório central ao nível do tronco cerebral, sobretudo nos centros inspiratório e expiratório bulbares, nos centros pneumotácico e apnêustico da formação reticular pontina, nos núcleos ambíguos, retro-ambíguos e do trato solitário, tem papel fundamental na resposta final ventilatória. Portanto, para eles, o estado de oxigenação e as condições do equilíbrio acidobásico local nessas regiões, a temperatura, a ação de anestésicos, bem como as influências superiores, voluntárias ou durante o sono, constituem fatores fundamentais no efetivo controle da respiração, mas sua abordagem não faz parte do escopo desta obra e não serão aqui analisados.

1.6 O PAPEL DOS QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS

Como a maioria das pesquisas aponta para uma influência provável entre 10 a 14% sobre a ventilação de repouso, evidentemente os quimiorreceptores periféricos não são os responsáveis diretos pelo controle ventilatório. Já foi observado em experimentos animais, em que houve administração de CO₂ antes e depois da inervação quimiorreceptora (Astrom, 1952), que os mesmos não são essenciais para a estimulação da respiração, embora possam ser necessários para a manutenção de níveis normais de ventilação, ao menos em gatos (Miller e Tenney, 1975). Além disso, foi verificado que tanto o componente mais rápido da resposta respiratória ao CO₂, de origem quimioreflexa, parece contribuir com uma fração praticamente constante de resposta ventilatória global a

níveis diferentes de PCO_2 inspirada, quanto a influência dos quimiorreceptores é maior a baixos do que a altos níveis de PCO_2 (Astrom, 1952). Esses resultados indicam, portanto, que um aumento da PCO_2 ou $[\text{H}^+]$ arteriais provoca um aumento na descarga dos quimiorreceptores sobre os centros, que por sua vez produz uma proporção fixa ou decrescente do estímulo global devido ao CO_2 (Lambertsen, 1978d).

Entretanto, sua característica de resposta, com curta latência, aproximadamente 3 a 4s, menor que o tempo de circulação sanguínea pulmão-cérebro e baixa constante de tempo, entre 4 e 7s, ou seja, elevada velocidade de reação a desvios tanto do CO_2 quanto do O_2 , permite que possam influenciar qualquer movimento ventilatório. Embora pequena, a contribuição quimiorreflexa existe, mesmo que o estímulo seja proveniente de alterações da PaCO_2 , podendo ser facilmente comprovada pelo deslocamento para a direita da curva de resposta ao CO_2 (curva-resposta $V_E \times \text{PaCO}_2$) em gatos submetidos a deservação quimiorreceptora carotídea (Lambertsen, 1978d).

Mais que isso, esses receptores continuam a responder à ausência total de O_2 , à hipercapnia elevada ou à queda do pH a valores ao redor de 6,5, todas situações que deprimem acentuadamente as células quimiossensíveis do centro respiratório (Comroe e Schmidt, 1938; Lambertsen, 1978c). Por conta desses fatos atribui-se hoje, basicamente, três funções aos quimiorreceptores periféricos no controle ventilatório (Lambertsen, 1978c; West, 1991). Em primeiro lugar, permitem um ajuste fino e rápido a flutuações da composição gasosa do sangue arterial, reflexo direto da composição do ar alveolar respirado. Também são responsáveis pela manutenção da respiração em situações de depressão dos centros respiratórios, mantendo os neurônios inspiratórios em estado de atividade funcional. Por fim, respondem sozinhos pela proteção eficiente do organismo a quedas acentuadas da concentração de O_2 do ar inspirado, uma vez que os centros respiratórios não respondem à hipóxia.

A contribuição real dos quimiorreceptores periféricos, em particular dos corpos carotídeos, no controle da respiração, pode ter sido subestimada inicialmente pelo fato das alterações ventilatórias induzirem a alterações concomitantes da PO_2 , PCO_2 e do pH, tanto no sangue arterial quanto no meio circundante das células quimiossensíveis do SNC. Ao passo que os quimiorreceptores periféricos, quando submetidos a variações experimentais da PO_2 ou da PCO_2 do sangue que os perfunde, emitem sinais que levarão a respostas reflexas respiratórias que provocarão alterações opostas da PO_2 ou da PCO_2 no sangue que perfunde os centros respiratórios, minimizando as respostas reflexas desencadeadas perifericamente (Lambertsen, 1978d). Além disso, em virtude de

possuírem um alto fluxo sanguíneo (West, 1991), estão expostos, normalmente, a condições acidobásicas e de oxigenação muito próximas, senão idênticas, as mesmas do sangue arterial (Lahiri, 1980). Enquanto isso, os centros respiratórios estão imersos num fluido extracelular com condições de PO_2 , PCO_2 e pH muito diferentes, próximas do sangue periférico que os perfunde. Dessa forma, as condições do meio circundante ao nível do SNC são determinantes no grau da resposta ventilatória, bem como na modulação dos impulsos aferentes reflexos periféricos (Fitzgerald e Lahiri, 1986).

1.7 EFEITOS FISIOLÓGICOS DA INALAÇÃO DE O_2 SOBRE A RESPIRAÇÃO

Em virtude da hipóxia induzir um aumento da ventilação por meio de mecanismos reflexos originados nos quimiorreceptores periféricos, seria lógico imaginar que a inalação a altas concentrações de O_2 tivesse efeito contrário. Em doses elevadas de O_2 , porém não tóxicas, realmente se observa uma queda transitória da ventilação tanto no homem quanto em animais em repouso (Leitner et al., 1965). Essa queda é melhor visualizada pelo teste de O_2 , que consiste em, no máximo, 3 respirações consecutivas de misturas ricas em O_2 , analisando-se a resposta desencadeada, quimiorreceptora e ventilatória (Dejours, 1962). Em gatos, foi observado que ambas respostas apresentam queda, sendo que a diminuição da ventilação mostra um curso temporal muito semelhante à depressão da frequência de descarga quimiorreceptora, uma indicação de que a inibição ventilatória ocorre por mecanismos quimiorreflexos (Leitner et al., op. cit.)

Entretanto, se a exposição ao O_2 se prolongar por vários minutos, a ventilação aumenta acima do nível controle (Lambertsen et al., 1963). Esse fato é provavelmente decorrente do aumento da acidez central, proveniente da diminuição da disponibilidade de hemoglobina reduzida, uma vez que com o aumento do O_2 fisicamente dissolvido há uma queda da liberação de O_2 da Hb e aumento da quantidade de HbO_2 , interferindo com a liberação de grupos alcalinos da Hb nos capilares tissulares em geral e conseqüentemente menos CO_2 é transportado ligado à Hb reduzida (Gesell, 1923; Bean, 1931). Isso ocasiona um transporte de CO_2 menos eficiente. Haverá um aumento da sua fração dissolvida no sangue, com elevação da PCO_2 venosa e tissular em todo organismo, o que, a nível central, provoca uma estimulação ventilatória (Dejours, op. cit.). Esta, por sua vez, irá se contrapor à inibição ventilatória desencadeada tanto pelo efeito inibitório da hiperóxia sobre os quimiorreceptores periféricos, quanto a provável interação negativa

entre o excesso de O_2 e a resposta ao CO_2 (Lahiri e DeLaney, 1975b). Miller e Tenney (1975) observaram que o efeito estimulatório da hiperóxia é acentuado com a secção dos nervos do seio carotídeo. Mesmo assim predomina o estímulo ventilatório central hipercapneico, resultando numa hipocapnia arterial, a qual também tende a limitar a resposta respiratória (Dejours, 1962; Lambertsen, 1978d). Por outro lado, a hiperóxia provoca na circulação cerebral efeitos opostos ao da hipóxia e se observa uma vasoconstrição no lado arterial dos vasos cerebrais que tende a ser aumentado pela queda da $PaCO_2$, ambos majorando a hipercapnia tissular e contribuindo para o aumento da PCO_2 central (Ungar e Bouverot, 1980).

Recente trabalho de Floyd et al. (2003) comprovou o efeito vasoconstrictor da hiperóxia a 1 ATA ao nível da circulação cerebral em indivíduos normais, independentemente do efeito similar provocado pela hipocapnia arterial, reduzindo o fluxo sanguíneo cerebral em 28,7 e 32,6%, respectivamente. O resultado final é um aumento da ventilação, não tão intenso quanto poderia ser, associado a uma queda local do pH e aumento do CO_2 tissular, que faz com que a hiperóxia seja um bom modelo para o estudo de uma situação de hipercapnia central com hipocapnia arterial (Lambertsen, op. cit.).

Ambas metodologias, teste de O_2 e respiração hiperóxica prolongada, foram empregadas na busca de se determinar a real contribuição dos quimiorreceptores periféricos sobre o controle da respiração e evidentemente os resultados foram conflitantes. Por conta dos efeitos estimulatórios da hiperóxia sustentada, esta metodologia não produz resultados significativos quanto à contribuição quimiorreceptora, ao passo que os testes dinâmicos transientes são menos contaminados, revelando uma diminuição da ventilação em seres humanos (Dejours, op. cit.; Downes e Lambertsen, 1966), em cães (Bouverot et al., 1965) e em gatos (Lahiri e DeLaney, 1975b). Nestes, a inalação de 100% de O_2 em animais anestesiados, provocou uma queda súbita da atividade quimiorreceptora até zero de atividade, normalmente seguida de apnéia, que por sua vez fez aumentar a PCO_2 e cair a PO_2 , estimulando novamente os corpos carotídeos e, por conseguinte, a respiração. Esses efeitos foram nitidamente observáveis quando a $PaCO_2$ encontrava-se normal ou baixa, mas não o foram a níveis elevados de $PaCO_2$.

Por fim, como já discutido, a interação entre o O_2 e o CO_2 faz com que a hiperóxia interfira com a reatividade ao CO_2 , diminuindo-a (Lambertsen et al., 1963)

Portanto, a respiração de oxigênio, em doses não tóxicas, induz três respostas fisiológicas a nível respiratório:

- Inibição transitória da ventilação, pela diminuição da atividade quimiorreflexa.

- Estimulação respiratória, indiretamente, pelo aumento da PCO_2 tissular central.
- Diminuição da resposta ventilatória ao CO_2 .

Desses, tanto a estimulação respiratória quanto a diminuição da reatividade ao CO_2 aumentam progressivamente até um máximo, correspondente a uma PO_2 inspirada entre 3,5 a 4 ATA (Shaw et al., 1934; Basset e Bennet, 1977). Aumentos superiores da PO_2 não causam alterações adicionais dessas respostas fisiológicas. Isso se deve ao fato do aumento da PCO_2 central, provocada pelo excesso de O_2 , atingir, no máximo, um valor correspondente ao que poderia ser transportado pela Hb, caso a mesma estivesse disponível. Uma vez completamente saturada e com O_2 dissolvido em quantidade suficiente para satisfazer todas as necessidades metabólicas, ou seja, aproximadamente 6vol%/min em repouso, normalmente atingido já a 3 ATA, toda Hb estará impossibilitada de se ligar ao CO_2 (Basset e Bennet, op cit.). Isso só irá interferir com a parcela de CO_2 que deveria ser transportada pela Hb, ao redor de 30%, que atinge um máximo proporcional à concentração da própria Hb (Lambertsen, 1978b). Medidas no sangue venoso jugular misto em cães e no homem mostraram um aumento de 7,5 e 8mmHg na pressão venosa de CO_2 ($PvCO_2$) na vigência de OHB a 4 e 3,5 ATA, respectivamente, correspondendo a uma queda de quase dois terços da capacidade tamponante da hemoglobina (Shaw et al., 1934; Lambertsen et al., 1953). Todo o restante de CO_2 já iria ser transportado pelo plasma e não sofre influência alguma, mesmo que se aumente a PO_2 inspirada. Por outro lado, não se sabe se a diminuição da resposta ao CO_2 se relaciona com a inativação dos quimiorreceptores periféricos ou com a ação central de uma elevada PO_2 tecidual local (Lahiri e DeLaney, 1975b; Fitzgerald e Lahiri, 1986).

1.7.1 Diferenças entre efeitos fisiológicos e efeitos patológicos

Enquanto as alterações fisiológicas provocadas pela atuação de um determinado estímulo forem toleradas pelo organismo, as respostas adaptativas compensatórias evocadas serão absolutamente reversíveis. Uma vez ultrapassados os limites de compensação, lesões patológicas desenvolver-se-ão (Cotran et al., 1999). Assim, devem-se separar os efeitos tóxicos do oxigênio, em última instância letais, dos seus efeitos fisiológicos. Estes tendem a aparecer rapidamente, coincidindo com a elevação da PO_2 na área afetada, bem como uma reversão também rápida e completa tão logo haja retorno da PO_2 aos níveis normais. Conseqüentemente, não causam risco de morte, nem impõem limitações significativas ao uso do oxigênio a altas pressões (Clark e Lambertsen, 1971a).

Contrariamente, os efeitos tóxicos costumam manifestar-se depois de decorrido algum tempo de exposição ao oxigênio, cuja latência será tanto menor quanto maior for PO_2 empregada. Além do que, a recuperação completa dos efeitos reversíveis pode levar dias ou semanas no caso dos pulmões (Caldwell et al., 1966), embora nem sempre seja possível, caso efeitos irreversíveis já tenham sido instalados, como a evolução da lesão pulmonar para fibrose (Clark e Lambertsen, 1971a).

1.8 A INTOXICAÇÃO PELO OXIGÊNIO

“Morremos pelo que nos mantém vivos!”

Grande paradoxo da biologia dos seres vivos aeróbicos, o oxigênio, como substância essencial à manutenção da vida desses seres, também é o responsável direto pelo seu desgaste natural, com conseqüente envelhecimento e morte. Sem ele fatalmente morremos, mas sua presença induz a uma série de reações químicas que apesar de estritamente necessárias à produção adequada de energia para suprir os inúmeros processos metabólicos essenciais à vida aeróbica, são reações de combustão, de queima, de oxidação, que obrigatoriamente produz metabólitos deletérios, os quais ocasionam, em última análise, a morte celular se não combatidos (Fridovich, 1978). Viver aerobicamente significa balancear constantemente esses dois processos: produzir energia com o auxílio do oxigênio, mas combater ao mesmo tempo os restos desta produção.

A intoxicação pelo oxigênio é um processo progressivo que pode ser esperado ocorrer em todas as células do organismo expostas a concentrações elevadas de oxigênio (Clark e Lambertsen, op. cit.). Nesse processo, deve-se esperar pela ocorrência de efeitos adversos, cuja ordem de aparecimento nos diferentes tipos celulares dependerá das diferentes suscetibilidades de cada tipo celular, bem como das diferentes doses de O_2 empregadas, seja pela duração da exposição, seja pelas diferentes pressões de O_2 , que ainda podem ser modificados pela influência de vários fatores atuando sobre a taxa de desenvolvimento da intoxicação pelo oxigênio (Bean, 1965). Portanto, a ausência de alterações morfológicas demonstráveis num determinado grupo específico de células não deve significar uma imunidade das mesmas, pois, com o decorrer do processo, inevitavelmente haverá evolução para a destruição celular (Clark e Lambertsen, op. cit.).

Na faixa de pressão e tempo de exposição normalmente empregados em oxigenoterapia normo ou hiperbárica, os órgãos mais atingidos são os pulmões e o SNC (Clark e Lambertsen, 1971a). Isso se explica pelas características da intoxicação pelo oxigênio, descritas adiante. Exposições acima de 0,5 ATA são suscetíveis de causar lesão pulmonar hiperóxica (Clark e Fisher, 1977). No caso do SNC, as primeiras manifestações neurológicas ocorrem apenas a pressões parciais de oxigênio acima de 2,0 ATA, cuja vulnerabilidade individual das células neuronais, em conjunto com o elevado suprimento sanguíneo tecidual e altas taxas metabólicas o tornariam também um alvo importante da toxicidade ao oxigênio (Donald, 1947a,b; De Martino et al., 1996).

Estudos com indivíduos voluntários a 2,0 ATA permitiram elucidar a evolução clínica e alterações funcionais da intoxicação pulmonar (Clark e Lambertsen, 1971b). Os primeiros sintomas aparecem entre 2 e 6 horas e consistem de irritação traqueal e dor retroesternal. Uma a duas horas após sobrevém a tosse. Sintomas mais graves como dispnéia e tosse paroxística aparecem somente após 8 a 10 horas de exposição contínua, associados a hipertermia e roncos difusos à ausculta. Sinais funcionais que acompanham a sintomatologia consistem de diminuição da complacência pulmonar dinâmica, da capacidade inspiratória, do volume de reserva inspiratório, da capacidade de difusão ao monóxido de carbono e principalmente da capacidade vital (CV), que, para os autores, constitui-se no melhor índice de intoxicação pulmonar. Eles observaram, ainda, uma correlação entre os sinais clínicos e a diminuição da capacidade vital, obtendo uma sequência de curvas hiperbólicas que lhes permitiram estabelecer índices de tolerância pulmonar ao oxigênio, avaliados pela diminuição da CV em função da pressão parcial e do tempo de exposição ao gás (dose). Diminuições de até 15% da CV são reversíveis e ocorrem entre 6 e 11 horas de exposição. Mesmo assim, após uma exposição aguda, mas suficiente para causar edema intersticial e intralveolar e diminuição da capacidade vital, ou principalmente em exposições com doses mais elevadas, com diminuição da capacidade de difusão alveolar-arterial, algo indicativo de uma maior gravidade, o retorno ao ar atmosférico muitas vezes se dá de maneira difícil (Bean e Johnson, 1952). Frequentemente se observa a presença de dispnéia, em virtude da diminuição provável da ventilação e de um gradiente de difusão insuficiente durante a respiração novamente com ar (Bean e Johnson, op. cit.). Mas também pela possibilidade da ocorrência de alterações enzimáticas intracelulares irreversíveis provocadas pelo excesso de oxigênio e produção de radicais livres (Clark, 1993).

1.8.1 Histórico

Henshaw (1662) apud Behnke (1977) foi o pioneiro no uso de câmaras que pudessem aumentar a pressão no seu interior com fins terapêuticos, embora na época o oxigênio ainda não havia sido descoberto. Cabe a Priestley (1775) apud Oriani et al. (1996) os louros pela descoberta desse gás, mas ele próprio já alertava sobre os riscos do que denominou de “ar puro”:

“It might not be so proper for us in the usual healthy state of body; for as a candle burns out much faster in dephlogisticated air than in common air, so we might, as may be said, live out too fast and the animal powers be too soon exhausted in this pure kind of air”

Lavoisier (1778) apud Wattel (1990) confirmou as impressões de Priestley ao afirmar que a atmosfera terrestre continha substâncias necessárias à vida animal na Terra, mas ao mesmo tempo foi o primeiro a salientar possíveis efeitos tóxicos do oxigênio em seus experimentos com cobaias.

No entanto, a utilização do oxigênio a elevadas pressões parciais com fins terapêuticos só foi inicialmente visualizada por Paul Bert que, em 1878, publicou seu famoso trabalho intitulado “La Pression Barométrique”, onde delineava as primeiras bases fisiológicas da oxigenoterapia hiperbárica, mas também alertava sobre o risco da toxicidade pelo oxigênio ao nível do sistema nervoso central. Lorrain-Smith, em 1899, ao tentar determinar o menor nível de hiperóxia suficiente para produzir o efeito Paul Bert em ratos, descobriu a ocorrência de manifestações pulmonares, sobretudo de uma dispnéia progressiva levando à morte na ausência de sintomas neurológicos, após exposições contínuas a pressões parciais de O_2 entre 0,47 e 3,6 ATA. Classicamente a intoxicação do SNC e dos pulmões foi denominada de efeito Paul Bert e efeito Lorrain-Smith, respectivamente, em homenagem aos seus descobridores.

Em 1933 ocorre a primeira exposição experimental com O_2 a 4 ATA em voluntários homens. Treze e 16 min após, dois indivíduos apresentam fasciculação de músculos faciais seguido de convulsão tipo grande mal em um e síncope no outro (Behnke et al., 1935).

Seguiu-se então um período de aplicações da OHB indiscriminadamente e sem bases científicas, o que fez com que o método se tornasse desacreditado pela classe

médica e caísse no esquecimento (Barois, 1966; Wattel, 1990; Iazzetti, 1992). A partir do trabalho de Penrod (1956) foram confirmadas que as alterações morfológicas evidentes a nível pulmonar eram realmente provocadas pela exposição ao oxigênio. Quase nessa época Chance e Willians (1956) demonstravam que 1 a 2% do consumo de oxigênio mitocondrial eram transformados em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas foi Gerschman, em 1954, o primeiro a levantar a hipótese da intoxicação pelo oxigênio poder ser causada pelas espécies reativas do oxigênio (EROS), baseado em seus estudos de radioatividade.

O advento da ventilação mecânica e a utilização de câmaras hiperbáricas permitiram não só que o efeito tóxico do O_2 se tornasse bastante evidente, mas também se admitir que pressões parciais de O_2 até 0,5 ATA não produzam qualquer efeito tóxico o que atualmente é considerado o limite para o uso do oxigênio sem restrição quanto ao tempo de exposição (Clark e Fisher, 1977, De Martino et al., 1996). Somente no início da década de 60, com os trabalhos de Boerema *et al.* (1959) e Brummelkamp *et al.* (1961) é que a oxigenoterapia hiperbárica tem um novo recrudescimento sendo realizados os primeiros simpósios sobre OHB, promovidos pela Academia de Ciências de Nova Iorque. Em 1967 foi fundada a Undersea Medical Society com sede nos Estados Unidos (Behnke, 1977) e em 1976 a executiva desta sociedade criou o Comitê Permanente de Oxigenoterapia Hiperbárica a fim de supervisionar os aspectos fisiológicos, experimentais e clínicos da sua utilização, trazendo um grande impulso ao desenvolvimento do setor nos EUA (Behnke, op. cit.). Em 1987, Lahiri e co-autores são os primeiros a descrever a perda da resposta ventilatória à hipóxia por parte dos corpos carotídeos de gatos expostos à respiração prolongada de O_2 puro na pressão atmosférica (1 ATA).

1.8.2 Fatores que influenciam a toxicidade do O_2

A característica principal da intoxicação pelo O_2 é sua dependência direta de dois fatores, que somados configuram a dose de O_2 empregada. São eles a concentração de O_2 nos tecidos, correspondente a sua pressão parcial local e o tempo de exposição a essa concentração de O_2 (De Martino et al., op. cit.), os quais possuem praticamente uma relação hiperbólica retangular típica entre si, na qual quanto maior a pressão de O_2 empregada, menor o tempo necessário para que apareçam sinais de intoxicação (Bean, 1965; Clark e Fisher, op. cit.). Não só a taxa de mortalidade (Gerschman et al., 1958; Jamieson, 1966), mas inúmeras manifestações de intoxicação, como hemólise (Goldstein e Mengel, 1969), aparecimento de convulsões (Behnke et al., 1935; Donald, 1947a,b),

lesão pulmonar histológica (Clark e Lambertsen, 1971a), diminuição da capacidade vital (Welch, 1963) demonstraram ter uma esse tipo de relação. Além desses, outros fatores também influenciam a toxicidade do O_2 , sobretudo a suscetibilidade particular de cada indivíduo, tecido ou célula (Bean, 1965; Clark, 1993).

A pressão parcial local de O_2 , por sua vez, é determinada pela pressão parcial do gás que efetivamente atingirá os tecidos e o gradiente de difusão existente, os quais dependem da oferta do O_2 aos tecidos que está diretamente relacionada à capacidade de transporte de O_2 pelo sangue e à pressão de O_2 inspirada, ambas determinando o conteúdo arterial de O_2 (Clark e Fisher, 1977). Mas também do fluxo sanguíneo que atinge cada órgão ou tecido individualmente, o qual depende da pressão de perfusão que é determinada não só pela pressão arterial sistêmica, mas também pela resistência vascular sistêmica periférica (RVS) (De Martino et al., 1996). Por outro lado, a estrutura vascular do órgão ou tecido em questão, sua densidade capilar, sobretudo a densidade capilar funcional (ou da quantidade de capilares efetivamente perfundidos) também são fatores importantes na determinação do fluxo sanguíneo tecidual. (Acker, 1980; Clark, op. cit.). Além disso, tanto a densidade capilar funcional como a resistência vascular periférica são influenciadas por mecanismos neuro-humorais, hormonais e de autorregulação intrínseca (Bean, op. cit.; Bauer et al., 1990). Como a densidade capilar anatômica, i.e., número de capilares por unidade de volume de tecido, nem sempre fornece uma idéia real da cobertura da perfusão do tecido em questão, pois não traz valores do calibre desses vasos, nem da sua relação superfície-volume, muitas vezes em estudos morfométricos, esse índice da estrutura vascular é substituído pelo volume capilar relativo e pela área relativa de superfície capilar, ambos relacionados a uma unidade de volume e área conhecida do órgão em estudo, respectivamente.

No entanto, além da oferta efetiva de O_2 aos tecidos, a intoxicação pelo oxigênio também depende da quantidade de O_2 consumida por esse tecido, ou seja, da sua taxa metabólica, que ainda influenciará a densidade capilar funcional, pois existe uma relação estreita entre a taxa metabólica atualmente sendo desenvolvida pelo tecido e o fluxo sanguíneo que atinge o tecido neste instante, e, portanto, variável (Guyton, 2000). Com isso, qualquer fator que influencie o metabolismo também terá influência direta sobre a intoxicação pelo oxigênio. Dessa forma, o estado metabólico do indivíduo, a presença de substâncias estimulantes ou depressoras do metabolismo, de agentes anestésicos ou do CO_2 , a taxa metabólica individual de cada tecido, bem como a participação do sistema

neuroendócrino, todos constituem fatores importantes, muitas vezes determinantes da presença ou não de intoxicação clínica do O₂ (Bean, 1965).

Em resumo, ao procedermos à utilização do oxigênio como instrumento terapêutico ou, ao analisarmos seus possíveis efeitos tóxicos, temos que considerar:

- a pressão parcial de O₂ utilizada;
- o tempo de exposição ao O₂;
- a capacidade de transporte de O₂ pelo sangue, sobretudo o hematócrito e a concentração de hemoglobina;
- a pressão arterial sistêmica;
- a taxa de perfusão relativa ao órgão sendo avaliado, ou seu fluxo sanguíneo relativo;
- a taxa metabólica individual referente ao tecido;
- a presença de fatores que afetem o metabolismo individual de cada órgão ou do indivíduo como um todo, seu estado emocional ou a presença de patologias.

1.8.3 A suscetibilidade individual

Comprovadamente, existe uma diferença interespecífica frente à suscetibilidade à intoxicação pelo oxigênio, que pode ser facilmente demonstrada pela grande variação nos tempos de sobrevivência das espécies à exposição ao O₂ a 1 ATA. Cães, por exemplo, têm uma média de sobrevivência de 39 horas (Clark e Lambertsen, 1971a), embora outros autores tenham obtido uma média de 88 horas (Harabin et al., 1984). Ao passo que, para os sapos, esse tempo sobe para acima de 1600 horas, enquanto nos ratos estaria em torno de 72 horas, mas variando entre 57 e 81 horas para ratos adultos com peso médio de 250g (Clark e Lambertsen, op. cit.). Da mesma forma, a suscetibilidade variada ocorre ao nível dos indivíduos da mesma espécie, dos diferentes órgãos de um mesmo indivíduo, entre tecidos diferentes de um mesmo órgão e ao nível das diferentes células de um mesmo tecido. Evidentemente, todas as células de um organismo respirando concentrações elevadas de oxigênio estarão expostas, em maior ou menor grau, ao excesso de O₂ e, portanto, passíveis de serem intoxicadas. Considerando a imposição dos fatores acima mencionados, pode-se esperar que os diferentes órgãos venham a ter suscetibilidades diferentes.

Foi comprovado que o SNC apresenta maior suscetibilidade em relação aos demais órgãos, como coração, fígado e rins o que o torna sensível às tensões elevadas de oxigênio (Stadie et al., 1945a,b; Dickens, 1946; MacDougall e Coupland, 1967). Também, dentro de um mesmo órgão, verificam-se suscetibilidades diferentes entre os diferentes tipos celulares. É o caso do pulmão, em que, curiosamente, são as células endoteliais (e não as epiteliais) as mais sensíveis à intoxicação ao O_2 , sendo lesadas funcional e estruturalmente antes das demais (Clark e Lambertsen, 1971a; Harabin et al. 1984). Similarmente, ambos pneumócitos reagem de maneira diferente à exposição intensa ao oxigênio, pois enquanto o tipo I demonstra maior suscetibilidade à intoxicação, chegando à morte da célula, o tipo II responde normalmente com hipertrofia e hiperplasia, como uma resposta do epitélio alveolar na tentativa de recompor o revestimento alveolar lesado (Clark e Lambertsen, op. cit.). Tais diferenças na suscetibilidade entre os diversos tipos celulares parecem estar relacionadas com a maquinaria enzimática específica de cada célula, dos prováveis sítios de formação de espécies reativas do oxigênio (EROS), bem como à capacidade de defesa antioxidante inerente a cada uma delas (Clark, 1993). Ainda, entre células de um mesmo tecido, aquelas que tiverem próximas da extremidade arterial do capilar receberão uma dose mais alta de oxigênio em relação àquelas situadas na extremidade venosa e, com certeza, estarão mais sujeitas à intoxicação (Clark, op. cit.).

Dessa forma, podem-se esperar reações diferenciadas entre os órgãos de um mesmo indivíduo exposto a concentrações aumentadas de O_2 . Na realidade, sabe-se hoje que, a não ser pela presença dos sistemas antioxidantes que evoluíram em conjunto com a evolução natural biológica dos seres vivos, a vida em condições aeróbicas não seria possível, pois mesmo a concentração normal de O_2 ao nível do mar, ao redor de 21%, seria extremamente tóxica e incompatível com a vida (Fridovich, 1978). Nesse contexto, é compreensível que os órgãos mais afetados pela intoxicação ao oxigênio sejam os pulmões e o SNC, os primeiros por estarem expostos diretamente às doses mais elevadas de oxigênio e o SNC, pela elevada suscetibilidade individual das células nervosas, como já frisado. Entretanto, já foram relatados efeitos tóxicos do O_2 também nas hemácias, causando hemólise (Goldstein e Mengel, 1969), no aparelho visual levando à diminuição do campo visual, ao descolamento e destruição de células da retina e cegueira (Nichols e Lambertsen, 1969; Clark, op. cit.); no músculo cardíaco e esquelético (Caufield et al., 1972), no fígado (Schaffner e Felig, 1965), nos rins (Hess e Menzel, 1971), em todos com lesão celular; nos testículos, com diminuição da espermatogênese

(Almeida, 1934) e mais recente ao nível dos corpos carotídeos, com perda da resposta ventilatória à hipóxia (Lahiri et al. 1987; Arieli et al., 1988; Torbati et al., 1989; Liberzon et al. 1989; Gelfand et al., 1998), além de aumento do volume da hipófise (Bean, 1945), da tireóide (Edström e Röckert, 1962) e das supra-renais (Bean, 1945; Edström e Röckert, op. cit.). Apesar de ter uma elevada taxa metabólica, mas ao mesmo tempo possuir mecanismos locais de autorregulação do fluxo sanguíneo poderosos, a intoxicação clínica do SNC só se manifesta acima de um limiar de tensão arterial de 2,0 ATA de O₂. Até atingir esse limite, os pulmões são os órgãos principalmente afetados (Clark e Fisher, 1977; Clark 1993). Em ambos os casos, a continuidade da exposição ao O₂, na presença de sintomatologia clínica de intoxicação, levará o indivíduo indubitavelmente à morte (Clark e Lambertsen, 1971a).

A idade também é um fator importante na suscetibilidade aos efeitos tóxicos do O₂ e indivíduos jovens são menos suscetíveis (Bean, 1965). Camundongos expostos a 2, 4 e 6 ATA de O₂ mostraram uma consistente redução do tempo de sobrevida entre 20 e 90 dias de idade (Berry et al., 1977), enquanto ratos imaturos não apresentaram convulsões até 18 dias em oxigênio a alta pressão, provavelmente devido à imaturidade das glândulas supra-renais (Bean, 1965). Em outros estudos, os pulmões de ratos imaturos também se mostraram mais resistentes, embora não totalmente imunes à intoxicação pelo oxigênio; em contrapartida, esses animais apresentaram fibroplasia retrolental, assim como camundongos (Patz, 1957; Sperling, 1970). Nessa enfermidade vascular, o estímulo hipóxico para proliferação normal dos vasos sanguíneos da retina é abolido na vigência da oxigenoterapia. No retorno à pressão atmosférica, no entanto, a queda relativa da pressão de O₂ funciona como potente estímulo hipóxico, provocando uma neovascularização importante ao nível da retina que pode levar a cegueira permanente (De Martino et al., 1996). Com o advento da maturidade há uma inversão dessa relação e a retina torna-se mais resistente à intoxicação pelo oxigênio, ao passo que os pulmões tornam-se mais vulneráveis (Bean, 1965). Entretanto, a retina de animais adultos não é totalmente isenta de intoxicação e foi observado que uma permanente perda parcial da visão acompanha quadros de paralisia motora permanente em ratos e frangos expostos repetidamente ao O₂ a 65psi (~ 4,5ATA) (Bean, 1945). Exposições a altas pressões de O₂ também provocaram distúrbios visuais severos, embora não permanentes, no homem (Clark, 1993).

Em relação ao sexo, as fêmeas parecem mais tolerantes à exposição ao oxigênio. Wood et al. (1966) e Berry et al. (op. cit.) observaram um maior tempo de sobrevida das

fêmeas de ratos expostas a 75psi (5 ATA) e de camundongos expostas a 2, 4 e 6 ATA, respectivamente. Nesse último estudo, tanto fêmeas em idade pré-puberal quanto sexualmente maduras foram mais resistentes que seus semelhantes machos, indicando que a presença de esteróides gonadais diferentes não seria a causa da diferença de suscetibilidade entre os sexos. Entretanto, Troy e Ford (1972) observaram não só que as fêmeas de ratos expostas a 5 ATA de O₂ apresentaram um tempo maior de latência ao aparecimento de convulsões, como também a administração de estradiol subcutâneo aos machos adrenalectomizados dobrou suas resistências a convulsões.

Por outro lado, indivíduos da mesma espécie, sexo e idade, expostos conjuntamente a mesma concentração de O₂, poderão reagir de forma diferente aos efeitos tóxicos do oxigênio. Por exemplo, o limiar de 3,0 ATA do O₂ para intoxicação do SNC foi baseado em estudos realizados com indivíduos adultos jovens e treinados, expostos por 2 a 3 horas nessas condições e pertencentes ao grupo de treinamento de mergulho da Marinha dos EUA (Bean, 1945). Entretanto, para outros autores, o limiar de 2,8 ATA seria mais seguro, pois embora 80% de indivíduos voluntários expostos a OHB mostraram sinais clínicos de intoxicação do SNC apenas após 2 horas a 3,4 ATA, alguns os tiveram em 2,8 ATA (Bean, 1965; Clark e Lambertsen, 1971a; Clark, 1993). Por isso, um limiar seguro de exposição ao O₂ é difícil de ser estabelecido, mesmo entre jovens adultos treinados, nos quais fatores importantes como as condições de repouso físico prévio à exposição, ou seu estado emocional nem sempre são facilmente controlados (Bean, 1965). A influência destes fatores está provavelmente relacionada ao fato das alterações do metabolismo também interferirem com a intoxicação ao O₂. Foi verificado que a hipotermia diminui e a hipertermia aumenta a toxicidade do oxigênio, enquanto o teor de umidade do ambiente também interfere, pois tanto umidades relativas baixas (menores que 20%) ou extremamente elevadas (acima de 90%) aumentam a toxicidade do O₂, medida pelo tempo de sobrevivência (Hulpien e Cole, 1944). A elevação do metabolismo por outros meios também demonstrou aumentar os efeitos tóxicos do oxigênio (Bean, 1945). Ou ainda, a administração de extratos tireoidianos ou tiroxina resultou em aumento importante da toxicidade do O₂ em animais experimentais, ao passo que a tireoidectomia teve um efeito preventivo (Bean, 1965). A administração de corticosteróides também mostrou agravar as lesões tóxicas do O₂, tanto ao nível do pulmão, em exposições a O₂ puro na pressão atmosférica (Bean e Smith, 1952), quanto ao nível do SNC e dos pulmões sob oxigenoterapia hiperbárica (OHB) (Bean e Johnson, 1952; Bean 1965; Bean, 1961). Contrariamente, a hipofisectomia (Bean e Smith, op. cit.) e

a adrenalectomia (Bean, 1965) conferiram proteção à ação tóxica do O_2 em altas pressões, assim como o uso de agentes bloqueadores simpáticos periféricos como SKF501 (N-(9-fluorenil)-N-etil-beta-cloroetilamina), a Dibenamina® e o Dibenzylene®, ou ganglionares, como TEA (cloreto de tetraetilamônio) e Hexametônio, embora estes últimos em grau menor, provavelmente por não serem bloqueadores específicos do receptor nas células efectoras (Bean e Johnson, 1955; Bean, 1965).

Há de se considerar, no entanto, que a própria hiperoxigenação *per se* constitui-se em fator de estresse que antagoniza possíveis efeitos fisiológicos reflexos por ela desencadeados. Conforme discutido anteriormente, a hiperoxigenação leva a uma diminuição da atividade quimiorreceptora periférica carotídea e aórtica o que leva a uma inibição da atividade simpática em oposição ao efeito estimulatório simpático desencadeado reflexamente pela hipóxia (Cain, 1983). Ao mesmo tempo, por ação central direta, a hiperóxia causa ativação da formação reticular tanto ascendente quanto descendente (Zaltsman, 1968 apud Iazzetti, 1998). Nesse estudo, indivíduos foram expostos a OHB a 2 e 3 ATA entre 60 e 90 minutos, os quais apresentaram um melhor desempenho em testes cognitivos e perceptivos do que em condições ambientes, devido à ação sobre as vias reticulares descendentes e aumento da excitabilidade medular. A ativação ascendente, por sua vez, teve ação estimulatória sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, com liberação de hormônios pituitários, sobretudo ACTH e aumento da secreção de corticoesteróides adrenais (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998).

A ativação hipotalâmica, por sua vez, também provoca estimulação do sistema simpático, que se contrapõe ao efeito inibidor reflexo periférico (Bean e Johnson, 1955). Com isso, o resultado final dependerá, provavelmente, da dose de O_2 imposta. A ativação do sistema nervoso simpático (SNS) por estimulação quimiorreflexa periférica que ocorre na hipóxia pode ser facilmente verificada pela presença de taquicardia e aumento do débito cardíaco (Moody et al., 2003). Estes compensam a queda da resistência periférica total, mediada por mecanismos locais auto-reguladores e acionados pela queda da PO_2 tecidual e a pressão arterial se mantém constante, salvo em hipóxias prolongadas ou severas (Moody et al., op. cit.). Portanto, é sensato esperar que a hiperóxia provoque efeitos opostos. E realmente isso se confirma na prática, pois normalmente se observa uma vasoconstrição periférica, manifesta apenas no lado arterial da circulação, que não se acompanha de aumento na pressão arterial. O aumento conseqüente da resistência vascular, em conjunto com a inibição do quimiorreflexo periférico, induz a respostas

adaptativas cardiocirculatórias que ajudam a manter a PA em níveis normais. Há um redirecionamento do fluxo para os vasos de capacitância, com abertura das anastomoses arteriovenosas (Oriani et al., 1996) e dilatação venosa, diminuindo o retorno venoso. Mas principalmente induz, de maneira reflexa, a uma bradicardia (Bassett e Bennett, 1977). Juntos diminuem o débito cardíaco em 10 a 20% (Bergofsky e Bertun, 1966). Com o redirecionamento do fluxo, observa-se uma queda do fluxo sanguíneo em algumas regiões, com maior intensidade nos rins, no cérebro, nas coronárias, na retina, nos músculos (Oriani et al., 1996) e em menor grau no fígado e na pele (Bergofsky e Bertun, op. cit.). Além disso, também foi relatada uma redução do consumo metabólico miocárdico, que a 3,0ATA de O₂ chega a 11%, compensando a queda do fluxo coronariano pela vasoconstrição e pela queda do débito cardíaco (Savitt et al., 1994).

A julgar por esses fatos, ao menos em doses não tóxicas de O₂, parece que o efeito inibitório sobre o sistema simpático predomina, muito embora se tenha registrado um aumento da secreção de adrenalina e noradrenalina, mas sem importância fisiológica nessas condições (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998). Mesmo assim, em ratos expostos a O₂ tanto a 1 ATA quanto a OHB a 6 ATA houve aumento do volume das supra-renais (Bean, 1965; Edström e Röckert, 1962), considerado pelos autores como uma típica resposta reacional ao estresse.

Por conta de tudo isso, pode-se afirmar que fatores neuroendócrinos estão intimamente relacionados à intoxicação pelo oxigênio e podem ser a causa da grande variação individual encontrada na suscetibilidade e imprevisibilidade da reação ao excesso de oxigênio respirado, ao se relacionarem com o estado emocional e temperamental dos indivíduos a serem expostos (Bean, op. cit.). É de se esperar, portanto, que pacientes internados com alguma patologia também sejam mais suscetíveis à intoxicação pelo O₂ e cuidados maiores devem ser tomados no estabelecimento de limiares seguros ao emprego da oxigenoterapia. Estudo realizado em voluntários sãos e pacientes mostrou que seria improvável a ocorrência de intoxicação com a administração de O₂ puro a 3,0 ATA, sem o uso de máscara, por até meia-hora (Foster e Churchill-Davidson, 1963), um tempo bem inferior ao creditado aos jovens atletas dos experimentos citados anteriormente. Com isso, parece claro que qualquer fator de estresse metabólico, físico ou emocional altera a suscetibilidade individual e predispõe ao desenvolvimento mais precoce de intoxicação pelo oxigênio.

1.8.4 A intoxicação do SNC e seus efeitos sobre os pulmões

Quando se respira O_2 puro a pressões acima 2 ATA teoricamente há risco de intoxicação do sistema nervoso central (SNC) (Donald, 1947a,b; De Martino et al., 1996), embora esse limite possa sofrer alterações de um indivíduo para o outro, como visto anteriormente. De qualquer maneira, manifestações de intoxicação do SNC com pressões de O_2 abaixo de 2,8 ATA são consideradas raras (Wattell et al., 1990). No lugar de um índice melhor de toxicidade, a ocorrência de uma incidência de 10% de sintomas neurológicos durante exposições a pressões de oxigênio de 2,8-4,0ATA foi usado para descrever a tolerância do SNC ao oxigênio no homem (Donald, 1947a,b; Clark, 1993). Como assíntotas para essa curva foi considerado o tempo zero e uma PO_2 inspirada de 2,0ATA (202kPa). Esta última foi selecionada porque nenhum efeito neurológico proeminente foi observado em homens normais respirando O_2 a 2,0ATA (202kPa) por até 12hs (Clark e Lambertsen, 1971b). Embora a ausência de convulsões durante exposições similares de oxigênio a 2,0ATA (202kPa) tenha sido confirmada (Lambertsen et al., 1987), decréscimos reversíveis na atividade elétrica retiniana em resposta a um flash de luz foram observados consistentemente (Clark et al., 1988, 1991).

Acima desse valor, além da ação direta do excesso de O_2 sobre as células nervosas, há a participação do CO_2 acumulado a nível central, bem como dos mecanismos de controle do fluxo sanguíneo cerebral. Com isso, tanto a PO_2 quanto a PCO_2 encontrar-se-ão elevadas centralmente e agirão de maneira sinérgica, diferente da ação antagônica fisiológica normalmente observada entre ambos. Conseqüentemente o efeito estimulatório sobre o simpático prevalecerá. Passa-se então de uma fase de inibição simpática para outra, de ativação e descarga simpática generalizada, com efeitos desastrosos sobre o próprio SNC e sobre os pulmões, agravando a intoxicação de ambos (Bean, 1961).

É bem conhecido o efeito tóxico do O_2 sobre o sistema nervoso central. Em 1878, Paul Bert descreveu a ocorrência de convulsões do tipo grande-mal, de aparecimento súbito, em modelos experimentais de animais expostos ao oxigênio hiperbárico acima de 3,0 ATA. Posteriormente, este efeito foi descrito também no homem (Donald, 1947a,b). Semelhante às convulsões provocadas por eletrochoque (Marshall e Lambertsen, 1961), podem ser inibidas totalmente no rato por alguns agentes anestésicos, como clorofórmio (Bert, 1878), uretano, pentobarbital sódico, alfa-cloralose, propileno-glicol e a associação destes dois últimos (Bean e Zee, 1966).

Ao passo que em cães, o dietilbarbiturato de sódio inibe apenas parcialmente, impedindo os movimentos tônico-clônicos das extremidades e concentrando o efeito convulsivo para a cabeça, pescoço e tronco, principalmente sobre a inspiração, tendo sido inclusive empregado o termo “respiração convulsiva” (Shaw et al., 1934). O animal apresenta “gasps” inspiratórios cada vez mais intensos, seguidos de apnéia cada vez mais longa a medida em que a convulsão progride, até que o período convulsivo é finalizado pela falência respiratória. Ainda nesses experimentos foi observado, além de convulsões típicas, uma flutuação importante da pressão arterial (PA) com tendência à queda, não observada normalmente nos animais sob respiração a ar ambiente ou mesmo com O₂ puro a 1 ATA. A queda da PA parece anteceder o período convulsivo, podendo se constituir num aviso para a iminência do surgimento de uma convulsão. Entretanto, durante o período convulsivo, há uma abrupta e importante elevação da PA de 50 mmHg ou mais. Após a convulsão, a hipotensão continua se a exposição ao O₂ hiperbárico se prolongar e caso atinja valores inferiores a 50 mmHg, torna-se irreversível, sobrevivendo a morte em poucos minutos por falência respiratória e cardiocirculatória. A primeira ocorre antes da segunda, pois a PA continua a cair mesmo após o centro respiratório ter sido completamente paralisado. Mas a falência do centro cardiocirculatório é apenas uma questão de tempo (Shaw et al., 1934). Além das alterações hemodinâmicas, espasmos e contrações persistentes também acompanham o quadro pós-convulsivo se a exposição ao O₂ continuar (Wattell et al., 1990). Entretanto, se a pressão parcial de oxigênio é diminuída antes da hipotensão severa se instalar, o quadro é totalmente revertido. Uma recuperação completa foi verificada tanto em animais quanto no homem (Shaw et al., op. cit.; Wattell et al., op. cit.). Outros autores verificaram com muito mais freqüência a presença de uma taquicardia precedendo a crise convulsiva, ao invés da queda da PA (Wattell et al., op. cit.).

Os mecanismos envolvidos em todas as manifestações centrais da intoxicação pelo oxigênio parecem diretamente ligados ao efeito tóxico direto do O₂ sobre os centros respiratórios e cardiocirculatórios, bem como sobre a atividade elétrica e as reações enzimáticas intracelulares, difusamente por todo SNC (Marshall e Lambertsen, 1961). Foi verificado que, além da participação de radicais livres oxigenados, com inativação de desidrogenases pela oxidação de radicais sulfidrilas e formação de peróxidos lipídicos, há inibição da fosforilação oxidativa, com a conseqüente redução da produção de ATP, possivelmente também com a participação do aumento da produção de EROS, bem como diminuição dos níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Wood, 1980).

A ação protetora de alguns agentes anestésicos, atenuando ou inibindo o aparecimento de convulsões, dá suporte ao efeito direto do O_2 sobre o metabolismo cerebral, uma vez que sabidamente esses agentes agem diminuindo a excitabilidade do sistema nervoso central e o metabolismo cerebral como um todo (Wood e Perkins, 1970; Bean, 1965). Entretanto, já foi relatado que anestésias com pentobarbital sódico podem ter efeitos paradoxais e aumentar o efeito tóxico da OHB sobre o SNC, levando à paralisias motoras permanentes em exposições de curta duração a 3,0 ATA, semelhante às observadas em exposições repetidas de animais não anestesiados a 4,5 ATA (Bean, op. cit.).

Além do efeito tóxico direto sobre o SNC, a inalação de O_2 a pressões acima de 3 ATA leva também à intoxicação pulmonar, caracterizada basicamente por edema hemorrágico intersticial e alveolar, com o aparecimento de hemácias intactas no líquido edematoso preenchendo as passagens aéreas (Wood e Perkins, 1970). No entanto, o mecanismo causador não parece ser uma ação direta do oxigênio sobre o parênquima pulmonar, como observado em tensões mais baixas de O_2 e insuficientes para provocar intoxicação do SNC. Neste caso, o edema pulmonar seria decorrente de uma hipertensão venosa e capilar pulmonar, conseqüente a uma hipertensão arterial importante, por sua vez decorrente à forte estimulação simpática, muito embora a ação direta do O_2 sobre as células também deva contribuir, mas de forma pequena (Bean e Zee, 1966). Pois em ratos foi registrado, em todos os animais experimentados que tiveram lesão pulmonar, um aumento da PA previamente ao aparecimento do edema (Wood e Perkins, op. cit.). Resultados semelhantes foram encontrados em cães, nas mesmas condições experimentais (Wood e Perkins, op. cit.).

Sua origem reside, provavelmente, no aumento da PCO_2 central. Foi comprovado que o aumento da PCO_2 central é forte estimulante das vias excitatórias do centro vasomotor, levando à estimulação simpática generalizada e liberação maciça de adrenalina, com conseqüente aumento importante da PA (Rasmussen et al., 1978), situação que pode ocorrer em casos de queda acentuada do fluxo sanguíneo cerebral e acúmulo do CO_2 metabolicamente produzido (Guyton, 2000). No caso da OHB, o aumento da PCO_2 central se deve a uma ineficiência da capacidade de transporte de CO_2 por parte do sangue venoso dado o excesso de oxiemoglobina, o mesmo ocorrendo com sua capacidade tamponante, que pode apresentar uma queda de até dois terços, como já salientado (Shaw et al., 1934; Bean et al., 1972).

Embora estes valores tenham sido inicialmente considerados muito baixos e insuficientes para ocasionar qualquer efeito tóxico ou alteração de pH importante (Shaw et al., 1934), sua combinação com tensões elevadas de oxigênio provou-se muito tóxica. Enquanto apenas elevadas pressões parciais de CO_2 no ar inspirado podem levar ao aparecimento de convulsões, acima de 200mmHg e queda da PA, acima de 100mmHg (Shaw et al., 1934; Lambertsen, 1978d.), estes sinais, típicos da intoxicação isolada do O_2 a fortes pressões parciais, foram relatados de maneira mais precoce e intensa com misturas contendo CO_2 produzindo valores de PACO_2 bem menores, entre 50 e 60 mmHg, ou mesmo com valores subnormais, já a partir de 19mmHg em camundongos (Marshall e Lambertsen, 1961) e ao redor de 30 mmHg em cães (Shaw et al., op. cit.). Corroborando esses resultados, foi observado que quanto maior a PACO_2 , menor o tempo de exposição necessário para que ocorra intoxicação pelo O_2 , havendo uma nítida interação entre o efeito tóxico de ambos (Shaw et al., op. cit.; Marshall e Lambertsen, op. cit.). Esses dados confirmaram a relativa ineficiência da capacidade tampão do sangue na vigência de OHB elevada, a qual, apesar de cursar com um conteúdo venoso de CO_2 diminuído, a PCO_2 central se eleva e o pH cai (Lamberten et al., 1953a). Mesmo assim, alguns autores ainda demoraram a aceitar que as elevações da PCO_2 central seriam suficientemente elevadas a ponto de causar manifestações tóxicas tão importantes, a julgar pelos valores obtidos no sangue jugular efluente do cérebro (Lamberten et al., 1953b). Entretanto, a observação da existência de variações, cíclicas e não cíclicas, do aumento da perfusão em determinadas áreas cerebrais em detrimento de outras parecem ter posto um ponto final nessa questão, uma vez que no somatório geral, o sangue que estaria deixando o cérebro poderia realmente não apresentar valores tão elevados (Bean, 1961; Bean, 1965). Mas, se medidos pontualmente em regiões isoladas, valores verdadeiramente altos poderiam ser observados, o que foi confirmado posteriormente pelo trabalho de Bean et al. (1972). Além disso, a hipercapnia central provoca uma estimulação respiratória, com diminuição da PaCO_2 que, por sua vez, tende a aumentar a vasoconstrição hiperóxica, majorando a hipercapnia central, como já visto (Ungar e Bouverot, 1980; Floyd et al., 2003).

Na gênese da estimulação simpática generalizada observada nessas situações, é bem provável a participação, direta ou não, do hipotálamo, pois em ratos, a injeção de aconitina no hipotálamo provocou uma hipertensão arterial sustentada e um aumento acentuado da pressão venosa pulmonar, na ausência de oxigênio elevado, o mesmo ocorrendo com a injeção intravenosa de adrenalina nesses animais (Wood e Seager,

1964). Na mesma direção dessa hipótese, também foi registrada uma pressão venosa pulmonar elevada na exposição à hiperóxia hiperbárica (Wood e Perkins, 1970). Bean e Zee (1966) também observaram que todos os ratos que exibiram lesão pulmonar pós-exposição à OHB elevada (6 ATA) também tiveram convulsões, embora nem todos que convulsionaram desenvolveram lesões pulmonares, atribuindo tal fato à severidade e duração das crises. Por outro lado, vários agentes anestésicos utilizados atenuaram ou aboliram totalmente as manifestações convulsivas da intoxicação pelo O_2 , bem como as alterações pulmonares observadas nos animais não tratados com anestésicos e expostos à OHB. Concluíram os autores haver uma forte relação causal entre convulsões e edema pulmonar e, portanto, com um componente neurogênico predominante, decorrente de uma maciça descarga simpática associada ao componente somático das convulsões. O fato de animais submetidos a OHB acima de 3 ATA, pré-tratados com anfetamina ou L-Dopa, ou sob respiração com misturas elevadas de O_2 contendo CO_2 não excessivamente alto, resultarem num encurtamento do tempo de aparecimento das lesões, tanto pulmonares (Bean, 1961; Wood e Perkins, 1970.; Bean, 1972) quanto do SNC (Shaw et al. 1934; Marshall e Lambertsen, 1961), bem como no tempo de sobrevivência (Marshall e Lambertsen, op. cit.; Wood e Perkins, op. cit.), também sustenta essa idéia. Assim como a presença de agentes anestésicos, diminuindo a excitabilidade do SNC, ou o uso de agentes bloqueadores simpáticos como Dibenamine®, Dibenzileno® e o hexametonio, diminuindo a resposta simpática e evitando uma elevação da PA, todos eles prevenindo ou prolongando o aparecimento de edema pulmonar, também dão suporte a esta hipótese. Os resultados obtidos com o tampão tris (hidroximetil-aminometano) parecem não deixar dúvidas quanto ao papel do CO_2 na gênese das lesões pulmonares nesses casos. Esta substância, sabidamente efetiva contra o aumento da PCO_2 e da acidose tecidual in vivo e a consequente redução da estimulação simpática decorrente da hipercapnia (Nahas et al., 1960), demonstrou um elevado grau de proteção contra os efeitos tóxicos da OHB, tanto ao nível do SNC, atenuando ou inibindo o desenvolvimento e a gravidade de convulsões, quanto ao desenvolvimento do edema pulmonar (Bean, 1961).

Evidentemente, a ativação hipotalâmica também atinge o eixo hipófise-adrenal e hipófise-tireóide, de maneira que foi demonstrado que tanto a hipofisectomia quanto a adrenalectomia atenuam as lesões pulmonares induzidas pela hiperóxia, não só de origem neurogênica, sob pressões elevadas acima de 3 ATA (Bean e Johnson, 1952), mas curiosamente também em lesões pulmonares sob respiração de O_2 acima de 90%, à

pressão atmosférica (Bean e Smith, 1952). Enquanto que a injeção de cortisona aumentou as lesões em animais normais e diminuiu acentuadamente o efeito protetor da hipofisectomia sobre a intoxicação pulmonar pelo O_2 (Bean e Johnson, 1952). Entretanto, a ablação de qualquer dos órgãos endócrinos não impediu a instalação de lesões tóxicas pulmonares, embora em menor grau, nos casos em que a exposição ao O_2 se prolongou suficientemente (Bean e Smith, 1952). Dessa forma, tanto a corticotrofina quanto os corticoesteróides adrenais não são essenciais ao desenvolvimento da toxicidade pulmonar pelo O_2 , embora tenham efeito contributivo importante. Similarmente, a tireoidectomia demonstrou efeito atenuante sobre a intoxicação pelo O_2 (Bean, 1965).

Pode-se concluir, portanto, que a inalação de CO_2 a valores não muito altos, até 60mmHg de PCO_2 alveolar, aumenta o efeito tóxico do oxigênio, quando avaliado por meio de convulsões ou de lesão pulmonar. Entretanto, um efeito paradoxal foi observado com PCO_2 elevadas, acima de 90mmHg e principalmente acima de 120mmHg, onde houve uma inibição destas manifestações e lesões (Marshall e Lambertsen, 1961; Bean, 1965; Bean e Zee, 1966). No primeiro caso, o mecanismo estaria relacionado à vasodilatação arterial cerebral decorrente da hipercapnia arterial resultante da respiração de misturas com CO_2 , o qual predomina sobre o efeito vasoconstritor da hiperóxia (Marshall e Lambertsen, op. cit.; Bean e Zee, op. cit.). Com maior aporte sanguíneo ao tecido nervoso, maior a PO_2 no local, intensificando os efeitos tóxicos deste. Já no segundo caso, o mecanismo envolvido parece ser uma progressiva narcose gasosa, semelhante à que ocorre com o óxido nitroso (Marshall e Lambertsen, op. cit.; Bean, 1965). Aqui o CO_2 parece inibir não só as manifestações centrais da intoxicação pelo oxigênio, mas também o desenvolvimento de edema pulmonar, provavelmente pelo bloqueio narcótico da estimulação simpática, corroborando a tese da implicação de fatores neurogênicos na gênese da lesão pulmonar pela OHB elevada. Entretanto, em ambas situações, a mortalidade encontra-se aumentada. Por conta disso, deve-se ter cuidado na presença de altas doses de CO_2 , pois a ausência de sinais de intoxicação não significa uma atenuação das lesões decorrentes da hiperóxia (Bean, op. cit.).

1.8.5 Efeitos do excesso de O_2 sobre a resposta quimiorreceptora carotídea

Foi observado que gatos expostos a hiperóxia normobárica ou hiperbárica sofrem uma diminuição na quimiossensibilidade específica ao oxigênio, constatada por uma resposta neuronal (impulsos por segundo) e fisiológica (volume-minuto) atenuada à

hipóxia, permanecendo intacta a quimiorrecepção ao CO_2 , quando ainda não há sinais clínicos evidentes de intoxicação pulmonar. (Lahiri et al., 1987; Arieli et al., 1988; Liberzon et al., 1989; Torbati et al., 1989; Mokashi e Lahiri, 1991). Torbati et al. (op. cit.), em seu estudo com gatos, observaram um efeito supressor apenas moderado da resposta quimiossensitiva à hipóxia pós OHB de curta duração a elevada pressão parcial (2 horas a 5 ATA). Por outro lado, Lahiri et al. (1987) obtiveram um efeito supressor mais pronunciado após exposição prolongada desta espécie à hiperóxia normobárica (60 horas), sugerindo que as alterações na quimiorrecepção necessitariam de tempo para ocorrer.

Contudo, a dose de hiperoxigenação hiperbárica utilizada por Torbati et al. (1989) pode não ter sido suficiente para causar um bloqueio expressivo da quimiorrecepção em gatos, pois Liberzon et al. (1989), expondo ratos a pressões parciais de O_2 variando entre 1,2 e 3,0 ATA por tempos de exposição diferentes (180, 550 e 900 minutos), demonstraram um efeito depressivo significativo da resposta ventilatória (volume-minuto) à hipóxia pós OHB, chegando até a uma diminuição de 80% da resposta ao estímulo hipóxico (a 550 min. e 2,4 ATA e a 900min. e 1,7 ATA). Além disso, o efeito depressor mostrou-se reversível e dose-dependente, ou seja, relacionado tanto ao tempo de exposição quanto à pressão utilizada. Os autores tiveram o cuidado de excluir qualquer dose que demonstrasse algum sintoma pulmonar que pudesse interferir na resposta ventilatória e concluíram que o efeito supressor tem o mesmo comportamento que vários outros efeitos tóxicos celulares pelo oxigênio, sempre dose-dependente (Liberzon et al., op. cit.).

Exposições de O_2 acima de 0,5 ATA levam à disfunção do sistema respiratório tanto em animais quanto no homem, podendo chegar à falência respiratória e morte se a exposição se prolongar (Bassett e Bennett, 1977). Entretanto ainda não está esclarecido se a falência respiratória desencadeada pela intoxicação pelo oxigênio é decorrente apenas da lesão pulmonar ou se há participação dos quimiorreceptores periféricos, principalmente dos corpos carotídeos. Além disso, não há até o momento confirmação histológica da existência de possíveis lesões estruturais em corpos carotídeos de ratos que possam explicar as respostas atenuadas encontradas, muito menos um estudo quantitativo desses órgãos nessas condições nessa espécie.

Torbati et al. (1993) concentraram seu estudo na análise morfométrica da ultraestrutura das células glômicas de corpos carotídeos de gatos expostos à hiperóxia hiperbárica, com uma dose fixa de exposição de 5 ATA, dando ênfase às alterações

ocorridas nas cristas mitocondriais. Entretanto, não abordaram possíveis alterações na histologia local ao nível da microscopia óptica. Isto pode ser interessante uma vez que pelos estudos de McDonald (1983) e McDonald e Larue (1983) sobre a microcirculação dos corpos carotídeos mencionados anteriormente, sua vasculatura apresenta alto grau de complexidade.

Em outro estudo, Acker et al. (1977) verificaram a existência de 2 tipos de fluxo a atingir o tecido glômico. Um fluxo, que chamaram de fluxo total, que aumenta em situações de hipóxia ou hipercapnia e PA constante e semelhante ao previamente observado por outros autores (Daly et al., 1954; Purves, 1970a,b). Este fluxo apresenta uma relação linear com a variação da pressão arterial, diminui com estimulação simpática (Purves, 1970a,b) e seria determinado principalmente pela abertura e fechamento de anastomoses AV e canais de fluxo rápido (Acker, 1980), sendo os responsáveis tanto pelos índices de fluxo elevado quanto pelas altas taxas de PaO_2 registradas nos corpos carotídeos (Daly et al., 1954; Purves, 1970a; Lahiri, 1980). Entretanto, esse fluxo não atingiria as células glômicas efetivamente. Um segundo fluxo, chamado de local pelos autores, circulando pelos capilares intraglômicos, levaria o O_2 aos quimiorreceptores carotídeos e teria um comportamento distinto. Ackers et al. (1977) observaram que esse fluxo local diminui em situações de hipóxia e que a PO_2 tecidual segue as mudanças do mesmo, também diminuindo na hipóxia. Além disso, eles observaram que a hipercapnia, apesar de provocar um aumento do fluxo carotídeo total, não provoca nenhuma mudança significativa, seja no fluxo local, seja na PO_2 tecidual, ao passo que a estimulação simpática provoca uma diminuição do fluxo total, mas também não exerce nenhuma influência sobre o fluxo local ou a PO_2 tecidual. Por conta disso, consideraram a possibilidade da regulação do fluxo sanguíneo que efetivamente atingirá os quimiorreceptores glômicos ser realizada por mecanismos locais de autorregulação mediados exclusivamente pela tensão arterial de O_2 , o que chamaram de “ PO_2 -autoregulation”.

Parece lógico imaginar que, sendo sensores da variação da PaO_2 , os corpos carotídeos não possam apresentar mecanismos compensadores de fluxo em situações que devam despertar sinais neurais que avisem os centros respiratórios centrais a corrigirem essas variações, diferente do que ocorre nos tecidos periféricos em geral. Em vista disso, levantamos a hipótese de que, numa situação de hiperóxia, ao contrário da hipóxia, observaríamos um aumento do fluxo local, com grandes capilares congestionados, suficiente para provocar uma elevação da PO_2 tecidual passível de provocar lesão

estrutural, mas concomitante com a presença de vasoconstrição arteriolar. Procuramos estudar esse efeito, através da hiperoxigenação hiperbárica, em doses semelhantes às utilizadas na literatura que foram suficientes para provocar alterações da fisiologia dos corpos carotídeos, mas sem evidência de intoxicação pulmonar clínica (Liberzon et al, 1989) e em altas doses, suficientes para causar lesões estruturais pulmonares (Clark e Lambertsen, 1971a; Clark, 1982). Nosso objetivo foi verificar e quantificar, por meio da microscopia óptica e eletrônica, a extensão do comprometimento destes órgãos em ratos que possam ajudar a esclarecer as alterações funcionais encontradas nessas situações.

2. OBJETIVOS

- Expor ratos a duas doses diferentes e crescentes de oxigênio correspondendo, respectivamente, a um efeito supressor sub-máximo da resposta ventilatória à hipóxia (RVH), mas ainda sem sintomas de intoxicação pulmonar evidente e à presença de toxicidade pulmonar marcante.

- Verificar a presença de lesões estruturais do parênquima pulmonar dos animais experimentados que possam servir de parâmetro da dose efetivamente empregada, com base na literatura existente a respeito.

- Verificar e quantificar, por meio da microscopia óptica e eletrônica, a extensão do comprometimento dos corpos carotídeos desses animais que possam ajudar a esclarecer as alterações funcionais encontradas nessas situações.

- Testar a hipótese de aumento do fluxo capilar ao nível do parênquima glômico carotídeo associado à vasoconstrição arteriolar, na presença de hiperoxigenação hiperbárica, por meio de análise morfométrica da estrutura vascular dos corpos carotídeos dos animais utilizados neste estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Antes do início das atividades de pesquisa do presente trabalho, o projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

3.1 ANIMAIS

15 ratos machos Wistar adultos, com peso entre 286 e 372 g (média de 329 g $\pm$ 23) procedentes do biotério da FMUSP foram utilizados para a realização dos experimentos. Os animais foram mantidos sob temperatura de 22 e 23°C e umidade controlada, com água e comida fornecidos *ad libitum* até o momento dos experimentos.

3.2 PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO

Inicialmente foram realizados estudos preliminares com um grupo de 3 animais, expostos a 2,4 ATA durante 3 horas, a fim de se avaliar a exatidão dos procedimentos experimentais a serem realizados subsequente. A metodologia empregada e a análise dos dados obtidos foram as mesmas descritas a seguir.

Os animais foram divididos em 3 grupos. Cinco ratos foram mantidos em ar ambiente e constituíram o grupo controle. Os outros animais foram divididos em 2 grupos e expostos a doses de oxigênio correspondente, respectivamente, a um efeito supressor sub-máximo da resposta ventilatória à hipóxia (RVH), mas ainda sem sintomas de intoxicação pulmonar evidente (Liberzon et al, 1989) e à presença de toxicidade pulmonar marcante, quais sejam:

- grupo 1 (n = 5): grupo controle, mantido em ar ambiente a 1,0 ATA;
- grupo 2 (n = 5): exposição a O₂ puro por 6 horas a 2,4 ATA – efeito sub-máximo à RVH sem intoxicação pulmonar evidente;
- grupo 3 (n = 5): exposição a O₂ puro por 6 horas a 3,0 ATA – intoxicação pulmonar marcante.

Os animais a serem testados eram introduzidos em uma câmara hiperbárica de aço para animais Atlas, modelo AN-700, com um volume interno de 480 Litros e vigias de acrílico para visualização e monitoramento dos animais dentro da mesma. Após o fechamento da câmara, um fluxo contínuo de oxigênio por 5 minutos, a fim de se expulsar todo o ar contido na câmara era inicialmente realizado e só então iniciada a compressão da mesma. A concentração de O₂ dentro da câmara a esse momento esteve sempre igual ou acima de 97%. Tanto para a compressão quanto para a descompressão, foi utilizada uma taxa de variação de pressão de 0,1 bar.min⁻¹. Uma vez atingida a pressão desejada, um fluxo constante de oxigênio sem variação da pressão de trabalho permitiu que não houvesse acúmulo de CO₂ no interior da câmara.

Imediatamente após o término da exposição hiperóxica, os animais foram removidos individualmente da câmara e anestesiados com tiopental sódico, a uma dose de 50 mg.Kg⁻¹, intra-peritoneal, e reintroduzidos na câmara a fim de continuarem a respirar numa atmosfera rica em O₂ até o momento de serem operados. Quando o reflexo de fuga não era mais observado, os ratos foram operados um a um e ambas artérias carótidas expostas cirurgicamente. Doses subseqüentes de 5-10 mg.Kg⁻¹ i.p. foram aplicadas quando necessário. Em vista das dificuldades técnicas encontradas na coleta isolada dos corpos carotídeos de ratos, dado seu tamanho diminuto, o procedimento adotado foi a retirada em bloco de toda a bifurcação carotídea supostamente contendo seus respectivos corpos carotídeos. Nem todas as coletas foram bem sucedidas, resultando num índice de sucesso ao redor de 60% dos animais submetidos ao procedimento. Dessa forma foram utilizados tantos animais quanto necessários a fim de se completar os grupos experimentais citados anteriormente, considerando-se para a pesquisa apenas aqueles cujos corpos carotídeos puderam ser retirados na sua totalidade.

Com o animal ainda vivo, a região da bifurcação das artérias carótidas contendo seus corpos carotídeos foi isolada e fixada *in situ* por gotejamento da solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão PBS, durante 10 min. A seguir, toda a região fixada foi inteiramente retirada em bloco e rapidamente introduzida em solução fixadora. Uma vez completada a ressecção dos fragmentos arteriais supostamente contendo os corpos carotídeos, os pulmões foram retirados em bloco e o pulmão D isolado e introduzido em solução fixadora.

3.3 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

3.3.1 Microscopia óptica

Os fragmentos arteriais do lado direito do animal foram separados para microscopia óptica. Foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em PBS neutro por 24 horas e desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) durante 24 horas. Em seguida foram pré-incluídos em uma mistura 1:1 de solução A (vide abaixo) e álcool absoluto por 12 horas e transferidos para solução A pura, nela permanecendo por 24 horas. A inclusão foi feita em historesina (solução B) em forminhas retangulares de plástico e colocados em estufa a 37°C por 24 horas a fim de permitir a polimerização da resina. Em seguida, foram colados em cubos de madeira de 2cm de lado para facilitar o encaixe no micrótomo.

Durante o processo de pré-inclusão e inclusão foram utilizadas duas soluções (A e B) preparadas a partir do kit de embebição *Leica Historeshin*.

Solução A:

0,5g de peróxido de benzoíla em 50mL de resina básica.

Solução B:

15mL da solução A e 1 mL do polimerizador (dimethyl sulfoxide).

Cortes seriados de 3µm, obtidos em micrótomo (Leica-RM2065) utilizando-se facas de vidro feitas no “Knife-maker” Reichert (Leica) foram estirados em água limpa a temperatura ambiente, pescados em lâmina de vidro e secos em lamparina. Foram selecionados sempre um a cada dois cortes, os pares, equivalente a um intervalo de 6µm entre 2 cortes consecutivos, num total de 8 cortes por lâmina. Inicialmente foi necessário identificar o 1º corte no qual o corpo carotídeo estava presente, uma vez que no rato, em virtude do seu tamanho minúsculo, sua dissecção e individualização sob visualização direta não é possível. O corpo carotídeo inteiro, em toda sua extensão, foi seccionado, identificando-se as lâminas contendo todos os cortes desde o primeiro até o último corte em que o órgão pôde ser visualizado.

A partir deste procedimento, os cortes foram submetidos à coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos e lavados em água corrente por 2 minutos; contracolorados com Fucsina básica 0,2% por 4 minutos e lavados em água corrente por 5

minutos; contra-corados novamente em Azul de Toluidina 0,1% por 10 minutos e lavados em água corrente, até a retirada do excesso de corante. Após a secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com entellan e lamínula.

O pulmão direito dos animais foi fixado em bloco em paraformaldeído a 4% em tampão PBS por 24hs. Fatias do pulmão inteiro, cortadas longitudinalmente, foram incluídas em parafina e processadas conforme os procedimentos histológicos de rotina. Cortes de 5µm foram preparados, corados com hematoxilina e eosina (HE) e codificados por análise cega para amostragem.

3.3.2 Microscopia eletrônica

Os fragmentos arteriais do lado esquerdo do animal foram separados para microscopia eletrônica. Imediatamente após a remoção, os fragmentos foram introduzidos em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2, a temperatura ambiente por 2 horas e, então, seccionados em fatias de 2 mm de espessura. Todas as fatias dos fragmentos foram pós-fixadas primeiramente em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4°C por 1 hora e em seguida em solução de acetato de uranila 1% "overnight". Após cada solução fixadora, as fatias foram lavadas em solução de sacarose e cloreto de sódio por 1 a 3 minutos. Uma vez submetidas à desidratação progressiva em acetona (30° a 100°), as fatias foram incluídas em resina Araldite CY205. Cortes ultrafinos de 60 a 90 nm, obtidos com ultramicrotomo (Leica-Ultracut UCT), foram montados em grades de cobre com mesh de 200 (ou 300) e corados com citrato de chumbo para, então, serem analisados ao microscópio eletrônico (JEOL 1010).

Foram realizadas análises descritivas em todos os cortes amostrados ao nível da microscopia óptica, no caso dos pulmões e corpos carotídeos e à microscopia eletrônica apenas para os corpos carotídeos.

3.4 PROCEDIMENTOS MORFOMÉTRICOS.

A análise quantitativa utilizada foi baseada nos princípios esteorológicos resumidos por Weibel (1963) e Gundersen et al. (1988), adaptados quando necessário às nossas condições experimentais. Foram obtidas medidas do volume total dos corpos carotídeos, da densidade volumétrica dos espaços capilares e tecidos não

parenquimatosos visando observar a presença de dilatação capilar e edema no estroma intersticial, da proporção relativa de células glômicas, suas variantes e de células sustentaculares, calculadas a partir das respectivas densidades numéricas no plano que foram posteriormente convertidas em número total estimado de células e medidas da relação entre as áreas luminal e da parede de arteríolas (relação L/W), com o intuito de quantificar o grau de vasoconstrição desses vasos.

Os cortes selecionados foram observados com o auxílio de um microscópio (Nikon - Eclipse E200) equipado com uma câmera de vídeo (Samsung - Digital Color Câmera SCC-131) e projetados num monitor (Gradiente - Security Monitor SM20). Medidas morfométricas foram realizadas utilizando-se o procedimento de contagem de pontos padrão com o auxílio de um sistema-teste coerente de 25 pontos e 30 linhas, com área conhecida e limites bem definidos, permitindo-se estabelecer as margens de inclusão e exclusão, iguais em todos os procedimentos morfométricos (Fig. 1).

3.4.1 Cálculo do volume dos corpos carotídeos

Para assegurar uma seleção randomizada dos cortes e campos amostrados, para cada corpo carotídeo analisado a escolha do corte inicial foi determinada utilizando-se uma tabela de números randômicos, que identificou o 1º corte a ser considerado a partir do 1º corte que mostrou o início do corpo carotídeo. Então, sistematicamente, um a cada 10 cortes foi selecionado para o cálculo do seu volume total, cobrindo-se a extensão total do órgão até o último corte que acusou sua presença. No caso do número da tabela selecionado ter sido igual a 1, o corte inicial a ser considerado coincidia com o 1º corte que acusou a presença do corpo carotídeo. Caso contrário, a área deste corte não fez parte do cálculo. Conseqüentemente o último corte, contendo ainda vestígios de corpos carotídeos, também só foi considerado em caso de coincidência com a seleção.

Sob um aumento de 40x, correspondendo a uma área total do sistema-teste de $562.500\mu\text{m}^2$ e uma área referente a cada ponto igual à $22.500\mu\text{m}^2$, a imagem inteira do corpo carotídeo era posicionada dentro do retículo e contados os números de pontos sobre o mesmo. O volume total do corpo carotídeo, que representa o espaço de referência a ser analisado, foi calculado através do método de Cavalieri (Gundersen et al., 1988), conforme a equação:

$$(1) \quad V_{(\text{tot})} = SP_{(\text{estrut})} \cdot a(P) \cdot e ,$$

em que:

$V_{(tot)}$ = volume total da estrutura analisada, no caso do corpo carotídeo;

$SP_{(estrut)}$ = somatória dos pontos sobre a estrutura obtidos em todos os cortes analisados;

$a(P)$ = área referente a cada ponto;

e = espessura média dos cortes, no caso igual a $60\mu m$ em virtude do intervalo entre 2 cortes sucessivos ser igual a $6\mu m$ associada à seleção seriada de um a cada 10 cortes.

Para tanto, foi elaborada uma planilha para cada animal analisado, cujo modelo encontra-se na Tabela 1.

3.4.2 Cálculo das densidades numérica e volumétrica

Utilizando-se do procedimento acima, a escolha dos cortes foi determinada por meio de tabela de números randômicos e, em cada corte, um campo era também randomicamente selecionado no aumento menor (40x). Em seguida, com o campo amostrado posicionado, sob um aumento de 400x, contido num retículo de $5.625\mu m^2$ de área total neste aumento, os valores das densidades numérica e volumétrica eram computados. Para tanto, um total de 10 campos, referente a 10 cortes distintos, foi analisado, tomando-se o cuidado para que toda a área do retículo estivesse preenchida por tecido glômico. Para o cálculo da densidade numérica considerou-se o número de perfis da estrutura analisada dentro do retículo mais os perfis interceptados pelas margens de inclusão previamente definidas, dividindo-os pela área total do retículo. O resultado indicou o número de perfis por área do retículo para cada campo analisado. Uma vez realizada a média aritmética dos 10 campos selecionados obteve-se a média da densidade numérica do perfil analisado por área do corpo carotídeo do animal em estudo. Resultado semelhante pode ser obtido ao se fazer a somatória do número de perfis encontrado nos 10 campos selecionados e dividindo-se pela somatória da área dos 10 retículos analisados, ou seja:

$$(2) \quad Q_{A(estrut)} = Sn_{(estrut)} \cdot (A \cdot N)^{-1},$$

Onde:

$Q_{A(estrut)}$ = densidade numérica no plano (por área) da estrutura analisada;

$n_{(estrut)}$ = número de perfis da estrutura em cada campo analisado;

N = número total de campos analisados

A = área do retículo, no caso igual a $5.625\mu\text{m}^2$.

No caso da contagem de células, as margens deveriam interceptar seus núcleos para que fossem consideradas. As proporções celulares foram calculadas dividindo-se o número total estimado de determinado tipo celular pelo número total estimado de células. Como o espaço de referência em questão foi sempre o mesmo, ou seja, o corpo carotídeo inteiro em cada caso analisado, no cálculo das proporções não houve necessidade de incluir o volume do corpo carotídeo encontrado.

Os valores das densidades volumétricas do espaço capilar e tecidos não parenquimatosos foram calculados dividindo-se o número de pontos sobre determinada estrutura pelo número de pontos total do retículo. Nesse caso, conforme Weibel (1963), a relação pontos sobre a estrutura divididos pelo número total de pontos do retículo é numericamente igual ao volume da estrutura em relação ao volume total do órgão analisado, ou seja, sua densidade volumétrica, desde que toda a área do retículo esteja preenchida pela estrutura a ser analisada. Da mesma forma, o cálculo pode ser obtido, seja calculando-se a densidade volumétrica individual por campo analisado e depois se calculando a média aritmética do total de campos analisados, seja pela somatória do número de perfis encontrado nos 10 campos selecionados dividida pela somatória do número total de pontos dos 10 retículos analisados:

$$(3) \quad V_{V(\text{estrut})} = SP_{(\text{estrut})} \cdot (P_{(\text{ret})} \cdot N)^{-1},$$

em que:

$V_{V(\text{estrut})}$ = densidade volumétrica;

$SP_{(\text{estrut})}$ = somatória dos pontos sobre a estrutura obtidos em todos os cortes analisados;

N = número total de campos analisados;

$P_{(\text{ret})}$ = número total de pontos no retículo, no caso igual a 25.

Os dados colhidos de ambas densidades foram registrados em planilhas elaboradas conforme as Tabelas 2 e 3, respectivamente, para cada animal estudado.

3.4.3 Cálculo da relação entre as áreas luminal e da parede das arteríolas (relação L/W)

A quantificação da relação entre as áreas luminal e da parede das arteríolas foi realizada em secções transversais das arteríolas do interior do corpo carotídeo, conforme procedimento descrito previamente (Rivero et al., 2005). Resumidamente, com o emprego do mesmo procedimento de amostragem dos cortes, um total de 5 cortes por corpo carotídeo foi selecionado. Em um aumento de 1000x, contido num retículo de $900\mu\text{m}^2$ de área total neste aumento, as arteríolas eram colocados inteiramente dentro da área do retículo e contados os pontos atingindo a luz ou a parede das mesmas. Todas as arteríolas desse corte, cortadas transversalmente foram consideradas. Vasos transversalmente seccionados foram definidos como aqueles cuja variação dos seus respectivos diâmetros maior e menor foi $\leq$ a 10%. As áreas luminal e da parede das arteríolas foram então calculadas conforme as equações:

$$(4) \text{ Área luminal } (\mu\text{m}^2) = \text{número de pontos incidentes sobre a luz} \times 36 (\mu\text{m}^2 \cdot \text{ponto}^{-1})$$

$$(5) \text{ Área da parede } (\mu\text{m}^2) = \text{número de pontos incidentes sobre a parede dos vasos} \times 36 (\mu\text{m}^2 \cdot \text{ponto}^{-1}),$$

onde cada ponto tem uma área associada de $900\mu\text{m}^2$ (área total do retículo) dividido por 25 pontos (número total de pontos do retículo) e, portanto, igual a $36\mu\text{m}^2$.

Planilhas semelhantes a Tabela 4 foram obtidas para cada animal avaliado.

Após terem seus valores calculados, as arteríolas foram classificadas em categorias de acordo com sua área luminal, em dois grupos, cujo tamanho, obtido dividindo-se a área luminal de cada vaso pela área relativa de cada ponto, i.e., $36\mu\text{m}^2$, correspondeu ao número de pontos incidentes sobre sua luz, a saber:

- pequenas arteríolas: tamanho até 2
- médias arteríolas: tamanho entre 3 e 4

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a significância dos resultados, as médias dos diferentes grupos relativas ao volume total dos corpos carotídeos, das densidades volumétricas do espaço capilar e tecidos não parenquimatosos e da proporção relativa de células glômicas e células sustentaculares, arteríolas com hemácias foram comparadas entre si por meio de

análise de variância (ANOVA), utilizando-se como variável independente a condição experimental de cada grupo. Transformações logarítmicas foram aplicadas em casos de elevada heterocedasticidade. Múltiplas comparações foram realizadas quando houve diferença entre as médias dos grupos através do teste de Student-Newman-Keuls. No caso da relação Luz-Parede das arteríolas, tendo em vista o aumento dessa relação com o aumento da luz dos vasos, foi necessário estudar a interação entre a condição e a categorização das artérias através de modelos lineares. Nesse caso, utilizou-se como variável dependente as médias dos valores absolutos da relação L/W de cada grupo. E como variáveis fixas as condições dos grupos de tratamento (2,4 ATA-3hs, 2,4 ATA-6hs, 3,0 ATA-6hs e controle), dois indicadores de tamanho dos vasos e o termo de interação entre condição de tratamento e tamanho, em virtude do grau de heterocedasticidade encontrado na variável analisada. Quando uma diferença estatística foi detectada, aplicou-se o teste de Spjotvoll e Stoline para comparações múltiplas. Em todos os testes, um nível de significância de 5% foi adotado. O pacote estatístico empregado foi STATISTICA v. 5.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE QUALITATIVA

Para a análise qualitativa, tanto dos pulmões quanto dos corpos carotídeos, foram incluídos os resultados de estudo preliminar realizado com ratos expostos a 2,4 ATA por apenas 3 horas.

4.1.1 Pulmões

Não fez parte deste trabalho analisar a histologia pulmonar de ratos expostos à oxigenoterapia hiperbárica uma vez que a mesma já foi extensivamente estudada e existe uma enorme quantidade de publicações à respeito. Para uma revisão do assunto, consultar Kapanci et al. (1969), Clark e Lambertsen (1971a), Clark (1982) e Crapo (1986) e referências lá contidas. Apenas com o intuito de obtermos um parâmetro da dose efetivamente aplicada aos animais expostos a hiperóxia hiperbárica, os pulmões dos animais foram examinados sob microscopia óptica.

Na Figura 2 encontram-se fotomicrografias representativas dos pulmões de animais tratados com doses diferentes de oxigênio, além do grupo controle mantido em ar ambiente. Percebe-se nitidamente nos pulmões dos animais de todos os grupos expostos ao oxigênio uma congestão vascular em relação ao grupo controle e a presença de recrutamento alveolar de neutrófilos e macrófagos, eventualmente eosinófilos e aumento do espaço intersticial alveolar às custas de um aumento da celularidade. Estas alterações se tornam cada vez mais marcantes com o aumento da dose de oxigênio empregada, de 3 para 6 horas de exposição a 2,4 ATA e mais ainda no grupo exposto a 3,0 ATA por 6 horas, chegando a presença de importante edema alveolar, às vezes com hemorragias intersticiais e intra-alveolares e áreas de atelectasia nesse último grupo. Interessante notar a existência de uma inflamação pulmonar incipiente já no grupo exposto à dose mais baixa de O₂, 2,4 ATA por 3 horas (Fig. 2B).

4.1.2 Corpo carotídeo

O corpo carotídeo do rato está situado bem próximo ao gânglio cervical superior, mas tendo em vista seu tamanho minúsculo, não é normalmente visível nem sob visualização com microscópio de dissecação (McGregor et al., 1984). Por conta disso, não foi possível obtermos qualquer impressão macroscópica do seu aspecto, seja nos animais controles, seja naqueles submetidos à hiperóxia hiperbárica, uma vez que dado o caráter agudo da intoxicação imposta, não se poderia esperar qualquer aumento do seu tamanho, conforme já foi demonstrado em casos de hipóxia crônica (Edwards et al. 1970; Laidler e Key, 1975; McGregor et al., op. cit.).

A Figura 3 apresenta fotomicrografias obtidas dos corpos carotídeos de animais de todos os grupos. Chama a atenção a presença de grandes capilares de forma sinusoidal, distribuídos difusamente por todo o órgão, dos quais aqueles situados nos polos do órgão apresentam uma congestão importante, verificada tanto nos animais controles, mas principalmente nos animais expostos à hiperóxia hiperbárica. Entretanto, nos animais expostos à dose mais acentuada (3,0 ATA-6hs), a congestão capilar passa a ser visível também nos cortes da região mediana do órgão, indicando um maior fluxo de sangue e não apenas de plasma por todas as regiões do parênquima glômico carotídeo. Também foi notável a presença de vasoconstrição arteriolar, a qual pôde ser verificada em todos os grupos tratados e visualizada na Figura 4B. Diferentemente do observado à nível dos capilares, as arteríolas apresentam-se bem menos congestionadas no grupo exposto à dose mais elevada de O₂ (não visualizado). Ainda na Figura 3 pode ser observada com relativa frequência a presença de corpos celulares de neurônios, presentes principalmente na sua periferia e, mais raramente, situados no interior do órgão (Fig. 4).

O parênquima apresenta-se com aspecto semelhante em todos os grupos, tratados e controle, com clusters de células glômicas envoltos por células sustentaculares distribuídas perifericamente, mas sem a formação de lóbulos (Fig. 4). Algumas regiões, no entanto, mostram traves de estroma conjuntivo, formando septos apenas evidentes na região em que o feixe vâsculo-nervoso, quando presente, ou ramos arteriais ou nervosos isolados adentram o órgão, circundando-os até o interior do parênquima glomerular carotídeo (Fig. 3D). Entretanto, no grupo que recebeu a maior dose de O₂, pode ser notada a presença de um espessamento da região do estroma intersticial, difusamente distribuído, porém mais nítido na periferia do órgão (Fig. 4D). Nos seus pólos, o aumento dessa região quase imita uma lobulação dos clusters (Fig. 3G), muito embora o volume total dos corpos carotídeos desses animais não se mostrou significativamente maior em relação aos demais (vide adiante).

Ainda na Figura 4, observa-se dentro dos clusters a presença de células glômicas com aspecto semelhante às variantes descritas em outras espécies quando coradas em HE. Com a coloração hemotoxilina-fucsina-toluidina (HFT) empregada neste estudo, vêem-se células com núcleos grandes, mas não maiores que das outras variantes, fracamente corados, com cromatina pouco condensada e um citoplasma abundante, normalmente apresentando múltiplas áreas pálidas pequenas com aparência de vesículas, eventualmente vacuolizado. Esta variante foi classificada nesse estudo como célula clara. Em maior quantidade vêem-se células com núcleos mais fortemente corados, com cromatina mais condensada e citoplasma de características semelhantes às células anteriores, às vezes um pouco mais corados, mas com um aspecto vacuolar mais freqüente, tendo sido classificadas como células escuras. Por fim, encontramos algumas células com núcleos menores, com extrema basofilia e intensamente corados, semelhantes à variante de células progenitoras, descrito em outras espécies. As três variantes celulares foram encontradas tanto nos animais controles quanto nos 3 grupos expostos à hiperóxia hiperbárica. Contudo, a maioria das células glômicas dos animais expostos a partir da dose intermediária apresenta áreas claras no citoplasma, sugerindo a presença de edema intracelular que se intensifica nas células expostas à dose mais elevada de O_2 , as quais se apresentam com seus limites celulares imprecisos e citoplasma desarranjado, com a presença de grandes espaços intracelulares.

Eletron-micrografias foram obtidas dos grupos controle e exposto a 3,0 ATA de O_2 . À microscopia eletrônica, é visível a perda de cristas mitocondriais nas células glômicas dos animais tratados com altas doses de O_2 (Fig 5). Processo semelhante foi observado em algumas terminações nervosas, embora nestas últimas, as mitocôndrias pareceram um pouco melhor preservadas. Esta característica pode ser mais bem visualizada na Figura 6, que mostra além das lesões mitocondriais, a presença de um corpo multivesicular e estruturas alongadas pequenas com dupla membrana, que aparentam um início de formação de vacúolo autofágico. Ainda nesta figura nota-se a presença de edema intracelular, bem visível ao redor da membrana nuclear. Outra característica da ultraestrutura dos corpos carotídeos desse grupo é uma maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso (REG) e um aspecto mais vesicular do Golgi, o qual não chega a formar verdadeiras cisternas. Chama a atenção a presença de grande quantidade de REG nas células do tipo II, com aspecto bem estruturado (Fig 5). Os núcleos das células glômicas do grupo exposto a 3,0 ATA de O_2 apresentaram uma heterocromatina mais condensada e parcialmente aderida à membrana nuclear, embora em algumas células, a

cromatina mostra um aspecto pálido e disperso (não visualizado). Por fim, além da grande quantidade de hemácias no interior dos capilares, a microscopia eletrônica desse grupo revelou a presença de um endotélio íntegro, que pode ser visualizado na Figura 7. A presença de plaquetas dentro do capilar, normalmente não visualizadas, é uma característica comumente encontrada na intoxicação pulmonar pelo oxigênio.

Interessantemente, alguns dos espaços intracelulares visualizados na microscopia óptica revelaram-se como uma região de citoplasma aparentemente envolvendo outra célula glômica, de citoplasma menos elétron-denso e totalmente envolvido por membrana plasmática, num aspecto que lembra uma célula de Schwann envolvendo seu axônio (Fig. 7). A presença de núcleos em ambas as células e vesículas com núcleo elétron-denso, sugere que sejam realmente duas células glômicas. Na realidade existem prolongamentos citoplasmáticos entre as duas células, não visualizado na figura, provavelmente oriundos de células sustentaculares, mas é nítida a diferença entre ambas as células, a mais clara aparentando um grau maior de deterioração.

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

4.2.1 Volume dos corpos carotídeos

A Tabela 5 apresenta os resultados do volume total dos corpos carotídeos dos animais utilizados neste estudo. Não houve diferença significativa entre os volumes dos corpos carotídeos dos animais expostos às doses mais elevadas em relação aos animais controles. O volume médio dos corpos carotídeos destes últimos foi de $81,54 \pm 3,76 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, enquanto dos animais tratados à 2,4 ATA e 3,0 ATA, ambos por 6 horas foram, respectivamente, $78,84 \pm 3,76 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ e $79,38 \pm 6,67 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. Esses resultados são melhor visualizados na Figura 8.

4.2.2 Densidade volumétrica dos capilares e do estroma intersticial

Na tabela 6 encontram-se os valores das médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial para os animais controles. Para os capilares com hemácias os valores variaram de 0,072 a 0,172, com um valor médio da densidade de capilares com hemácias para os animais controles igual a

0,140 $\pm$ 0,013 (Tab. 9). Para o espaço capilar total, estiveram entre 0,108 e 0,208, com uma média de 0,166 $\pm$ 0,013 e para o estroma intersticial, entre 0,144 e 0,268 com média de 0,186 $\pm$ 0,013 (Tab. 9).

Os valores das médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial para os animais tratados com O₂ a 2,4 ATA por 6 horas são mostrados na Tabela 7. Neste grupo, as médias de capilares com hemácias obtidas estiveram entre 0,064 e 0,14, com um valor médio para o grupo igual a 0,106 $\pm$ 0,011 (Tab. 9). Para o espaço capilar total, variaram de 0,112 a 0,168, com uma média de 0,146 $\pm$ 0,012, ao passo que para o estroma intersticial foram obtidos valores entre 0,168 e 0,228, com média de 0,201 $\pm$ 0,013 (Tab. 9).

Para o grupo de animais tratados com O₂ a 3 ATA por 6 horas, os valores das médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial encontram-se na Tabela 8. Neste grupo os valores encontrados para a densidade volumétrica de capilares com hemácias variaram de 0,116 a 0,28, com média de 0,192 $\pm$ 0,015 (Tab. 9). Já para o espaço capilar total as densidades estiveram entre 0,148 e 0,28 e média 0,212 $\pm$ 0,015, enquanto para o estroma intersticial, entre 0,112 e 0,256, com média de 0,197 $\pm$ 0,014 (Tab. 9).

A Tabela 9 resume as comparações entre as médias da densidade volumétrica dos capilares preenchidos por hemácias, do total dos espaços capilares e do estroma intersticial dos corpos carotídeos dos diferentes grupos, as quais podem ser visualizadas na Figura 9. Houve um aumento significativo do volume proporcional dos capilares com hemácias na dose mais elevada (3,0 ATA, 6hs) em relação aos outros grupos ($p < 0,01$). Curiosamente, houve uma diminuição da densidade volumétrica desses capilares no grupo intermediário (2.4 ATA-6h), embora não significativa em relação grupo controle ($p > 0,05$). Por outro lado, computados todos os espaços capilares em conjunto, com e sem hemácias, houve novamente um aumento significativo no grupo exposto à dose mais elevada em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

Os valores obtidos das densidades volumétricas relativas ao estroma intersticial revelaram um aumento em ambos os grupos tratados, mas a diferença não se mostrou significativa ($p > 0,05$).

4.2.3 Avaliação do grau de vasoconstrição arteriolar – relação Luz-Parede (L/W)

Na avaliação desse parâmetro, foram incluídos também os dados relativos ao grupo exposto à dose mais baixa de O_2 , 2,4 ATA por 3 horas, na tentativa de verificar a existência de possível correlação entre a dose de oxigênio utilizada e o grau de vasoconstrição arteriolar.

Em virtude do fato da relação entre a luz e a parede das arteríolas e artérias tender a aumentar com o aumento da luz do vaso, as arteríolas intraglomerulares encontradas foram classificadas conforme o tamanho de sua área luminal. Tendo em vista o grau de heterocedasticidade encontrado, foi testada a interação entre o tamanho das arteríolas e a dose de hiperóxia oferecida aos animais, a qual se mostrou significativa ($p < 0,05$). Dessa maneira, os valores de cada categoria de tamanho devem ser analisados separadamente.

As médias dos valores da relação L/W para arteríolas pequenas e médias obtidas neste trabalho encontram-se discriminadas na Tabela 10. Pode ser notada uma redução da luz arteriolar com a exposição hiperóxica em ambas categorias, cujas médias decresceram de $0,484 \pm 0,049$, no grupo controle, para $0,299 \pm 0,026$ no grupo exposto à dose mais elevada para as arteríolas pequenas, ao passo que para as arteríolas médias, as médias decresceram de $0,86 \pm 0,169$, nos controles, para $0,348 \pm 0,069$ nos corpos carotídeos dos animais expostos a 3 ATA de O_2 por 6 horas. Portanto, a redução ocorreu de maneira muito mais importante nas arteríolas maiores. Nesses vasos, a relação luz-parade mostrou-se significativamente menor, em todos os grupos testados, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Porém, entre os grupos testados, não houve diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Em relação às arteríolas menores, houve redução luminal significativa, quando comparada ao grupo controle, apenas no grupo exposto a 3,0 ATA de O_2 por 6 horas ($p < 0,05$). Em ambas categorias de arteríolas, a redução da luz mostrou uma tendência de proporcionalidade com o aumento da dose, que pode ser visualizada na Figura 10, embora os resultados tenham sido significativos apenas no caso dos vasos mais calibrosos.

4.2.4 Avaliação das proporções celulares

Inicialmente foram obtidos valores médios das densidades numéricas de cada variante de células glômicas, do total dessas células e das células sustentaculares, os quais se encontram discriminados nas Tabelas 11 a 13.

Pela Tabela 11 verifica-se que a densidade numérica de células claras, escuras e progenitoras para os animais controles variaram de 0,018 a 0,045, 0,053 a 0,093 e 0,025 a 0,032 respectivamente. As médias respectivas dessas densidades foram $0,027 \pm 0,002$, $0,067 \pm 0,003$ e $0,028 \pm 0,002$. Ainda na Tabela 11, pode ser notado que a densidade numérica do total de células glômicas esteve entre 0,104 e 0,166, ao passo que das células sustentaculares, entre 0,038 e 0,070, cujas médias foram, respectivamente, de $0,122 \pm 0,005$ e de $0,054 \pm 0,003$.

Para o grupo de animais expostos a 2,4 ATA por 6 horas, os valores se encontram na Tabela 12 que mostra uma variação da densidade numérica das células claras, escuras e progenitoras entre 0,026 e 0,045, 0,06 e 0,081 e 0,012 e 0,023 respectivamente. As médias obtidas para essas três variantes celulares foram $0,035 \pm 0,002$, $0,072 \pm 0,003$ e $0,017 \pm 0,002$. Em relação ao total de células glômicas, as médias das densidades numéricas estiveram entre 0,104 e 0,145, com média de $0,124 \pm 0,005$. E para as células sustentaculares, entre 0,051 e 0,067, com média de $0,059 \pm 0,003$.

Já para o grupo exposto à dose mais elevada, 3 ATA de O_2 por 6 horas, as médias das densidades numéricas para as células claras, células escuras e células progenitoras variaram de 0,014 a 0,032, 0,059 a 0,067 e 0,012 a 0,03 (Tab. 13), com médias de $0,026 \pm 0,002$, $0,062 \pm 0,002$ e $0,022 \pm 0,002$ respectivamente. A densidade numérica do total de células glômicas para esse grupo esteve entre 0,091 e 0,117, enquanto para as células sustentaculares, entre 0,028 e 0,068, com médias respectivas de $0,109 \pm 0,003$ e $0,05 \pm 0,003$.

As médias acima serviram de base para o cálculo das proporções das três variantes celulares, bem como da proporção do total de células glômicas e células sustentaculares em cada grupo analisado. Na Tabela 14 encontram-se resumidos os resultados que apontaram uma variação da proporção média das células claras entre os grupos de $0,152 \pm 0,011$, no grupo controle e $0,191 \pm 0,014$, para o grupo exposto a 2,4 ATA de O_2 . Entre as células escuras a proporção menor esteve no grupo controle, igual a $0,381 \pm 0,018$ e a maior, igual a $0,394 \pm 0,013$, no grupo exposto a 3 ATA de O_2 , ao passo que as células progenitoras variaram de $0,092 \pm 0,012$, no grupo exposto à dose menor de O_2 (2,4 ATA-6hs), a $0,158 \pm 0,014$ nos controles. Com isso, o total de células glômicas variou na proporção de $0,675 \pm 0,018$, no grupo 6hs-2,4 ATA, para uma proporção maior no grupo exposto à dose mais elevada, igual a $0,692 \pm 0,016$. De maneira que a variação da proporção respectiva das células sustentaculares esteve entre $0,308 \pm 0,016$ neste

último grupo até o valor mais elevado, de $0,325 \pm 0,018$, obtido no grupo exposto à dose menor de oxigênio.

Comparando-se esses valores, foi verificado que não houve diferença significativa na proporção de células sustentaculares, nem no número total de células glômicas em nenhum dos grupos estudados ($p > 0,05$). As células escuras foram preponderantes em todos os grupos, inclusive no grupo controle, com um aumento não significativo em direção ao grupo exposto a maior dose de O_2 ($p > 0,05$). Por outro lado, houve uma redução da proporção de células progenitoras, significativa apenas no grupo intermediário (2,4 ATA-6hs), tanto em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) quanto em relação ao grupo exposto a dose mais elevada ($p < 0,01$). Similarmente, houve um aumento significativo na proporção de células claras quando comparadas aos outros grupos ($p < 0,05$), embora o grupo exposto a 3 ATA de O_2 também apresentou um aumento da proporção dessas células, mas não significativo.

5. DISCUSSÃO

5.1 EFEITOS TÓXICOS DO OXIGÊNIO SOBRE A HISTOLOGIA PULMONAR

Pelo fato do pulmão ser o órgão diretamente exposto às maiores pressões parciais de O_2 , é de se esperar que seja um dos mais fortemente acometidos. Se a exposição se prolongar em doses elevadas de oxigênio a evolução será fatal, a menos que haja redução da PO_2 inspirada a um nível não tóxico, interrompendo a evolução do processo (van den Brenk e Jamieson, 1962; Crapo, 1986). Não só são observadas alterações estruturais, como também desarranjos do metabolismo celular, levando a alterações funcionais com prejuízo progressivo da função pulmonar, hipercapnia, acidose e hipoxemia paradoxal, uma vez que a captação de O_2 se torna cada vez mais prejudicada (Clark e Lambertsen, 1971a). Um aumento posterior da PO_2 inspirada induz uma acentuação do quadro tóxico que será ultimamente fatal, sendo assim considerada uma hipoxemia hiperóxica (Bean e Bohr, 1940; Clark e Lamberten, op. cit.). No caso, as células mais acometidas são as células endoteliais dos capilares pulmonares e as células epiteliais do revestimento alveolar, tanto os pneumócitos tipo I quanto os do tipo II, embora de maneiras diferentes (Clark e Lambertsen, op. cit.).

Em exposições abaixo de 1 ATA as lesões pulmonares podem não ser tão acentuadas a fim de causar a morte do indivíduo, mas, ao invés disso, induzir o desenvolvimento de alterações que de forma secundária aumentam a tolerância a futuras exposições ao O_2 (Adamson et al., 1970; Crapo, op. cit.). São doses sub-letais que, apesar da sobrevivência do animal à exposição, muitas vezes ocorre às custas de alterações irreversíveis na histologia pulmonar, com o aparecimento de fibrose (vide adiante).

Para Clark e Lambertsen (op. cit.) uma última fonte de variabilidade nos resultados entre os diversos autores está relacionada ao tempo decorrido para análise após a morte dos animais. Camundongos que foram expostos a O_2 a 1 ATA por 48 horas e sacrificados e autopsiados imediatamente após não apresentaram lesões pulmoares significativas. Entretanto, quando autopsiados após 3 horas de sua morte apresentavam grandes áreas de atelectasias e consolidação pulmonares, edema, congestão e hemorragias intra-alveolares à histologia bem como uma diminuição do volume pulmonar (Patel e Gowdey, 1964; Jamieson e Cass, 1967). Tais fatos são explicados em parte pelo fato da falência

respiratória ocorrer antes da falência cardíaca nos estágios finais da intoxicação pelo O_2 e a ausência de gás inerte permitiria o colapso alveolar na medida em que o O_2 , o CO_2 e o vapor d'água fossem absorvidos (Clark e Lambertsen, 1971a).

A sequência das alterações que ocorrem na histologia pulmonar já foram bem descritas em diversas espécies e admite-se que o mesmo deva ocorrer no homem, talvez apenas com pequenas diferenças no sítio inicial da lesão, à semelhança da diferença observada entre macacos e no rato. Basicamente, a lesão histológica pulmonar da intoxicação pelo oxigênio pode ser dividida em 3 fases, uma fase inicial exudativa, uma fase destrutiva e uma terceira fase proliferativa ou fibrótica (Crapo, 1986). As primeiras alterações histológicas detectáveis consistiriam de congestão capilar, agregação plaquetária e edema intersticial focal decorrente de exsudato (Barry e Crapo, 1985; Crapo, op. cit.). Estudos morfométricos e estereológicos pulmonares de Kistler et al. (1967) em ratos e de Kapanci et al. (1969) em macacos expostos a 0,99 ATA e entre 0,98 e 0,99 ATA de O_2 por períodos variando de 6 a 72 horas e de 2 a 12 dias, respectivamente, mostraram que, coincidente com o edema intersticial, as células endoteliais também se apresentam edematosas, mas ainda não há aumento do volume endotelial total ou da espessura total do espaço intersticial. No rato, tais alterações se iniciam após 24 horas de exposição ao passo que nos macacos, após o 2º dia. Desse ponto em diante, a reação pulmonar segue cursos paralelos, porém com algumas diferenças importantes.

Em ratos, a evolução da lesão atinge principalmente o endotélio capilar e, após 48 horas de exposição, a microscopia eletrônica revela edema intersticial generalizado, infiltração neutrofílica incipiente, recrutamento de macrófagos e início de destruição das células endoteliais capilares (Barry e Crapo, 1985). Segundo Klistler et al. (op. cit.), o espaço intersticial tem sua espessura média dobrada, mas a espessura média do endotélio e do epitélio alveolar ainda é normal, bem como o volume e a área de superfície capilar, o que faz com que a espessura média da membrana alvéolo-capilar e a resistência estimada à difusão sofra um ligeiro aumento. Os pulmões apresentam-se com pequena quantidade de efusão pleural. Ao serem trazidos de volta ao ar ambiente, os animais apresentam graus variados de dispnéia. Tem início a fase destrutiva, cujo prolongamento da exposição acarretará, após 72 horas de exposição contínua ao O_2 , extensa destruição das células endoteliais capilares, em algumas áreas totalmente ausentes. Hemácias distorcidas e fragmentadas são vistas na luz dos capilares alveolares, enquanto o edema intersticial cede lugar a uma infiltração celular neutrofílica

intensa, fragmentos de plaquetas e outras células e material fibrinoso. Os pulmões apresentam um abundante exsudato pleural parcialmente hemorrágico. Nessa fase, os animais mostram-se severamente dispnéicos em ar ambiente, alguns morrendo minutos após respiração a ar. A análise morfométrica desses animais mostra um aumento de 3 vezes da espessura média do espaço intersticial e de 50% da espessura do epitélio alveolar associado a uma hiperplasia celular tanto de pneumócitos tipo I quanto tipo II, enquanto a espessura média do endotélio se reduz em 60%, com uma diminuição para menos da metade do volume capilar e da área de superfície, devido à destruição das células endoteliais já citada. Nesse momento, a espessura média da membrana alvéolo-capilar encontra-se praticamente duplicada, diminuindo a capacidade estimada de difusão para apenas 25% do seu valor normal, em contraste aos 80% observados após 48 horas. A área de superfície total alveolar não apresenta alteração significativa, mas 65% do espaço aéreo alveolar encontra-se obliterado por edema. Após ter seu valor corrigido pela obliteração edematosa dos alvéolos, a capacidade estimada de difusão é de apenas 9% nessa fase.

Por outro lado, após 48 horas de exposição ao oxigênio, a progressão da lesão pulmonar no macaco se caracteriza por uma destruição intensa do pneumócito tipo I do epitélio alveolar, cerca de 90% no 4º dia, com áreas expostas da membrana basal, às vezes recoberta por material fibrinoso, o que provoca uma diminuição de 1/3 do volume epitelial total e metade da espessura epitelial média em relação aos controles (Kapanci et al., 1969). Similarmente aos ratos, o volume intersticial total encontra-se aumentado em 40 % às custas de edema. As células endoteliais apresentam-se edemaciadas, mas não há propriamente destruição das mesmas, induzindo um ligeiro aumento do volume total e da espessura média endoteliais. Da mesma forma, há um aumento de 2,5 vezes do volume relativo de pneumócitos tipo II. Todas essas alterações acabam por aumentar levemente a espessura total da membrana alvéolo-capilar. No 7º dia de exposição, há uma majoração das alterações acima. 95% do epitélio alveolar é formado por pneumócitos tipo II, ao invés de 15% nos controles, cobrindo em torno de 80% do revestimento dos septos alveolares. Com isso, o volume epitelial total e a espessura epitelial média encontram-se aumentadas em 30 e 300%, respectivamente.

Nessa fase, já há uma destruição também do endotélio capilar, com diminuição do volume relativo (volume endotelial total por unidade de volume de tecido) a cerca da metade dos controles. Entretanto, a área de superfície e o volume capilar total não se alteram devido à dilatação de alguns vasos restantes. Também o espessamento

intersticial ocorre não somente por edema, mas também pela presença de infiltrado leucocitário e alguns focos hemorrágicos, levando a um aumento de 80% da espessura intersticial média e duplicando a espessura da membrana alvéolo-capilar. Interessantemente, nota-se a presença de fibroblastos no espaço intersticial, algo que não ocorre em ratos. Esse fato demonstra que provavelmente a lesão pulmonar evoluirá para algum grau de reparação. De fato, a fase proliferativa se prolonga e se acentua no 12º dia e agora 100% do epitélio alveolar é constituído por pneumócito tipo II, provocando um aumento de quase 22 vezes no seu volume relativo, bem como um aumento de 7 vezes da espessura epitelial média. A espessura do interstício também aumenta 2,5 vezes, mas agora metade do seu volume é ocupado por células, além de uma diminuição da quantidade de edema e um aumento de fibras colágenas. Isso tudo somado causa um aumento da barreira ar-sangue alveolar e da resistência estimada de difusão em 3 a 4 vezes em relação ao seu valor controle. A resolução desse quadro será o desenvolvimento de fibrose pulmonar (Clark e Lambertsen, 1971).

Em vista dos trabalhos anteriores, pode-se concluir que uma fase inicial exsudativa é comum em ambas espécies, com aparecimento de edema intersticial localizado e do endotélio, associado à congestão capilar e agragação plaquetária (van den Brenk e Jamieson, 1962; Clark, 1982; Crapo, 1986). A essa fase segue-se uma reação de destruição e aumento do edema intersticial, progredindo francamente para edema e hemorragias intra-alveolares. Entretanto, enquanto no rato a destruição ocorre basicamente ao nível do endotélio capilar, com uma posterior progressão da lesão para o pneumócito, mesmo assim não tão acentuada a ponto de destruir a integridade epitelial, mas permitindo o aparecimento de hemorragias no interior do alvéolo (van den Brenk e Jamieson, op. cit.), no macaco há uma destruição maciça do epitélio alveolar, sobretudo dos pneumócitos tipo I associado a uma proliferação de pneumócitos tipo II, na tentativa de ocupar os espaços deixados pelos primeiros a fim de manter intacto o revestimento alveolar (Clark e Lambertsen, 1971a; Kapanci et al., 1969). Nestes últimos também se observa uma destruição do endotélio, mas que ocorre simultaneamente à lesão epitelial e não chega a ser tão intensa a ponto de diminuir significativamente o volume e a área de superfície capilar como ocorre no rato. Camundongos também demonstram um desenvolvimento similar de lesão hiperóxica (Smith, 1985).

Por fim, com a continuidade da exposição ao O₂ a evolução do quadro pode seguir dois caminhos distintos: ou a lesão destrutiva provoca a morte do animal, por falência respiratória, ou o animal sobrevive a esta fase e entram em ação mecanismos

reparadores da lesão celular, com resolução parcial do exsudato alveolar prévio, proliferação intensa de pneumócitos tipo II, aparecimento de fibroblastos no interstício e aumento de fibras colágenas, evoluindo para um quadro de fibrose intersticial com recuperação ou com o desenvolvimento de tolerância ao oxigênio (Yamamoto et al., 1970; Deneke e Fanburg, 1980; Klein, 1990). É interessante notar que embora se proliferem intensamente, os pneumócitos tipo II não mantêm sua capacidade funcional intacta, pois o surfactante secretado não apresenta características funcionais normais (Holm et al., 1985). Curiosamente, Barry e Crapo (1985) observaram que a fase destrutiva se associa com um recrutamento maciço de polimorfonucleares para o espaço intersticial, mas o mesmo não ocorre quando a evolução do quadro progride para uma fase proliferativa. Smith (1985), entretanto, constatou que não é necessária a presença de neutrófilos para o início da lesão tóxica pulmonar pelo oxigênio.

Outros estudos mostraram que apenas os macacos que sobreviveram à intoxicação pelo O_2 desenvolveram este padrão, seja por uma resistência inerente à intoxicação pulmonar pelo O_2 (Weir et al., 1965), seja por exposições a pressões parciais de O_2 mais baixas (Robinson et al., 1967). Também em ratos sobreviventes, expostos a uma PO_2 menor, igual a 0,92 ATA este padrão pôde ser observado (Schaffner et al., 1967). Em camundongos expostos a 0,85 ATA de O_2 também foram observados padrões semelhantes nos indivíduos sobreviventes (Adamson et al., 1970). Para Kapanci et al., (1969) as diferenças entre ratos e macacos significariam uma maior suscetibilidade dos primeiros à intoxicação pelo oxigênio, pois os macacos conseguiram sobreviver por quase 2 semanas. Além disso, como a constante de tempo biológica ou a taxa de desenvolvimento da intoxicação pulmonar pelo oxigênio foi diferente entre as duas espécies, é provável que também o sejam entre os tecidos individuais dentro dos pulmões.

No homem, alterações semelhantes foram observadas em pacientes que faleceram após terapia prolongada com oxigênio. Nash et al. (1967) encontraram alterações patológicas da histologia pulmonar em pacientes que receberam oxigenoterapia e ventilação artificial, similares as fases exudativa e proliferativa observada em macacos (Kapanci et al., op cit.). A uma fase exudativa inicial, com congestão, edema e hemorragias intra-alveolares, exsudato fibrinoso e apenas um pequeno componente inflamatório crônico, seguiu-se uma fase marcada por um espessamento do septo alveolar e interlobular intenso, edema e proliferação de fibroblastos, fibrose, hiperplasia de pneumócitos tipo II, misturados com alguns componentes da fase exudativa. Outros

pesquisadores também observaram resultados semelhantes em indivíduos expostos a pressões aumentadas de O_2 (Gould et al., 1972). Em dois casos, cuja terapia com oxigênio teve de se prolongar, devido ao tratamento de uma infecção anaeróbica terminal (Fuson et al., 1965) e por lesões torácicas traumáticas, sendo mantido em ventilação assistida (Castleman e McNeely, 1967), houve deterioração progressiva da função pulmonar evoluindo para a morte de ambos indivíduos. Em ambos pacientes, os pulmões apresentavam lesões características da intoxicação pulmonar pelo O_2 observada em animais. Por outro lado, Brewis (1969) observou acentuada melhora a medida em que a concentração de O_2 foi gradualmente diminuída até níveis normais num período de 9 dias.

Neste trabalho foi testada a hipótese de que a hiperóxia hiperbárica, nas doses empregadas, provoca alterações estruturais na morfologia dos corpos carotídeos de maneira proporcional à dose utilizada, eventualmente ocasionando lesão celular ou intracelular. Dentre os objetivos da pesquisa, a análise da histologia pulmonar teve simplesmente o propósito de fornecer um parâmetro de avaliação da intensidade da dose de oxigênio empregada em cada grupo de animais testados. Portanto, não fez parte deste trabalho analisar detalhadamente a histologia pulmonar de ratos expostos à hiperoxigenação hiperbárica, uma vez que a mesma já foi extensivamente estudada e existe uma enorme quantidade de publicações à respeito, como as mencionadas acima, que devem ser consultadas para uma revisão mais completa do assunto.

Visando, por conseguinte, apenas os objetivos propostos, nos cortes histológicos dos pulmões dos animais utilizados na pesquisa, chama a atenção que, com a dose mais baixa, mas suficiente para causar atenuação da resposta ventilatória à hipóxia (RVH) em ratos (Liberzon et al., 1989) já houve sinais histológicos de intoxicação pulmonar pelo oxigênio. A presença de um leve espessamento do interstício alveolar caracterizado por um discreto infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear, ausente nos pulmões dos animais controles, seria um indício de um quadro incipiente de inflamação do parênquima pulmonar, numa situação em que clinicamente os animais não demonstraram qualquer sinal de estresse respiratório (Fig. 2). Ainda que tais alterações devam ser reversíveis, esses achados mostram que não se deve esperar por sinais clínicos para que seja suspeitada a presença de intoxicação pulmonar em situações de hiperóxia. E cuidados e precauções devem ser tomadas no sentido de evitá-la, ou ao menos minimizá-la, como por exemplo, o emprego de exposições intermitentes com respiração a ar, que comprovadamente reduz o efeito tóxico do O_2 (Clark e Fisher, 1977; Hendricks et al., 1977; Clark et al., 2006).

Mas, mais que isso, sugerem que a evolução da lesão pulmonar caminhará provavelmente para uma fase destrutiva caso a exposição se prolongue, cuja continuidade os levaria, inevitavelmente, à morte, o que pôde ser confirmado pelas exposições subseqüentes. Houve um agravamento progressivo do quadro histopatológico nos outros dois grupos tratados, mais nítido naquele cuja dose de O₂ foi maior (3 ATA por 6 horas), com o aparecimento de áreas de atelectasia e edema alveolar, às vezes com hemorragias intralveolares e aumento importante do interstício às custas de uma celularidade bem elevada (Fig. 2G,H). Conseqüentemente, a espessura da barreira alvéolo-capilar aumentou, sugerindo um prejuízo na relação ventilação-perfusão e provavelmente na capacidade de difusão alveolar-arterial. Pode-se concluir, portanto, que as exposições de oxigênio utilizadas no presente trabalho foram suficientemente elevadas a ponto de causar lesão estrutural pulmonar, de maneira progressiva com o aumento da dose e plenamente compatíveis com a literatura à respeito (Clark e Lambertsen, 1971a; Deneke e Fanburg, 1980; Clark, 1982; Crapo, 1986; Klein, 1990). Mais importante ainda, sugerem fortemente que altas tensões arteriais de oxigênio foram alcançadas, atingindo certamente os corpos carotídeos com elevada PaO₂. Parece assim claro que as doses empregadas podem ser consideradas suficientes para causar lesão em qualquer célula ou tecido que possa ter sido suscetível, atendendo aos propósitos iniciais.

5.2 EFEITO DA HIPERÓXIA SOBRE A CIRCULAÇÃO GLÔMICA CAROTÍDEA

A regulação do fluxo sanguíneo periférico ocorre basicamente por meio de mecanismos neurais, humorais e intrínseco local. Segundo Guyton (2000), o sistema nervoso autônomo (SNA), principalmente o simpático, é o responsável pelo controle neural vasomotor, na imensa maioria das vezes causando um efeito vasoconstrictor, através da estimulação de receptores alfa presentes na membrana das células musculares lisas das paredes dos vasos, principalmente alfa1, embora receptores alfa2 sejam encontrados nas arteríolas coronárias e renais e nas veias sistêmicas (Hoffman e Taylor, 2003). A preponderância do simpático sobre a circulação é evidente e a regulação nervosa do fluxo é controlada quase que exclusivamente por ele. O tônus simpático normal mantém os vasos ligeiramente contraídos, o que permite que os mesmos sejam ainda mais contraídos em caso de estimulação simpática, aumentando a resistência vascular periférica, ou possam se dilatar, quando da sua inibição (Guyton, op. cit.).

A distribuição da inervação simpática sobre os vasos sanguíneos atinge praticamente todos os vasos, em maior quantidade sobre os vasos de menor calibre (artérias pequenas e arteríolas), sendo os principais responsáveis pela determinação da resistência vascular periférica e não por acaso, denominados de vasos de resistência (Milnor, 1978b). Mas atinge também as veias, as quais abrigam a maior quantidade do volume sanguíneo total do organismo, em torno de 64% (Milnor, 1978a), sobretudo as mais calibrosas, onde exerce importante função no controle do retorno venoso do sangue ao coração e por isso chamados de vasos de capacitância (Milnor, 1978b). Entretanto, a inervação autônoma dos vasos poupa a maioria dos vasos pré-capilares que formam os chamados canais preferenciais, as metarteríolas, ramificações das arteríolas com células musculares lisas em sua parede distribuída de maneira descontínua; os esfíncteres pré-capilares e os capilares propriamente ditos (Guyton, 2000). Mas as anastomoses artériovenosas (AV), curtos vasos comunicantes envoltos por uma importante camada muscular, são intensamente innervadas (Milnor, 1978a,b). Os músculos não possuem anastomoses AV, mas contêm capilares de alto fluxo que fazem a mesma função (Cain, 1983).

O parassimpático tem apenas uma participação muito pequena e quase inexistente, atingindo apenas as arteríolas de algumas áreas restritas, como as glândulas salivares, a pele e mucosas, sobretudo da face, o cérebro, os pulmões, a musculatura esquelética e as arteríolas coronárias. Excetuando-se nestas últimas, nas arteríolas da região da face e das glândulas salivares, a vasodilatação colinérgica parassimpática nos demais locais tem importância fisiológica questionável (Hoffman e Taylor, 2003; Guyton, 2000). A dilatação parassimpática coronariana (e provavelmente em todos os vasos) necessita de um endotélio íntegro, pois na presença de um endotélio lesado, a estimulação parassimpática causa ligeira constrição (Hoffman e Taylor, op. cit.). A acetilcolina liberada por essas fibras parece atuar sobre as células endoteliais, as quais apresentam em suas membranas celulares receptores muscarínicos do tipo M3. A ativação destes receptores leva à ativação de uma proteína da família das proteínas G, a qual induz a produção e liberação de óxido nítrico que se difunde do endotélio para a musculatura lisa adjacente, provocando dilatação (Hoffman e Taylor, op. cit.; Furchgott, 1999). Foi observado também que a ação vasodilatadora de ésteres da colina envolve a participação de diversos locais de ação, incluindo não só os receptores muscarínicos endoteliais da vasculatura innervada, mas também receptores inibitórios colinérgicos de vasos sem inervação, sinapses inibitórias pré-juncionais das fibras simpáticas e

receptores muscarínicos colinérgicos pré-juncionais provavelmente presentes nas fibras simpáticas vasoconstrictoras (Steinsland et al., 1973; Furchgott, 1999).

Entretanto, nas arteríolas da musculatura esquelética, além da inervação simpática adrenérgica normal com atuação sobre receptores alfa, há também uma inervação simpática vasodilatadora, que em mamíferos inferiores seria colinérgica (Hoffman e Taylor, 2003). Nos primatas, provavelmente essa inervação não é colinérgica, mas sim adrenérgica vasodilatadora, com liberação de adrenalina ao invés de noradrenalina, a qual atua sobre os receptores beta2 das células musculares lisas, provocando vasodilatação (Guyton, 2000). Receptores beta2 vasodilatadores também são encontrados nas arteríolas coronárias e pulmonares. Mesmo assim, em todos esses locais, o predomínio observado da vasodilatação é decorrente muito mais de fenômenos locais de autorregulação, discutidos adiante, do que de qualquer influência neural autônoma simpática adrenérgica, colinérgica ou parassimpática. A não ser na vigência de estimulação simpática da medular da adrenal, onde 80% da secreção é composta por adrenalina e apenas 20 % de noradrenalina (Hoffman e Taylor, op. cit.). Nessa situação, enquanto o efeito da noradrenalina liberada induz uma vasoconstrição periférica generalizada e aumento da PA, a ação da adrenalina predomina sobre as artérias coronárias, provocando um aumento de fluxo sanguíneo ao músculo cardíaco, necessário pelo aumento da carga de trabalho imposta, bem como sobre os receptores beta1 adrenérgicos localizados no próprio miocárdio, no nódulo sino-atrial e em todo o sistema de condução cardíaco, elevando a contratilidade e a excitabilidade das fibras miocárdicas, a frequência cardíaca e a taxa de condução de impulsos, respectivamente (Guyton, op. cit.). Também há predomínio da ação da adrenalina sobre os receptores beta2 arteriolares da musculatura esquelética (Goldberg et al., 1978; Hoffman e Taylor, op. cit.), causando um aumento do fluxo sanguíneo para essas regiões, preparando-os para alguma situação de esforço aumentado durante uma situação de estresse e, talvez, no início do exercício, pois durante o exercício, a atuação de mecanismos locais parece ser a responsável pela vasodilatação (Guyton, op. cit.; Goodman et al., 1978).

O resultado final é um redirecionamento do fluxo para regiões que aumentarão seu consumo metabólico nessas situações. Interessantemente, o fluxo cerebral se altera muito pouco, principalmente pelo fato da inervação simpática, apesar de estar distribuída por todos os segmentos da circulação, ser maior em alguns tecidos que em outros. Enquanto os rins, os intestinos, o baço e a pele estão sujeitos a um efeito vasoconstrictor importante, o mesmo não ocorre com os vasos cerebrais, cuja estimulação dos receptores

alfa existentes induz a um efeito constritor apenas leve (Bean et al., 1972). E também não ocorre na musculatura esquelética, onde, como visto, a estimulação beta predomina sobre a alfa (Hoffman e Taylor, 2003).

Mais recentemente se descobriu que existem outros neurotransmissores liberados em conjunto com as fibras adrenérgicas e colinérgicas ou ainda isoladamente por fibras que foram consideradas não adrenérgicas e não colinérgicas. Alguns deles demonstraram ter ação vascular como é o caso do neuropeptídeo Y, com ação vasoconstritora e o peptídeo intestinal vasoativo (PIV), com provável ação vasodilatadora (Höckfelt et al., 2000). Também o ATP satisfaz todos os critérios como neurotransmissor de fibras não adrenérgicas e não colinérgicas, tendo ação vasoconstritora, ao passo que a adenosina parece ter uma ação moduladora, inibindo a liberação do neurotransmissor por um mecanismo de feedback (Hoffman e Taylor, op. cit.). A endotelina, por sua vez, presente no interior de, provavelmente, todas as células endoteliais seria normalmente liberada em caso de lesão do endotélio, causando potente efeito vasoconstritor com apenas nanogramas de quantidade, prevenindo o aumento do sangramento nessa situação (Guyton, 2000). No SNC, entretanto, a endotelina parece provocar um efeito vasoconstritor máximo nas artérias cerebrais apenas se houver um endotélio íntegro. Esta, por sua vez, estimularia os receptores para endotelina presentes nas células musculares lisas, levando à contração muscular (Sokolovsky, 1995). Por conta disso, as endotelinas parecem exercer um papel importante na regulação do tônus vascular cerebral, se opondo ao efeito vasodilatador do óxido nítrico (Rubanyi e Polokoff, 1994).

Dentre os fatores derivados do endotélio, o óxido nítrico (ON) tem papel relevante no controle vasomotor, provocando vasodilatação principalmente ao nível das arteríolas e pequenas artérias. Muitos dos efeitos vasculares de produtos inflamatórios como a histamina, a bradicinina, a trombina, a serotonina e mesmo as purinas parecem ser mediados pelo ON, ao menos em parte (Hobbs et al., 1999). É produzido localmente pelas células endoteliais íntegras a partir do aminoácido L-arginina e do O_2 , por intermédio de uma sintase presente nos endotélios, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e por outra presente nos neurônios, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Michel e Feron, 1997; Hobbs et al., 1999; Ignarro et al., 1999). Uma terceira forma é induzida a partir da ativação celular por citocinas e endotoxinas bacterianas (iNOS) (Moncada et al., 1997). O ON tem uma meia-vida extremamente fugaz por se tratar de um gás de radical livre e, apesar de agente poluidor e tóxico, possui um papel de sinalização celular endógena de grande importância fisiológica (Moody et al, 2003). Na vasculatura,

atua sobre as células musculares lisas da parede dos vasos, por meio da ativação da guanililciclase, a qual aumenta as concentrações intracelulares de GMP cíclico (Hobbs et al., 1999; Ignarro et al., 1999). Com isso, sua liberação basal parece ter uma ação importante na manutenção do tônus vasomotor de repouso da vasculatura em geral em oposição ao tônus vasoconstrictor do sistema simpático (Huang et al., 1995; Moody et al., 2003).

Não se sabe se nesta liberação contínua há participação do tônus das fibras parassimpáticas vasculares, mas o efeito vasodilatador da acetilcolina parece também requerer a presença de um endotélio íntegro (Furchgott, 1999; Ignarro et al, op. cit.). Entretanto, a resposta vasodilatadora vagal na vasculatura pulmonar parece envolver a liberação de acetilcolina, a qual induz a um aumento na produção local de ON (McMahon et al., 1992). Além disso, um aumento do fluxo local tissular provocado pela ação de agentes vasodilatadores intrínsecos sobre a microcirculação aumenta a velocidade do fluxo nos vasos maiores à montante, provocando um aumento do atrito de cisalhamento do sangue sobre suas células endoteliais, as quais seriam contorcidas na direção do fluxo, respondendo com a liberação de quantidades aumentadas de ON (Guyton, 2000). O significado fisiológico da dilatação decorrente parece ser um suporte ao aumento do fluxo local tissular, ao diminuir a resistência ao fluxo nesses vasos. Caso isso não ocorresse, a efetividade do efeito vasodilatador sobre a microcirculação seria bem menor, uma vez que o ponto de maior resistência ao fluxo parece estar situado nas pequenas artérias prévias, as quais não são alcançadas pelos agentes vasodilatadores intrínsecos da microcirculação (Guyton, op. cit.).

Além do ON, tanto o O_2 quanto o CO_2 parecem atuar diretamente no controle vasomotor intrínseco, sobretudo de natureza aguda, ao que se denomina autorregulação (Cain, 1983). Sua enorme importância fisiológica reside no fato de que os ajustes finos do controle do fluxo necessitam estar em conformidade com as diferentes necessidades metabólicas de cada órgão ou tecido, a fim de que a carga imposta ao coração seja mantida no menor nível possível. Tanto um aumento do metabolismo quanto a ausência de um suprimento adequado de O_2 ou outro nutriente a um determinado tecido causam elevação do fluxo sanguíneo local (Guyton, op. cit.).

A teoria da falta de oxigênio é baseada na necessidade deste para a produção do ATP necessário à manutenção da contração do músculo liso vascular presente na parede das arteríolas, metarteríolas e esfíncteres pré-capilares (Moody et al., op. cit.). Estes últimos apresentam-se ou totalmente abertos ou totalmente fechados, de maneira que a

regulação do fluxo se dá pelo número de esfíncteres abertos ou fechados na unidade de tempo e do tempo que permanecem nesta situação. Foi constatado que a abertura e o fechamento dos esfíncteres pré-capilares e das metarteríolas varia ciclicamente várias vezes por minuto, em estrita relação com a demanda metabólica tecidual local, fenômeno denominado de “vasomotion”. Na sua ausência, seja por uma deficiência no suprimento de O_2 , seja por um aumento do consumo local de O_2 em virtude do aumento do metabolismo, é sensato imaginar que as células musculares simplesmente se relaxam, provocando dilatação (Guyton, 2000).

Similarmente, poder-se-ia imaginar que o mesmo possa ocorrer com as células musculares lisas das arteríolas. Em favor desta idéia, vários autores observaram que tensões arteriais elevadas de O_2 são acompanhadas de vasoconstrição arterial, cuja causa estaria provavelmente relacionada à atuação direta, seja do excesso de O_2 , seja da hipocapnia arterial resultante da hiperóxia sobre os mecanismos intrínsecos de controle vasomotor, ou ainda relacionado a uma possível descarga simpática e liberação adrenérgica pela supra-renal (Bergofsky e Bertun, 1966). A vasoconstrição hiperóxica já foi observada tanto em oxigenoterapia normobárica, com PaO_2 entre 80 e 110mmHg (Camporesi et al., 1996), quanto em oxigenoterapia hiperbárica (OHB), embora não seja igual nos diferentes tecidos, ocorrendo com maior intensidade nos rins, no cérebro, nas coronárias, na retina, nos músculos (Bergofsky e Bertun, op. cit.; Oriani et al., 1996) e em menor grau no fígado e na pele (Bergofsky e Bertun, op. cit.). Foi observada uma redução de 33% do fluxo renal a 2,0ATA de oxigênio (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998), ao passo que medidas feitas na circulação cerebral mostraram uma redução do fluxo sanguíneo cerebral em torno de 12% a 1,0 ATA e 21% a 2,0 ATA de respiração com O_2 em cães (Jacobson et al., 1963) e de 13% a 1,0 ATA de O_2 no homem (Ketty e Schmidt, 1948) ou de 24% em indivíduos respirando O_2 a 3,5 ATA sob hipocapnia (Lambertsen et al, 1953). Esse efeito constitui-se num dos mecanismos terapêuticos mais importantes do emprego da oxigenoterapia hiperbárica (OHB), ao promover a diminuição do fluxo regional e conseqüentemente do edema às custas da vasoconstrição, sem causar hipóxia isquêmica (Bean et al., 1972; Pierce e Jacobson, 1977; Camporesi et al., 1996). Por conta disso, a OHB é empregada para o tratamento de edema cerebral, lesões de esmagamento e síndrome compartimental, onde se deseja uma diminuição do edema sem o risco de diminuir a oferta de O_2 local, tendo em vista a elevada PaO_2 (Pierce e Jacobson, op. cit.; Iazzetti, 1992). Ao aliviar o edema, a OHB inverte o círculo vicioso estabelecido entre edema, isquemia, hipóxia tecidual à jusante, vasodilatação, mais

edema etc (Oriani et al., 1996). Outros pesquisadores, na presença de hiperóxia e leve hipercapnia, também observaram a presença de vasoconstrição periférica em ratos (Valimaki, 1975), coelhos (Harabin e Farhi, 1978) e cães (Harabin, 1984), confirmando a hipótese inicial de vasoconstrição periférica.

Por outro lado, Matalon et al. (1982) concluíram que a exposição de carneiros ao oxigênio a 1,0 ATA não resultou em vasoconstrição periférica significativa a ponto de causar acidose metabólica tecidual e hipoxemia que pudessem ser determinantes para a falência cardiorespiratória. Realmente, as variações que obtiveram, tanto da resistência vascular periférica (RVP) quanto do fluxo sanguíneo em órgãos individuais, não mostraram diferenças significativas. Entretanto, numa análise cuidadosa dos seus resultados, percebe-se algumas tendências que até poderiam ser consideradas significativas se o índice de significância utilizado na pesquisa não fosse menor que 0,007, um índice muito menor que o normalmente empregado de 0,05. Talvez se este nível de significância tivesse sido adotado, resultados mais significativos poderiam ter sido encontrados. De qualquer maneira, a pesquisa mostrou, como tendências, que houve um aumento progressivo da RVP total até 60 horas de exposição, caindo posteriormente com a elevação abrupta da PaCO_2 a partir deste ponto. De maneira similar, houve redução dos fluxos regionais, embora não significativa, para as três regiões do coração (endocárdio, miocárdio e epicárdio) e da musculatura esquelética do diafragma, elevando-se posteriormente até o final da exposição com a morte dos animais. Esses dados mostram que é bem provável que tenha ocorrido algum grau de vasoconstrição. No entanto, com a continuidade da exposição à hiperóxia e a falência respiratória instalada na fase terminal, o advento da hipercapnia e da acidose respiratória sobrepujou os efeitos vasoconstrictores da hiperóxia e não só provocou vasodilatação periférica, como impôs seus efeitos ao nível do SNC, aumentando a frequência respiratória, pela estimulação dos centros respiratórios e a frequência e o débito cardíaco, por meio da ativação do sistema simpático. Os próprios autores admitem que a hipercapnia severa apresentada pelos seus animais provavelmente contrabalançou os efeitos vasoconstrictores da hiperóxia.

Mesmo assim, muitos autores são adeptos da teoria do efeito direto do O_2 sobre as células musculares lisas arteriolares como mecanismo da vasoconstrição periférica (Camporesi et al., 1996), por meio de interações entre a célula endotelial e a célula muscular lisa (Camporesi et al., op. cit). A favor da vasoconstrição hiperóxica residem os fatos de que o efeito vasoconstritor se verifica apenas nos tecidos em que a PO_2 tissular é elevada, não ocorrendo em tecidos isquêmicos sob condições hipóxicas (Hunt et al.,

1977). Além disso, várias pesquisas indicaram haver um vazamento de oxigênio desde as arteríolas mais proximais (Bean et al., 1972), com relatos de gradientes de PO_2 em arteríolas de maior (80 μ m) e menor (5-10 μ m) calibre de músculos de ratos ao redor de 40% (Duling e Berne, 1970) e em músculo de hamster em torno de 27%, entre artérias maiores e as menores arteríolas (Kuo e Pitmann, 1988).

Pode-se afirmar, então, que o organismo dispõe de inúmeros meios de controle vasomotor que poderá lançar mão a fim de ajustar a oferta de O_2 e nutrientes aos tecidos frente a alterações nas suas demandas. Atualmente se admite que, de imediato, o organismo responde por meio de mecanismos neurogênicos reflexos de origem quimiorreceptora periférica, cujos impulsos aferentes atuam não somente sobre os centros respiratórios, mas também sobre os centros reguladores do sistema nervoso autônomo (Heistad e Marcus, 1978). Em caso de hipóxia, haverá uma vasoconstrição periférica generalizada em virtude da estimulação simpática, a não ser para o SNC, a fim de redistribuir o fluxo para regiões mais nobres essencialmente aeróbicas. No SNC a atuação do sistema nervoso autônomo não é muito importante, prevalecendo os mecanismos locais de autorregulação do fluxo (Cain, 1983).

A atuação neurogênica autônoma se dá, como já visto, desde os grandes vasos até as arteríolas e anastomoses arterio-venosas, poupando a microcirculação. A nível periférico, com a contração das arteríolas, menor será a parcela do débito cardíaco total a atingir determinada região e o fluxo regional diminuirá. Esta parece ser a primeira resposta evocada pelo organismo (Cain, op. cit.). O coração, dada a sua alta taxa metabólica, supera esse efeito por meio de mecanismos locais vasodilatadores e aumenta sua oferta de O_2 (Bourdeau-Martini et al., 1974). Da mesma forma, os outros tecidos periféricos também recorrerão de mecanismos locais vasodilatadores caso a hipóxia seja grave o suficiente para causar risco de morte celular (Cain, op. cit.). Principalmente a musculatura esquelética, a qual, apesar de poder suportar longos períodos de privação de suprimento energético, representa quase metade da massa corporal e gera grande demanda de O_2 (Piiper et al., 1968; Cain, op. cit.). Nessa situação o organismo já não consegue priorizar o SNC e os mecanismos locais já não favorecem sua vida com um todo.

Portanto, parece haver uma hierarquia de respostas de controle do fluxo sanguíneo periférico. Numa primeira fase, sob atuação vasoconstrictora simpática reflexa de origem hipóxica, mecanismos locais de autorregulação procuram melhorar a oferta de O_2 sem necessariamente aumentar o fluxo regional total e, portanto, não interferindo com o tônus muscular arteriolar (Cain, op. cit.). Segundo Granger et al. (1975), isso é

conseguido às custas de um sistema duplo de controle. Os vasos pré-capilares (metarteríolas nos músculos) e os esfíncteres pré-capilares (em outros tecidos) seriam mais sensíveis à queda da PO_2 local. O sistema de controle arteriolar, regulador da resistência periférica total e modulador do fluxo sanguíneo regional total seria menos sensível à PO_2 local que o controle de distribuição pré-capilar. Com a vasoconstrição hipóxica imposta, haveria uma redistribuição do fluxo, sem aumento do fluxo regional total devido ao redirecionamento do fluxo dos “shunts” anatômicos ou funcionais, normalmente abertos devido à hiperperfusão relativa, para os capilares nutrientes, por meio do fechamento dos primeiros e dilatação dos esfíncteres pré-capilares dos últimos. Com isso, a medida que a relação entre demanda e oferta de O_2 aumenta, há um aumento da área de superfície capilar efetivamente perfundida, ou seja, um aumento da densidade capilar funcional, sem interferência do fluxo regional total (Granger et al., 1975). Mas, caso não seja suficiente para suprir as necessidades locais de O_2 , a queda local da PO_2 será suficiente para se contrapor ao efeito vasoconstrictor simpático ao nível arteriolar, causando sua dilatação e aumento do fluxo regional total (Cain, 1983).

Na musculatura esquelética, no entanto, além dos mecanismos locais, a existência de fibras simpáticas dilatadoras beta-adrêrgicas (Viveros et al., 1968) parece auxiliar este mecanismo e competir com a vasoconstrição alfa-adrenérgica com níveis de hipóxia menores. Na medida em que o estímulo quimiorreceptor periférico continua em virtude da manutenção da hipóxia, estas fibras provavelmente seriam também estimuladas, pois trabalhos realizados com cães anestesiados mostraram que, na presença de beta-bloqueadores, uma vasodilatação gradual que ocorreu nos animais controles após 20 minutos de hipóxia do músculo esquelético do membro traseiro, não aconteceu até o término dos experimentos 40 minutos após, sob um mesmo nível de hipóxia (Cain e Chapler, 1979, 1982). Este efeito não parece ser importante durante o exercício (Guyton 2000), quando a ação de mecanismos locais supera a ação simpática vasoconstrictora produzindo vasodilatação (Goodman, et al., 1978). Na vigência de hiperóxia, parece que os mecanismos se invertem. Haveria uma inibição simpática e tendência ao aumento do fluxo regional e queda da resistência vascular periférica que seria contrabalançada pelo efeito local vasoconstrictor do aumento da PO_2 (Bauer et al., 1990). O resultado final é uma vasoconstrição periférica generalizada, inclusive no SNC.

No caso da circulação cerebral, a atuação do SNS é pequena, como frisado anteriormente, dada a pequena densidade de fibras autônomas que inervam os vasos do SNC, as quais quando estimuladas causam apenas ligeira vasoconstrição (Milnor, 1978b).

Por conta disso, não se verifica uma atividade simpática tônica vasoconstrictora na circulação cerebral. Na realidade, são muito poucos os agentes que provocam uma vasoconstrição significativa na circulação cerebral, basicamente tensões arteriais elevadas de O_2 e, mais intensamente hipocapnia arterial, além da endotelina uma vez que a tendência normal é de se manter um tônus basal vasodilatador (Milnor, 1978c). Nesse sentido, foi observado que a vasodilatação cerebral da hipercapnia é mais marcante que o efeito da vasoconstrição hipocápnica, provavelmente limitada a uma queda do fluxo até 40%, um limite considerado protetor, pois abaixo deste limite sintomas significativos de isquemia cerebral poderiam ocorrer (Pierce e Jacobson, 1977). Por outro lado, como já mencionado, a presença de hipóxia não leva a vasoconstrição cerebral, devido à predominância dos mecanismos locais de autorregulação do fluxo sanguíneo. Foi observado que a respiração a 10% de O_2 provocou vasodilatação e aumento do fluxo cerebral em 35% (Pierce e Jacobson, op. cit.). Outros autores também observaram vasodilatação cerebral na presença de hipóxia (Ketty e Schmidt, 1948; Lassen, 1959). Ao passo que a inalação de O_2 puro causou vasoconstrição com redução do fluxo sanguíneo cerebral em torno de 12% a 1,0 ATA e 21% a 2,0 ATA em cães (Jacobson et al., 1963) e de 13% a 1,0 ATA no homem (Ketty e Schmidt, op. cit.) ou ainda, de 24% em indivíduos respirando O_2 a 3,5 ATA sob hipocapnia (Lambertsen et al., 1953). Por outro lado, cães expostos a 3,0 ATA de O_2 e normocapnia tiveram ou um aumento do fluxo sanguíneo cerebral, ou então uma estabilização do fluxo, como se um patamar de vasoconstrição fosse atingido (Bauer et al., 1990). Também foi observado que a presença de hipercapnia arterial ou mesmo a manutenção da $PaCO_2$ em níveis normais, na presença de PaO_2 elevada, inibe o efeito vasoconstrictor cerebral da hiperóxia. Além disso, o efeito do CO_2 parece ser predominante sobre o efeito do O_2 no controle da circulação cerebral, pois o aumento do fluxo provocado por hipóxia intensa, com PO_2 abaixo de 50mmHg, pôde ser diminuído ou até invertido pela hipocapnia (Lambertsen, 1978d).

Bean et al. (1971), por sua vez, observaram variações localizadas e regionais síncronas e assíncronas da PO_2 tissular cerebral conseqüentes a mudanças regionais do fluxo cerebral. De acordo com os autores, estas variações do fluxo seriam determinadas por um controle local vascular dependente do O_2 , da PO_2 tecidual e de alterações metabólicas, as quais não seriam registradas no sangue venoso jugular misto, pelo fato do mesmo representar o efluxo de sangue do cérebro inteiro, mascarando alterações regionais do fluxo sanguíneo e pressão dos gases respiratórios. Por conta disso, o

sangue venoso jugular misto não seria um indicador confiável das mudanças circulatórias e gasométricas em centros localizados e vitais do SNC (Bean et al., 1971). Os autores obtiveram 3 padrões de alterações cíclicas do fluxo regional cerebral e da PO_2 sem relação com a ritmicidade cardíaca ou respiratória, correspondentes à detecção de eletrodos implantados em duas regiões do cérebro, anterior e posteriormente ao tálamo, de ratos recuperados da cirurgia e, sem estar anestesiados, expostos a OHB entre 65-66psig (5,5 ATA):

a-variações cíclicas de baixa amplitude e frequência relativamente uniforme de 6-8/min, sincrônica e em fase com a variação cíclica regional da PO_2 tecidual, provavelmente representando o controle vascular rítmico basal mediado por algum centro neurogênico extravascular e também da ritmicidade miogênica dos vasos cerebrais maiores, cuja influência prevaleceria sobre grandes áreas cerebrais ou sobre o cérebro inteiro. Como exemplo, as variações da temperatura cerebral, pois seguem a mesma variação rítmica (Bean et al., 1972).

b-mudanças cíclicas mais variáveis, de maior amplitude e menor frequência que se superpõem às anteriores. Estas seriam desencadeadas pelo controle vasomotor autorregulatório regional, envolvendo mudanças metabólicas regionais e da PO_2 .

Estas duas estariam frequentemente correlacionadas com alterações na atividade do EEG.

c-um terceiro tipo de alteração cíclica do fluxo sanguíneo regional de amplitudes ainda maiores e ocorrência irregular, mudando as relações de fase interregional de maneira caracteristicamente recíproca, sobre as quais as outras mudanças cíclicas menores de maior frequência se superpõem. Seriam de origem provavelmente neurogênica, não se correlacionariam com variações regionais da PO_2 tecidual ou com o EEG, até o aparecimento de atividade pré-convulsiva ao EEG e a mudança de um padrão de fluxo recíproco, entre as regiões avaliadas anterior e posterior, para um aumento paralelo em fase no fluxo regional e na PO_2 tecidual, persistente nas sucessivas convulsões epileptiformes do O_2 .

Nesses experimentos, fica evidente o efeito vasoconstrictor mediado pelo O_2 , apesar do aumento da PO_2 tecidual. Além disso, a observação por parte dos autores de que variações similares da PO_2 desencadeiam mudanças distintas do fluxo cerebral em regiões diferentes do SNC denota uma sensibilidade diferente dessas regiões frente a mesma tensão arterial de O_2 . Enquanto na região posterior do cérebro desses animais houve a um aumento da PO_2 local de até 8 vezes o normal, na região anterior esse

aumento foi de apenas 5 vezes, mas decaiu para 3,5 vezes com o final da compressão e a estabilização da pressão no interior da câmara hiperbárica. Em resposta a esses aumentos da PO_2 local, diversas vezes os autores registraram em seguida uma diminuição do fluxo sanguíneo regional cerebral com queda subsequente da PO_2 local registrada pelos mesmos eletrodos anteriores. Esses resultados apontam fortemente para a presença de um controle vasomotor intrínseco mediado pelo O_2 , cuja resposta reacional na vigência de hiperóxia é sempre vasoconstrictiva.

Entretanto, com a continuidade da exposição à OHB, os animais apresentaram intoxicação evidente com o aparecimento de crises convulsivas generalizadas. Observaram que, previamente, houve aumento da PO_2 tissular, apesar da vasoconstricção, que para eles seria decorrente de dois outros fenômenos: 1 – do vazamento de O_2 para os tecidos antes da elevada PO_2 atingir os capilares, o que deve ocorrer através das paredes das artérias menores e das arteríolas, conforme já citado. Isso elevaria a PO_2 local no SNC provocando o aparecimento de espículas ao EEG, seguido de uma vasoconstricção, com queda do fluxo sanguíneo, numa tentativa de diminuir a PO_2 . 2 – Entretanto, o prolongamento da OHB acabaria por levar a uma perda do controle vasomotor intrínseco por parte da célula muscular lisa vascular devido ao relaxamento das fibras, por provável intoxicação da célula muscular lisa pelo excesso de oxigênio, através de um mecanismo semelhante à anemia histotóxica, denominado anóxia hiperóxica (Bean e Bohr, 1940). Esse fenômeno induziria a um aumento ainda maior do fluxo sanguíneo cerebral, aumentando excessivamente a PO_2 local, atingindo assim o limiar convulsivo, sobrevivendo a crise.

Esses resultados parecem excluir a possibilidade de que uma hipocapnia arterial associada a hipercapnia central possa ser, sozinha, a causa de todos esses fenômenos regionais do fluxo sanguíneo cerebral, muito embora essa hipótese não esteja totalmente afastada, segundo os próprios autores, principalmente por terem observado, em experimentos paralelos, que a ação vasodilatadora do CO_2 não é perdida com altas pressões parciais de oxigênio. Aventaram ainda a possibilidade de um aumento da PCO_2 central durante os períodos apnéicos da crise convulsiva contribuir, secundariamente, para a perda da vasoconstricção hiperóxica. Mas acrescentaram também a possibilidade da participação de um efeito tóxico direto da elevada PO_2 sobre os centros vasomotores do tronco cerebral, perturbando seu funcionamento normal. Com tudo isso, é mais provável que ambos mecanismos mediados, tanto pelo O_2 quanto pelo CO_2 , atuem

simultânea e sinergisticamente sobre o controle do fluxo sanguíneo cerebral para o desenvolvimento da toxicidade do SNC pelo O_2 e o despertar das crises convulsivas.

Nos pulmões, diferentemente do observado na circulação sistêmica, a resposta da microcirculação pulmonar a uma PO_2 baixa consiste numa vasoconstrição por mecanismo não totalmente esclarecido, mas que parece mediado por canais de potássio da membrana celular da célula muscular lisa dos vasos pulmonares sensíveis ao oxigênio (Morrel et al., 2006). Durante a hipóxia haveria um bloqueio dos mesmos com despolarização da membrana celular, induzindo um influxo de cálcio para o interior da célula muscular lisa, bem como a liberação do cálcio do retículo endoplasmático, com aumento do cálcio citossólico e consequente contração das fibras musculares lisas e vasoconstrição (Morrel et al., op. cit.). von Euler e Liljestrand (1946) foram os primeiros a observar que tanto a redução de PO_2 assim como o aumento da PCO_2 causam vasoconstrição pulmonar, os quais postularam a hipótese de um ajuste da circulação pulmonar de maneira a favorecer a perfusão dos alvéolos mais ventilados, resultados esses confirmados posteriormente pela observação de vasoconstrição pulmonar em indivíduos com saturação de O_2 do sangue arterial abaixo de 80% (Milnor, 1978d).

Por outro lado, a inalação de oxigênio puro normobárico em indivíduos normais não parece causar qualquer alteração do fluxo sanguíneo pulmonar. No entanto, em indivíduos residentes em altitudes elevadas que apresentam hipertensão pulmonar hipóxica crônica, a administração de oxigênio induz a uma melhora, revertendo o quadro hipertensivo e constituindo-se em importante instrumento terapêutico (Grover et al., 1966). Também foi relatado que a respiração de O_2 puro a 3,0 ATA provoca uma queda na pressão da artéria pulmonar ao redor de 30% após 15 minutos (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998). Para a intoxicação pulmonar pelo O_2 , esse efeito tende a agravar a lesão, que sabidamente atinge, sobretudo, o endotélio vascular pulmonar (Clark e Lambertsen, 1971a). Os efeitos do CO_2 , por sua vez, na microcirculação pulmonar são mais variáveis e parecem dependentes da presença de acidose no sangue, estando relacionados aos efeitos do íon H^+ (Levitzky, 1995).

Com base nos estudos do controle vasomotor periférico e principalmente da circulação cerebral e pulmonar, fica mais fácil entender os prováveis mecanismos envolvidos no controle vasomotor ao nível dos corpos carotídeos. Conforme já abordado na introdução deste trabalho, os vasos sanguíneos dos corpos carotídeos recebem extensa inervação autônoma, aparentemente tanto simpática quanto parassimpática, que seriam provavelmente responsáveis por efeitos de vasoconstrição e vasodilatação,

respectivamente, ao nível das arteríolas e pequenas artérias aferentes. Entretanto, foi observado que o fluxo local que efetivamente irriga as células glômicas não sofre variações com a estimulação autônoma e, portanto, seria controlado por mecanismos independentes de autorregulação intrínseca (Acker et al., 1977). O responsável direto pelo controle do fluxo local seria o O_2 , ou melhor, a tensão arterial de O_2 , a qual é determinada apenas pela fração de O_2 dissolvida não ligada à hemoglobina, já que variações da tensão arterial de CO_2 também não influenciaram o fluxo sanguíneo local do parênquima glômico (Acker, 1980).

Várias evidências apontam a autorregulação dos esfíncteres pré-capilares dependente apenas de O_2 como causa do fenômeno de “plasma skimming” que ocorreria ao nível da microcirculação glômica carotídea (Acker e Lübbers, 1977; McCloskey e Torrance, 1971). Devido a provável existência desse fenômeno, ou seja, pela evidência de que os vasos sanguíneos que irrigam as células glômicas possam ser perfundidos principalmente por plasma, Acker (1980) afirmou: “A baixa capacidade de transporte de O_2 pelo plasma e o alto consumo de O_2 do tecido glômico abaixaria a PO_2 nos quimiorreceptores do corpo carotídeo. Por outro lado, deve ser levado em conta que um baixo fluxo através dos capilares que suprem o tecido específico também produziriam uma baixa PO_2 tecidual. Ao nosso ver, os baixos valores de PO_2 registrados nas células quimiorreceptoras, ou em outras palavras o alto gradiente entre a PO_2 tecidual e a PO_2 arterial é essencial para o corpo carotídeo gerar impulsos quimiorreceptivos”. Além disso, o elevado fluxo sanguíneo dos corpos carotídeos, à priori, seria responsável por manter sua atividade basal inalterada às custas de O_2 dissolvido apenas (Fitzgerald e Lahiri, 1986).

Por outro lado, pode-se afirmar que em situações de hiperóxia a circulação local também deve desempenhar um papel importante, normalmente assumindo uma função protetora, ao promover uma abertura dos shunts arteriovenosos, pela provável inibição reflexa do sistema simpático (Lambertsen, 1962). Ao mesmo tempo em que diminui o fluxo total da circulação regional, através da vasoconstrição periférica mediada pela autorregulação do O_2 e da hipocapnia arterial que sobrepõem o efeito neurogênico inibitório reflexo. No entanto, esse mecanismo local de autorregulação não parece ser igual em todos os tecidos, uma vez que a hipóxia leva a uma diminuição (e não aumento) do fluxo sanguíneo local ao nível dos corpos carotídeos (Acker, 1989), de maneira muito similar ao que ocorre na microcirculação pulmonar (von Euler e Liljestrand, 1946; Moody et al, 2003). Como também foi observado que a hiperóxia induz a uma queda da pressão

na artéria pulmonar (Burakovsky e Bockeria, 1981 apud Iazzetti, 1998), refletindo um efeito vasodilatador oposto ao que ocorre na hipóxia, procurou-se testar neste trabalho a hipótese do mesmo fenômeno estar ocorrendo ao nível da microcirculação glômica carotídea e haver, portanto, um aumento do fluxo local na vigência de hiperóxia hiperbárica.

Os resultados do presente trabalho relativos à relação luz-parede das arteríolas mostraram uma vasoconstrição significativa das arteríolas de maior calibre em todos os grupos expostos ao oxigênio (Tab. 10). Além disso, no grupo exposto a maior dose, a vasoconstrição foi também significativa nas arteríolas menores. Entretanto, houve uma tendência à vasoconstrição arteriolar em geral desde o grupo exposto a menor dose de oxigênio, aumentando de maneira gradativa à dose empregada e praticamente proporcional nas arteríolas de médio calibre (Fig. 10). Também foi observado um aumento significativo da densidade volumétrica ocupada pelos capilares preenchidos por hemácias no grupo exposto a maior dose de O_2 , quando comparada ao grupo controle, indicando a presença de congestão capilar nesse grupo (Tab. 9, Fig. 9). Como também houve um aumento significativo na densidade volumétrica do espaço capilar total, é provável que um maior número de capilares também tenha se tornado funcional. Estas alterações sugerem adaptações locais da microcirculação em face ao excesso de oxigênio. Curiosamente, no outro grupo tratado houve uma tendência inversa, embora não significativa. Não foi possível estabelecer as causas destas diferentes tendências, mas podem estar relacionadas à dose mais baixa de oxigênio oferecida neste grupo, ou mesmo ao tipo de anestésico utilizado na pesquisa. McClosley e Torrence (1971) e Acker e Lübbers (1975) observaram que os barbituratos provocaram uma perda da autorregulação do fluxo sanguíneo local dos corpos carotídeos mediada pelo O_2 . Em vista da tendência ao aumento do volume ocupado por capilares preenchidos por hemácias no grupo exposto à dose mais elevada de oxigênio, é possível que estes agentes anestésicos atuem por algum mecanismo competitivo com o O_2 ainda desconhecido que, quando submetido a uma maior concentração de O_2 , permite que o efeito deste prevaleça.

De qualquer maneira, esses resultados sugerem ter havido um desvio de fluxo dos vasos mais calibrosos para os capilares que banham efetivamente as células glômicas nos corpos carotídeos expostos a dose mais elevada, dando suporte a hipótese inicial, bem como fortalece a idéia de um controle vasomotor intrínseco autorregulado pela PO_2 local como sugerido por Acker et al. (1977). Para tanto, pode-se especular que tenha ocorrido um fechamento dos canais preferenciais e das anastomoses arteriovenosas

associado a uma abertura dos esfíncteres pré-capilares dos capilares nutrientes do parênquima glômico, ou seja, exatamente o oposto ao que parece ocorrer na hipóxia. O que aparentemente seria paradoxal, fisiologicamente parece lógico, pois aumentando o fluxo local, maior a quantidade de O_2 a atingir as células quimiossensoras carotídeas e, conseqüentemente, maior a atenuação ou inibição da resposta reflexa carotídea nessa situação. Em contrapartida, maior a possibilidade de lesão tóxica pelo excesso de O_2 . A observação de que as artérias mais calibrosas aparentemente não mostraram vasoconstrição, já que não foram consideradas nos cálculos da relação luz-parede das arteríolas, dá suporte a essa suposição. Pois, havendo inibição simpática hiperóxica reflexa, realmente deveriam apresentar-se dilatadas na medida em que não estariam sendo influenciadas pelo efeito vasoconstritor da elevada PO_2 local, restrito apenas aos vasos arteriolares, de acordo com a hipótese do efeito direto da hiperóxia como causa da vasoconstrição observada nessas situações (Camporesi et al., 1996).

Apesar de ser provavelmente apenas um reflexo da maior quantidade de capilares preenchidos, é possível que a congestão dos capilares conseqüente ao desvio de fluxo possa ter, indiretamente, uma função protetora frente ao excesso de O_2 , dada a capacidade tamponante da hemoglobina (Lahiri, 1980). Também no pulmão se observa uma congestão importante em casos de intoxicação pelo oxigênio (Clark e Lambertsen, 1971a; Crapo, 1986). Coincidência ou não, ambos parecem apresentar as mesmas respostas circulatórias frente aos mesmos estímulos.

Embora não tenha sido quantificada, a menor quantidade de arteríolas com hemácias no seu interior observada com o emprego da maior dose de O_2 sugere um direcionamento dessas células para dentro dos capilares parenquimatosos, justificando a congestão observada. Dessa forma, a expressiva presença dessas células nos capilares pode ter sido um dos fatores que levaram outros autores a não obterem respostas reflexas significativamente atenuadas à hipóxia após exposições à hiperóxia hiperbárica, mas sim à exposição hiperóxica normobárica (Lahiri et al., 1987; Torbati et al., 1989). Como a vasoconstrição arteriolar encontrada mostrou uma tendência de proporcionalidade com a dose de O_2 , pode-se especular que quantidades maiores de hemácias sejam desviadas para os capilares quanto maior for a dose de O_2 utilizada, na medida em que maior seria o número de capilares nutrientes abertos, maior também o tempo em que permaneceriam abertos, conforme a noção de “vasomotion” mencionada anteriormente e maior a quantidade de shunts AV fechados, todos associados a uma contração mais vigorosa por parte das arteríolas, diminuindo proporcionalmente o

tamanho dos seus diâmetros. Nesse caso, doses também maiores de oxigênio ou com maior tempo de exposição seriam necessárias para que a intoxicação dos corpos carotídeos pelo oxigênio pudesse se manifestar e produzir respostas funcionais alteradas.

Vale ressaltar que a microscopia eletrônica não revelou lesões das células endoteliais, sugerindo a presença de um endotélio íntegro ao nível dos capilares glômicos, mesmo no grupo exposto à dose mais elevada (Fig. 7). A presença de endotélios íntegros parece ser condição necessária à produção de mediadores químicos responsáveis por fenômenos de vasoconstrição e vasodilatação nas circulações de outras regiões, como são os casos da endotelina e do óxido nítrico, respectivamente (Sokolovsky, 1995; Furchgott, 1999). Portanto, a provável integridade do endotélio dos capilares glômicos encontrada nos animais expostos à hiperoxigenação hiperbárica estaria satisfazendo a condição básica para a produção e liberação de mensageiros químicos com papel circulatório, mesmo no grupo exposto a maior dose de O₂. Sendo assim, poder-se-ia pensar que algum mensageiro possa estar envolvido no controle vasomotor intrínseco peculiar evidenciado pela microcirculação dos corpos carotídeos, com respostas antagônicas ao que normalmente se observa na circulação periférica em geral. Ao menos por parte da rede de capilares que nutrem efetivamente as células glômicas, uma vez que tanto as arteríolas quanto, provavelmente, as anastomoses arteriovenosas e os canais preferenciais, quando sujeitos a PO₂ elevada, respondem similarmente ao observado em outras regiões, sofrendo constrição da sua luz por provável ação direta do oxigênio sobre a musculatura lisa de suas paredes (Bean et al., 1972; De Martino et al., 1996). Estudos histoquímicos em corpos carotídeos de gatos demonstraram positividade para a NOS (nNOS e eNOS) tanto em neurônios que inervam as arteríolas intraglômicas e as células glômicas quanto para as células endoteliais intraglômicas (Prabhakar et al., 1993). Além disso, o ON tem sido implicado como agente modulador inibitório da resposta quimiorreceptora carotídea, de maneira que uma hipoatividade da nNOS intraglômica foi associada ao aumento da atividade quimiorreceptora carotídea encontrada na insuficiência cardíaca crônica (Li et al., 2005). Infelizmente, as tentativas realizadas na pesquisa atual para a utilização de marcadores imunohistoquímicos que pudessem clarear essa questão não tiveram êxito, pois a historesina utilizada na obtenção dos cortes histológicos não permitiu uma penetração adequada dos marcadores. Futuros experimentos objetivando o emprego de técnicas imunohistoquímicas serão realizados com o intuito de buscar maiores esclarecimentos sobre esse assunto.

5.3 EFEITOS TÓXICOS DA HIPERÓXIA SOBRE A ESTRUTURA DOS CORPOS CAROTÍDEOS

Até o presente momento foram muito poucos os trabalhos publicados que se ocuparam dos efeitos tóxicos da hiperóxia sobre os corpos carotídeos, principalmente da OHB e a literatura atual é bastante escassa. Mais ainda sobre possíveis alterações estruturais encontradas nessas situações. As pesquisas realizadas se concentraram na análise morfométrica da ultraestrutura das células glômicas de corpos carotídeos de gatos expostos à hiperóxia. Esses estudos revelaram aumento na densidade volumétrica de mitocôndrias, uma proliferação do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, indicando um aumento do tráfico de membranas e a ausência de diminuição na distribuição de vesículas com núcleos elétron-densos em células glômicas. Além disso, também foi observado uma diminuição significativa das cristas mitocondriais, mais acentuada nas células glômicas que nas terminações nervosas em sinapse com as mesmas (Torbatí et al., 1993; Mokashi et al., 1994; Di Giulio et al., 1998). Todas essas alterações foram bem mais pronunciadas nos animais expostos à hiperóxia normobárica prolongada. Em vista do fato das alterações estruturais encontradas pós OHB, embora significativas, terem sido menos evidentes, Mokashi et al. (op. cit.) sugeriram que o efeito tóxico da OHB não seria completo e se assemelharia aos efeitos provocados pelo envelhecimento (Hansen, 1989).

Os resultados deste trabalho discutidos anteriormente sugerem que uma elevada PO_2 circulou por todo território arterial desses animais. Conforme já mencionado, uma PaO_2 elevada é um dos fatores determinantes da PO_2 tecidual local e conseqüentemente do efeito tóxico do oxigênio (Nishiki et al., 1976; De Martino et al., 1996; Oriani et al., 1996). Para os corpos carotídeos esse fato assume grande importância uma vez que estudos anteriores demonstraram que os corpos carotídeos respondem apenas a queda da PaO_2 e não necessariamente à queda do conteúdo arterial de O_2 (Lahiri e DeLaney, 1975b; Lahiri, 1980; Lahiri et al., 1981b; Fidone e Gonzalez, 1986). Situações de anemia ou intoxicação por CO, cujo conteúdo arterial de O_2 encontra-se diminuído, falharam em provocar um aumento da atividade neural dos quimiorreceptores carotídeos, presumivelmente porque nessas condições a PaO_2 mantém-se normal ou até mesmo aumentada às custas de um aumento na fração de O_2 dissolvida no plasma (Fitzgerald e

Lahiri, 1986). Isso vale dizer que esses sensores reagem mais prontamente à fração de O_2 dissolvida no plasma e não necessariamente ligada à hemoglobina. Conseqüentemente também estariam mais expostos à intoxicação pelo oxigênio no caso de haver um excesso de O_2 dissolvido no plasma. Sabidamente, a hiperoxigenação hiperbárica provoca uma elevação da PaO_2 às custas de um aumento da quantidade de O_2 dissolvido no plasma e diretamente proporcional à PO_2 inspirada (Clark e Fisher, 1977).

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a existência de lesões estruturais já no grupo intermediário, exposto a 2,4 ATA por 6 horas, evidenciado pelo aumento, embora não significativo, do volume ocupado pelo estroma intersticial e a presença de células glômicas levemente edemaciadas, lesões estas que se intensificaram no grupo exposto a 3,0 ATA de O_2 (Fig. 4), o que sugere uma tendência ao aumento desse espaço em doses mais importantes de exposição ao oxigênio, muito embora, como já salientado, não foi observada lesão endotelial, à microscopia eletrônica, dos capilares dos corpos carotídeos expostos à dose mais elevada de oxigênio. Também não foi observado aumento do volume total dos corpos carotídeos, cujos valores encontrados estão de acordo com o observado por outros autores para esta espécie (Laidler and Kay, 1975).

Ainda nesse último grupo, a microscopia eletrônica revelou alterações ultra-estruturais significativas, sobretudo a nível mitocondrial (Figs. 5 a 7). Não só as células glômicas, mas também as terminações nervosas dos corpos carotídeos desse grupo apresentaram mitocôndrias nitidamente danificadas ou deterioradas, com uma visível diminuição da quantidade de cristas mitocondriais, embora não quantificada. Isso indica que a dose empregada foi suficiente para causar lesões estruturais importantes, talvez irreversíveis ao nível dessas organelas. Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores (Torbaty et al., 1993; Mokashi et al., 1994). Estes resultados confirmam a noção geralmente aceita de serem as mitocôndrias o alvo intracelular principal do efeito tóxico do O_2 e são consistentes com a teoria da intoxicação pelo oxigênio mediada por espécies reativas do oxigênio (EROS) (Chance et al., 1965; Freeman e Crapo, 1981). As relevantes alterações mitocondriais observadas dão suporte a teoria metabólica da quimiorrecepção ao O_2 que sugere uma possível ligação entre metabolismo oxidativo e quimiorrecepção (Torbaty et al., 1993; Fujishiro et al., 2004). Estudos recentes, entretanto, ainda deixam dúvidas quanto à real participação das mitocôndrias no processo de recepção e transdução por parte dos quimiossensores carotídeos (Hoshi e Lahiri, 2004;

Lahiri et al., 2006). Mesmo assim, os resultados aqui obtidos confirmam a presença de alterações morfológicas dos corpos carotídeos expostos à hiperóxia hiperbárica e sugerem um efeito dependente da dose empregada, sustentando nossa hipótese inicial.

Embora o grupo exposto a menor dose (estudos preliminares) não pôde ser considerado para fins da análise morfométrica, nem para os estudos com microscopia eletrônica, a análise dos cortes histológicos conseguidos, apesar de puramente qualitativa, sugere não ter havido lesões do parênquima glômico carotídeo, significativas a ponto de justificar a atenuação da resposta fisiológica à hipóxia encontrada por Liberzon et al. (1989) em doses similares. Isto sugere que, provavelmente, apenas alterações ultraestruturais ou mesmo bioquímicas devam ser responsáveis pela atenuação da resposta à hipóxia observada em baixas doses de hiperóxia, justificando também a rápida reversibilidade da atenuação da resposta encontrada pelos autores.

Em relação às proporções das diferentes variantes de células glômicas encontradas nessa pesquisa, vale ressaltar que estas células, em ratos, não costumam ser classificadas em clara, escura e progenitora (Heath, 1991). Mesmo assim, alguns trabalhos mostram nitidamente a presença de células glômicas carotídeas claras e escuras (McGregor et al. 1984; Fidone e Gonzalez, 1986). Utilizando uma metodologia de preparo e coloração diferente de HE (hematoxilina-eosina), pôde-se verificar e quantificar a presença de três variantes de células glômicas, notadamente pela intensidade da coloração dos seus núcleos, atribuindo-lhes os mesmos nomes normalmente empregados. A preponderância da população de células escuras encontradas nesse estudo, inclusive no grupo controle, pode estar relacionada ao uso desta diferente metodologia, uma vez que a população de células claras, quando coradas à HE, é normalmente predominante, ao menos em outras espécies (Edwards et al., 1970; Vinhaes et al., 2002). Ou então ser uma característica da espécie.

O aumento da população de células classificadas como claras neste trabalho associada à diminuição na população de células progenitoras, em todos os grupos testados, mesmo que não significativa no grupo exposto à dose mais elevada, indica uma tendência da variante clara das células glômicas em se sobrepor às demais em condições de hiperóxia. Vinhaes et al. (op. cit.), utilizando-se de cortes histológicos corados em HE, relataram uma proporção numérica de células escuras significativamente maior em indivíduos falecidos por ARDS e insuficiência respiratória aguda, em relação aos indivíduos falecidos e não portadores de doenças respiratórias ou no grupo de portadores de doenças pulmonares obstrutivas crônicas. A ARDS é uma enfermidade clínica aguda

caracterizada por hipóxia severa, mesmo com um aumento da fração inspirada de oxigênio. A intoxicação pulmonar pelo oxigênio também se apresenta clínica e histologicamente semelhante (Clark e Lambertsen, 1971a). Em ambas, as EROS parecem estar envolvidas na gênese das lesões. Como não foi observada uma variação significativa na proporção total de células glômicas e de células sustentaculares (Tab. 14), as mudanças na proporção de cada variante poderiam representar uma resposta dinâmica destas células frente a condições ambientais estressantes. Nesse sentido, a microscopia eletrônica dos corpos carotídeos expostos à dose mais elevada de oxigênio mostrou uma intensa resposta proliferativa membranosa, com um REG bastante desenvolvido também nas células sustentaculares (Figs 5 a 7). Essas alterações sugerem um aumento do processo de reparação e “turnover” das estruturas intracelulares por parte das células glômicas, possivelmente lesadas pelo aumento da geração de EROS, envolvendo também a participação das células sustentaculares. Outros autores já haviam observado alterações semelhantes nos corpos carotídeos de gatos em situações de hiperóxia (Torbaty et al., 1993, Mokashi et al., 1994). É possível que as mudanças nas proporções das variantes de células tipo I observadas após exposições à hiperóxia hiperbárica possam estar relacionadas a esta resposta proliferativa.

A presença de figuras vacuolares com dupla membrana encontradas no citoplasma das células glômicas expostas à dose mais elevada de O_2 (Fig. 6) seria um forte indício de lesões celulares por autofagocitose, conforme recente revisão de Guimarães e Linden (2004). Em conjunto, esses resultados poderiam sugerir a existência de um processo dinâmico ocorrendo no interior dessas células, na tentativa de repor possíveis novas vesículas contendo neurotransmissores, características das células glômicas e que estariam sendo autofagocitadas pelo simples desuso, em vista da inibição da descarga quimiorreceptora pela hiperóxia. Ou seria mesmo um processo degenerativo de toda a célula glômica, que culminaria com a sua morte, desencadeado pelo efeito tóxico do excesso de O_2 .

Caso a segunda hipótese seja verdadeira, é possível que o aumento proporcional das células claras possa estar relacionado à intensificação deste processo degenerativo intracelular, cujo aspecto das células glômicas expostas a dose mais elevada, com citoplasma desarranjado e limites imprecisos, lembra o mesmo de uma degeneração hidrópica (Cotran et al., 1999). E, portanto, refletiria apenas a transformação de uma variante em outra, sustentando a hipótese de que as três variantes de células glômicas representariam estágios cronológicos diferentes e não funcionalmente distintos. Como já

mencionado não foi possível realizar estudos imunohistoquímicos nessa pesquisa, os quais certamente ajudariam a esclarecer algumas destas questões. Também nesse caso, experimentos futuros com a utilização dessas técnicas estão sendo programados.

5.4 FALÊNCIA RESPIRATÓRIA TERMINAL

Matalon et al. (1982) observaram uma tendência de queda da frequência cardíaca nas primeiras 40 horas de exposição e do débito cardíaco até 60 horas de exposição de carneiros a O_2 puro a 1,0 ATA. Ambos parâmetros cardiocirculatórios aumentaram posteriormente com o aumento da PCO_2 . Ao longo de todo experimento a PO_2 esteve acima de 200mmHg. Para os autores, houve uma redistribuição do fluxo sanguíneo a nível pulmonar, desviando-o de áreas atelectásicas para áreas melhores ventiladas e mantendo uma relação ventilação-perfusão suficiente para manter uma oxigenação adequada, dada a ausência de hipertensão pulmonar.

Harabin et al. (1984), por outro lado, não observou queda da frequência cardíaca, embora o débito cardíaco diminuiu progressivamente até 48 horas de exposição de cães a 1,0 ATA de O_2 . Após o que houve aumento significativo da frequência cardíaca e queda acentuada do débito. Nestes animais houve um aumento da PCO_2 apenas algumas poucas horas antes da morte. Também foi verificada uma queda acentuada do excesso de base na fase terminal coincidente com uma PaO_2 acima de 200mmHg que, segundo os autores, seria decorrente de acidose metabólica conseqüente a uma redistribuição do fluxo, já que o débito cardíaco diminuiu ao longo de todo experimento. Com isso, os autores concluíram que as alterações circulatórias precederam a queda da capacidade funcional pulmonar de trocas gasosas (perda da capacidade de difusão). Apenas ao final, horas antes da morte a PO_2 atingiu valores abaixo de 150mmHg.

Nesses experimentos, fica claro que existem diferenças entre as espécies, mas chama a atenção que, em ambas, a capacidade de troca gasosa pulmonar manteve-se em condições de permitir uma oxigenação adequada do sangue arterial, de maneira que não se pode dizer que os animais morreram por hipóxia. Por outro lado, houve um aumento importante da $PaCO_2$ e piora da acidose em fases terminais de maneira abrupta, cujas alterações hemodinâmicas observadas devem estar associadas aos efeitos da hipercapnia na periferia e sobre o SNC. Matalon et al. (op. cit.) ainda observaram um aumento da frequência respiratória dos animais até atingir a fase terminal. No entanto,

suas últimas medições, realizadas após 80 horas de exposição hiperóxica, ou seja, poucas horas antes da morte dos animais, apresentaram uma tendência à queda. Enquanto os primeiros resultados demonstram uma possível manutenção da resposta quimiorreceptora, central ou periférica, os últimos parecem apontar para uma falência desse mecanismo. Em conjunto, todos esses dados indicam uma ventilação alveolar deficiente. À despeito de todo comprometimento do aparelho efector pulmonar, sobretudo diminuição da complacência e dor retroesternal, ambas de aparecimento relativamente precoce (Clark e Lambertsen, 1971b), a manutenção dos padrões gasométricos até poucas horas antes da morte, seguida de uma súbita falência respiratória, sugere que os mecanismos responsáveis pela manutenção adequada da ventilação já não se fazem mais presentes. Um dos papéis dos quimiorreceptores periféricos parece ser justamente o de sustentar a ventilação quando os mecanismos centrais não se encontram mais presentes, como numa situação de hipercapnia severa, a qual, sabidamente deprime os centros respiratórios do tronco cerebral (Marshall e Lambertsen, 1961). No entanto, as lesões significativas dos corpos carotídeos encontradas neste trabalho, na dose de oxigênio mais elevada, parecem sugerir que nessa situação, também o funcionamento dos corpos carotídeos pode se encontrar prejudicado e a sua resposta quimiorreflexa carotídea ao CO_2 possa também estar alterada. Com isso, o aumento da PaCO_2 não mais elicitaria reflexos ventilatórios adequados, provocando a queda acentuada do pH a níveis críticos e conseqüentemente morte. Portanto, lesões estruturais significativas dos corpos carotídeos poderiam ser uma das possíveis explicações para a súbita falência respiratória terminal observada em situações de intoxicação avançada pelo oxigênio.

6. CONCLUSÕES

A hiperoxigenação hiperbárica induz adaptações da microcirculação glômica carotídea, caracterizada por vasoconstrição arteriolar e dilatação dos capilares que efetivamente irrigam as células parenquimatosas, ao menos em doses elevadas de O_2 e sugerem a necessidade de estudos histoquímicos a fim de identificar possíveis mediadores envolvidos nesse processo, além do próprio oxigênio.

O excesso de oxigênio mostrou-se tóxico ao corpo carotídeo, induzindo alterações estruturais ao nível do parênquima glômico.

Em doses elevadas, afeta consideravelmente a ultraestrutura das células glômicas carotídeas e em menor extensão das terminações nervosas, possivelmente relacionadas à atenuação, às vezes importante, da resposta fisiológica à hipóxia relatada na literatura e sugerem uma possível participação da lesão glômica carotídea na gênese da falência respiratória terminal na vigência de hiperóxia.

Tabela 1. Modelo de Tabela para o cálculo do volume total do corpo carotídeo.

Espécie:	rato Wistar macho			
Data:	08/09/05	Condições experimentais		
Animal:	12	Fluido	Pressão	Duração
Código:	C5		(ATA)	(hs)
Número:	8906	Ar	1	controle
Peso (g):	322			
Objetiva:	4x	Aumento Total:		40x
Área associada a cada ponto - relação a(p) (µm ²):				22500
Total de pontos no retículo / campo:				25
Lâmina inic.:	12	corte:	8	
Lâmina final:	30	corte:	7	
número de cortes entre pontos			20	
espessura do corte - e (µm):			3	
espessura entre contagem ptos - e (µm):			60	
Volume Total CC (referência) V(ref)	CCD			
(Cavalieri:e.a(p).SP(estrut)) - (µm ³)	72900000			

Contagem de pontos na estrutura - corpo carotídeo inteiro

Lâmina	CCD nº de cortes perdidos	Corte	Pontos
35	1	1	1
36		4	1
37		7	2
38		0	0
39		2	4
40		5	7
41		8	5
42		0	0
43		3	6
44		6	5
45		0	0
46		1	7
47		3	5
48		6	4
49		0	0
50		1	3
51		4	3
52		7	1
53		8	0

Tabela 2. Modelo de planilha para o cálculo da densidade numérica no plano (superfície) (Q_A) de estruturas internas de corpos carotídeos.

Espécie:	rato Wistar macho			Objetiva:	40x		
Data:	22/11/05			Condições experimentais	Aumento Total: 400x		
Animal:	23	Fluido	Pressão	Duração	Área total do		
Código:	C6		(ATA)	(hs)	retículo (µm²): 5625		
Número:	9196	Ar	1	controle			
Peso (g):	356						
Órgão / lado analisado:	CCD						
Número de perfis por campo examinado							
Lâmina	Corte	Animal	Células claras	Células escuras	Células progenitoras	Células sustentaculares	Total de células glômicas
40	7	9196	6	17	6	13	29
42	2	9196	2	21	2	12	25
43	5	9196	4	10	12	16	26
44	7	9196	4	15	5	14	24
46	1	9196	4	10	6	26	20
47	4	9196	9	9	9	11	27
48	7	9196	4	14	2	10	20
50	1	9196	3	9	4	13	16
51	2	9196	6	18	4	19	28
52	4	9196	5	9	6	14	20
Total de perfis			47	132	56	148	235

Tabela 3. Modelo de planilha para o cálculo da densidade volumétrica (Vv) de estruturas internas de corpos carotídeos.

Espécie:	rato Wistar macho					
Data:	21/09/05					
Animal:	17	Fluido	Condições experimentais			
Código:	T17		Pressão			
Número:	8972	O2	(ATA)			
Peso (g):	304		Duração			
Órgão / lado analisado:			(hs)			
			2,4			
			6			
		CCD				
	Total de pontos no retículo:	25				
	Volume CC (µm ³)	85050000				
Contagem de pontos na estrutura						
Lâmina	Corte	Animal	Outros Tecidos	Capilares s/ hemácias	capilares c/ hemácias	Total de capilares
16	3	8972	5	0	0	0
17	6	8972	7	2	2	4
19	1	8972	5	1	2	3
20	4	8972	9	3	2	5
21	7	8972	3	0	1	1
22	8	8972	5	0	1	1
24	2	8972	8	1	3	4
25	5	8972	4	0	1	1
26	8	8972	5	1	0	1
23	5	8972	6	4	4	8
Total ptos/estrutura			57	12	16	28

Tabela 4. Modelo de Tabela para o cálculo da relação Luz-Parede das arteríolas (relação L/W).

Animal	8901						
Aumento (objetiva):	100x		Aumento Total		1000 x		
Total de pontos no retículo:			25				
Área total do retículo (μm^2):			900				
Área do perfil (luz ou parede) = área relativa do perfil/densidade numérica relativa do perfil = (pontos luz ou parede/25)/(1/900)							
Lâmina	cutre	Nº Pontos Luz	Nº Pontos Parede	Área luminal	Área parede	Relação L/W	Tamanho arteriolar
20	5	2	7	72	252	0,286	2
		4	7	144	252	0,571	4
		2	5	72	180	0,400	2
		4	10	144	360	0,400	4
21	7	1	4	36	144	0,250	1
		2	6	72	216	0,333	2
		1	9	36	324	0,111	1
23	2	1	5	36	180	0,200	1
		1	5	36	180	0,200	1
		2	11	72	396	0,182	2
24	5	1	9	36	324	0,111	1
25	8	2	6	72	216	0,333	2
		1	2	36	72	0,500	1

Tabela 5. Médias e respectivos erros-padrão (EP) do volume total dos corpos carotídeos dos animais controles e expostos a 2,4 ATA e 3,0 ATA de O_2 , ambos por 6 horas.

Volume ($10^6 \mu\text{m}^3$)		
Condição	Médias	EP
Ar; 1,0 ATA ($n = 5$)	81,54	$\pm 3,76$
6hs; 2,4 ATA ($n = 5$)	78,84	$\pm 3,76$
6hs; 3,0 ATA ($n = 5$)	79,38	$\pm 6,67$

Tabela 6. Médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial para os animais controles.

Capilares com hemácias			Espaço capilar total		Estroma Intersticial	
Animal	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
9196	0,136	± 0,022	0,152	± 0,023	0,192	± 0,026
9197	0,164	± 0,033	0,208	± 0,032	0,144	± 0,025
9198	0,072	± 0,032	0,108	± 0,038	0,144	± 0,063
9534	0,172	± 0,037	0,184	± 0,037	0,180	± 0,022
8906	0,156	± 0,029	0,180	± 0,034	0,268	± 0,037

Tabela 7. Médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial para os animais tratados com O₂ a 2,4 ATA por 6 horas

Capilares com hemácias			Espaço capilar total		Estroma Intersticial	
Animal	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
8968	0,140	± 0,028	0,168	± 0,023	0,168	± 0,024
8969	0,076	± 0,019	0,136	± 0,024	0,192	± 0,023
8970	0,124	± 0,023	0,152	± 0,032	0,212	± 0,035
8971	0,128	± 0,027	0,160	± 0,026	0,204	± 0,037
8972	0,064	± 0,016	0,112	± 0,031	0,228	± 0,023

Tabela 8. Médias das densidades volumétricas dos capilares com hemácias, do espaço capilar total e do estroma intersticial para os animais tratados com O₂ a 3 ATA por 6 horas

Capilares com hemácias			Espaço capilar total		Estroma Intersticial	
Animal	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
9002	0,252	± 0,032	0,280	± 0,035	0,196	± 0,018
9003	0,172	± 0,030	0,176	± 0,031	0,112	± 0,027
9004	0,116	± 0,031	0,176	± 0,032	0,256	± 0,027
9005	0,140	± 0,023	0,148	± 0,018	0,208	± 0,042
9836	0,280	± 0,027	0,280	± 0,027	0,212	± 0,026

Tabela 9. Densidades volumétricas de capilares preenchidos com hemácias, espaço capilar total e estroma intersticial nos animais controles e expostos ao O₂. Valores são médias e erros-padrão (EP). * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; $p < 0,001$ em relação ao grupo 2,4 ATA-6hs de O₂; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; $p < 0,01$ em relação ao grupo 2,4 ATA-6hs de O₂.

Capilares com hemácias			Espaço capilar total		Estroma Intersticial	
	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
Ar; 1,0 ATA	0,140	± 0,013	0,166	± 0,013	0,186	± 0,013
6hs; 2,4 ATA	0,106	± 0,011	0,146	± 0,012	0,201	± 0,013
6hs; 3,0 ATA	0,192*	± 0,015	0,212**	± 0,015	0,197	± 0,014

Tabela 10. Médias e respectivos erros-padrão da relação Luz-Parede das arteríolas (relação L/W) de corpos carotídeos de animais controles e expostos ao O₂. Relação L/W das arteríolas pequenas e médias. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Tamanho (μm ²)/36μm ²	Arteríolas pequenas (0 to 2)		Arteríolas médias (3 to 4)	
Condição	Médias	EP	Médias	EP
Ar; 1,0 ATA	0,484	± 0,049	0,860	± 0,169
3hs; 2,4 ATA	0,378	± 0,035	0,461	± 0,048*
6hs; 2,4 ATA	0,376	± 0,073	0,402	± 0,047*
6hs; 3,0 ATA	0,299	± 0,026*	0,348	± 0,069*

Tabela 11. Médias das densidades numérica no plano (superfície) Q_A das diferentes variantes de células glômicas, do total de células glômicas e das células sustentaculares para os animais controles.

Animal	Células claras		Células escuras		Células progenitoras		Total de células glômicas		Células sustentaculares	
	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
9196	0,021	± 0,003	0,059	± 0,006	0,025	± 0,004	0,104	± 0,006	0,066	± 0,007
9197	0,018	± 0,002	0,061	± 0,003	0,028	± 0,004	0,108	± 0,006	0,054	± 0,008
9198	0,024	± 0,004	0,053	± 0,006	0,032	± 0,006	0,109	± 0,007	0,070	± 0,005
9534	0,029	± 0,004	0,068	± 0,004	0,025	± 0,004	0,123	± 0,009	0,042	± 0,007
8906	0,045	± 0,004	0,093	± 0,010	0,027	± 0,003	0,166	± 0,014	0,038	± 0,005

Tabela 12. Médias das densidades numérica no plano (superfície) Q_A das diferentes variantes de células glômicas, do total de células glômicas e das células sustentaculares para os animais tratados com O_2 a 2,4 ATA por 6 horas.

Animal	Células claras		Células escuras		Células progenitoras		Total de células glômicas		Células sustentaculares	
	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
8968	0,026	± 0,004	0,060	± 0,008	0,018	± 0,005	0,104	± 0,010	0,067	± 0,007
8969	0,029	± 0,004	0,067	± 0,004	0,023	± 0,005	0,119	± 0,006	0,061	± 0,005
8970	0,045	± 0,006	0,077	± 0,006	0,014	± 0,003	0,136	± 0,012	0,051	± 0,009
8971	0,031	± 0,004	0,074	± 0,006	0,012	± 0,004	0,117	± 0,117	0,057	± 0,007
8972	0,045	± 0,006	0,081	± 0,007	0,019	± 0,003	0,145	± 0,010	0,060	± 0,005

Tabela 13. Médias das densidades numérica no plano (superfície) Q_A das diferentes variantes de células glômicas, do total de células glômicas e das células sustentaculares para os animais tratados com O_2 a 3 ATA por 6 horas.

Animal	Células claras		Células escuras		Células progenitoras		Total de células glômicas		Células sustentaculares	
	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
9002	0,031	± 0,003	0,067	± 0,007	0,013	± 0,004	0,111	± 0,006	0,045	± 0,005
9003	0,032	± 0,003	0,059	± 0,003	0,027	± 0,004	0,117	± 0,007	0,054	± 0,004
9004	0,014	± 0,003	0,064	± 0,006	0,012	± 0,002	0,091	± 0,007	0,068	± 0,008
9005	0,026	± 0,003	0,060	± 0,006	0,030	± 0,005	0,116	± 0,008	0,055	± 0,008
9836	0,025	± 0,003	0,060	± 0,004	0,025	± 0,004	0,111	± 0,007	0,028	± 0,004

Tabela 14. Proporção das diferentes variantes de células tipo I, do total de células glômicas e células sustentaculares dos corpos carotídeos dos animais controles e expostos ao O₂. Valores são médias e erros-padrão (EP). * $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e 3,0 ATA-6hs de O₂; ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; $p < 0,01$ em relação ao grupo 3,0 ATA-6hs de O₂.

	Células claras		Células escuras		Células progenitoras		Total de células glômicas		Células sustentaculares	
	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP	Médias	EP
Ar; 1,0 ATA	0,152	± 0,011	0,381	± 0,018	0,158	± 0,014	0,691	± 0,021	0,309	± 0,021
6hs; 2,4 ATA	0,191*	± 0,014	0,392	± 0,018	0,092**	± 0,012	0,675	± 0,018	0,325	± 0,018
6hs; 3,0 ATA	0,162	± 0,010	0,394	± 0,013	0,135	± 0,012	0,692	± 0,016	0,308	± 0,016

Figura 1. Representação esquemática do retículo utilizado para a análise morfométrica dos cortes, composto de 25 pontos e 30 linhas. As bordas de exclusão adotadas foram as arestas esquerda e inferior do retículo.

Figura 2. Fotomicrografias de pulmões de ratos dos grupos controle (A,B) e expostos a 2,4 ATA-3hs (C,D), 2,4 ATA-6hs (E,F) and 3,0 ATA-6hs (G,H) de O₂. Em todos os grupos tratados observa-se a presença de congestão e inflamação pulmonar aguda. Recrutamento de neutrófilos, macrófagos, eventualmente eosinófilos, mais proeminente no grupo exposto a 3,0 ATA. Presença de edema perivascular discreto em E (seta). Exsudato intralveolar pode ser visto em H (*). Notar a congestão e a inflamação alveolar incipiente no grupo 2,4ATA-3hs, uma dose improvável de causar sinais clínicos de intoxicação. HE. Barra em A, C, E, G = 200µm. Barra em B, F = 50µm. Barra em D, H = 25µm.

Figura 3. Fotomicrografias de corpos carotídeos de ratos fixados *in situ* por gotejamento com paraformaldeído a 4% dos grupos controle (A,B) e expostos a 2,4 ATA-3hs (C,D-estudo preliminar), 2,4 ATA-6hs (E,F) and 3,0 ATA-6hs (G,H) de O₂. A, C, E, G são cortes transversais dos polos e B, D, F, H próximos à linha média do órgão. Notar as formas irregulares dos leitos capilares (em todos os grupos) e uma congestão capilar nos cortes dos polos de todos os grupos, mais intensa que nos cortes da região mediana, exceto no grupo exposto a dose mais elevada de O₂ (H). Células ganglionares são visualizadas em D e E. (HFT). Barra = 50µm.

Figura 4. Fotomicrografias de corpos carotídeos de ratos fixados *in situ* por gotejamento com paraformaldeído a 4% dos grupos controle (A) e expostos a 2,4 ATA-3hs (B-estudo preliminar), 2,4 ATA-6hs (C) and 3,0 ATA-6hs (D) de O₂. Todas as 3 variantes de células tipo I (glômicas) são visualizadas em todos os grupos. Setas indicam células clara (preta), escura (vermelha) e progenitora (verde), respectivamente. A presença de vasoconstrição é notada apenas nos grupos expostos a 2,4 ATA (B,C) em relação ao grupo controle, embora ela tenha ocorrido em todos os grupos. Notar a presença de uma célula ganglionar próximo à arteríola em B (seta). Sinais de edema intracelular em C, mais importante em D. Um aumento do estroma intersticial também é visualizado em D. Ainda neste grupo, as células glômicas mostram um citoplasma desarranjado, com grande áreas claras e limites imprecisos (HFT). Barra = 25µm.

Figura 5. Corpos carotídeos de ratos controles (A) e expostos a 3,0 ATA de O₂ fixados *in situ* por gotejamento com paraformaldeído a 4% (B). No corpo carotídeo normal as cristas mitocondriais das células glômicas (seta) são claramente visíveis. Retículo endoplasmático e complexo de golgi são raramente visualizados, mesmo nas células sustentaculares (tipo II). (14.000x). Perda de cristas e mitocôndrias deformadas são caracteristicamente predominantes nos ratos expostos ao O₂ (seta). Célula tipo II mostra um retículo endoplasmático proeminente (E). (28.000x).

Figura 6. Eletron-micrografia de uma célula glômica (tipo I) em grande aumento (42.000x). Exposição a 3.0 ATA de O_2 por 6 horas. Notar o aspecto bizarro das mitocôndrias, quase todas com perda das suas cristas, além de edema intracelular, bem visível ao redor da membrana nuclear. Um aumento importante do retículo endoplasmático também pode ser visualizado. Presença de corpo multivesicular (*) e de formações vacuolares com dupla membrana englobando citoplasma (seta) sugere autofagocitose.

Figura 7. Célula glômica (G) e sustentacular (S), terminção nervosa (N) e um capilar de um rato exposto a 3.0 ATA de O_2 por 6 horas. Células tipo II englobando tanto células glômicas quanto terminações nervosas. Uma célula glômica com aparência mais clara (*) parece estar dentro de outra célula glômica mais escura (G). A presença de núcleo e vesículas com núcleo elétron-denso em ambas confirmam seu aspecto de células tipo I. Na realidade, há um prolongamento celular de outra célula, provavelmente tipo II separando ambas (não visível). A presença de plaquetas dentro do capilar, normalmente não visualizadas, é uma característica comumente encontrada na intoxicação pelo oxigênio (seta). (8400x).

Figura 8. Resumo do volume total dos corpos carotídeos de ratos controles e expostos ao O_2 , calculados pelo método de Cavalieri a partir da contagem de pontos de cortes sistemáticos, obtidos pelo seccionamento transversal do órgão ao longo de toda a sua extensão. Espessura dos cortes de $3\mu\text{m}$. Distância média entre 2 cortes considerados para a contagem de pontos igual a $60\mu\text{m}$. A altura da coluna representa a média aritmética de cada grupo.

Figura 9. Resumo das densidades volumétricas (V_v) das variáveis calculadas ao nível da microscopia óptica em ratos controles e expostos ao O_2 . A altura da coluna representa a fração do volume total calculado e os valores no seu interior indicam as médias respectivas das densidades volumétricas.

A **B**

Figura 10. Resumo dos valores médios da relação Luz-Parede das arteríolas (L/W) calculadas ao nível da microscopia óptica em ratos controles e expostos ao O_2 . O gráfico representa a tendência de constrição arteriolar nas artérias pequenas (A) e médias (B).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acker H. The meaning of tissue pO_2 and local blood flow for the chemoreceptive process of the carotid body. *Fed. Proc.* 1980; 39: 2641-2647.

Acker H. PO_2 chemoreception in arterial chemoreceptors. *Annu. Rev. Physiol.* 1989; 51: 835-844.

Acker H, Lübbers DW, Purves MJ. Local oxygen tension field in the glomus caroticum of the cat and its change at changing arterial PO_2 . *Pflügers Arch.* 1971; 329: 136-155.

Acker H, Lübbers DW. The Kinetics of local tissue PO_2 decrease after perfusion stop within the carotid body of the cat in vivo and in vitro. *Pflügers Arch.* 1977; 369: 135-140, 1977.

Acker H, Lübbers DW, Durst H. The relationship between local flow and total flow of the cat carotid body at changes of blood pressure, arterial PO_2 and PCO_2 . *Bibl. Anat.* 1977; 15: 395-398.

Adams JM, Attinger FM, Attinger EO. Medullary and carotid chemoreceptor interaction for mild stimuli. *Pflügers Arch.*, 1978; 374: 39-45.

Adamson, IYR, Bowden DR, Wyatt JP. Oxygen poison in mice. Ultrastructural and surfactant studies during exposure and recovery. *Arch. Pathol.* 1970; 90: 463-472.

Almeida AO. Recherches sur l'action toxique des hautes pressions d'oxygène. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 1934; 116: 1225-1227.

Almeida AO. Essais du traitement du cancer humain par l'oxygène sous pression. *Annaes Da Academia Brasileira de Sciencias* 1935; 7: 191-194.

Almeida AO, Costa HM. Treatment of leprosy by oxygen under high pressure associated with methylene blue. São Paulo. *Revista brasileira de Leprologia* 1938; VI: 499.

Arieli R, Kerem D, Melamed Y. Hyperoxic exposure affects the ventilatory response to hypoxia in awake rats. *J Appl. Physiol.* 1988; 64(1): 181-186.

Astrom A.: On the action of combined carbon dioxide excess and oxygen deficiency in the regulation of breathing. *Acta Physiol. Scand.* 1952; 27 (98-Suppl.): 1-61.

Band DM, Cameron IR, Semple SJ. The effect on respiration of abrupt changes in carotid artery pH and PCO_2 in the cat. *J. Physiol.* 1970; 211: 479-494.

Band DM, Wolff CB. Respiratory oscillations in discharge frequency of chemoreceptor afferents in sinus nerve of anaesthetized cats at normal and low arterial oxygen tensions. *J. Physiol.* 1978; 282: 1-6.

Barois A. L'oxigénotherapie hyperbare. *Revue de l'Infirmière* 1966; 16 (7): 619-627.

Barry BE e Crapo JD 1985. Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% and 85% oxygen. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 548-555.

Bassett B, Bennett PB. Physical and physiological bases of hyperbaric therapy. In: Davis JC, Hunt TK (Eds.). *Hyperbaric Oxygen Therapy*. Bethesda. Undersea Medical Society 1977; p11-24.

Bauer Ph, Larcan A, Broussole B. Effets cardio-respiratoires de l'oxygène hyperbare. In: Wattel F., Mathieu D. (Eds.). *Oxygénothérapie hyperbare et réanimation*. Paris. Masson 1990; p8-15.

Bean JW: Effect of high oxygen pressure on carbon dioxide transport, on blood and tissue acidity, on O₂ consumption and pulmonary ventilation. *J. Physiol.* 1931; 72: 27-48.

Bean JW. Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol. Rev.* 1945; 25: 1-147.

Bean JW. Tris buffer, carbon dioxide, and sympatho-adrenal system in reactions to oxygen at high pressure. *Am. J. Physiol.* 1961. 201: 737-739.

Bean JW. Factors influencing clinical oxygen toxicity. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 1965; 117: 745-755.

Bean JW, Bohr DF. Anoxic effects of high O₂ pressure on smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1940; 130: 445-453.

Bean JW, Johnson PC. Influence of hypophysis on pulmonary injury induced by exposure to oxygen at high pressure and by pneumococcus. *Am. J. Physiol.* 1952; 171: 451-458.

Bean JW, Smith CW. Hypophyseal and adrenocortical factors in pulmonary damage induced by oxygen at atmospheric pressure. *Am. J. Physiol.* 1952; 172: 169-175.

Bean JW, Johnson PC. Epinephrine and neurogenic factors in the pulmonary edema and CNS reactions induced by oxygen at high pressure. *Am. J. Physiol.* 1955; 180: 438-444.

Bean JW, Zee D. Influence of anesthesia and carbon dioxide on CNS and pulmonary effects of oxygen at high pressure. *J. Appl. Physiol.* 1966; 21: 521-526.

Bean JW, Lignell J, Coulson J. Regional cerebral blood flow, O₂, and EEG in exposures to O₂ at high pressure. *J. Appl. Physiol.* 1972; 31: 235-242.

Behnke AR, Fenimore SJ, Poppen JR, Motley EP. The effect of oxygen on man at pressures from 1 to 4 atmospheres. *Am. J. Physiol.* 1935; 110: 565-572.

Behnke AR. A brief history of hyperbaric medicine In: Davis JC, Hunt TK (Eds.). *Hyperbaric Oxygen Therapy*. Bethesda. Undersea Medical Society 1977; p3-10.

Bellville JW, Whipp BJ, Kaufman RD, Swanson GD, Aqleh KA, Wiberg DM. Central and peripheral chemoreflex loop gain in normal and carotid body-resected subjects. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1979; 46: 843-853.

Bergofsky EH, Berton P. Response of regional circulations to hyperoxia. *J. Appl. Physiol.* 1966; 21: 567-572.

Berry S, Fitch JW, Schatte CL. Influence of sex and age on the susceptibility of mice to oxygen poisoning. *Aviat. Space Environ. Med.*, 1977; 48: 37-39.

Bert, P. La pression barométrique, recherches de physiologie expérimentale. Paris. Masson 1878.

Biscoe TJ, Stehbens WE. Ultrastructure of the carotid body. *J. Cell Biol.* 1966; 30: 563-578.

Biscoe TJ, Purves MJ. Observations on the rhythmic variation in the cat carotid body chemoreceptor activity which has the same period as respiration. *J. Physiol.* 1967; 190: 389-412.

Biscoe TJ, Bradley GW, Purves MJ. The relation between carotid body chemoreceptor discharge, carotid sinus pressure and carotid body venous flow. *J. Physiol.* 1970a; 208: 99-120.

Biscoe T J, Purves M, Sampson SR. The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *J. Physiol.* 1970b; 208: 121-131.

Black AMS, McCloskey DI, Torrance RW. The responses of carotid body chemoreceptors in the cat to sudden changes in hypercapnic and hypoxic stimuli. *Respir. Physiol.* 1971; 13: 36-49.

Boehm DE, Vincent K, Brown OR. Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis. *Nature* 1976; 262: 418-420.

Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WH. Life without blood. *Arch. Chir. Neerlandic* 1959; 11: 70-83.

Bourdeau-Martini J, Odoroff CL, and Honig CR: Dual effect of oxygen on magnitude and uniformity of coronary intercapillary distance. *Am. J. Physiol.* 1974; 226: 800-810.

Bouverot P, Flandrois R, Pucinelli R, Dejours P. Étude du rôle des chémorécepteurs artériels dans la regulation de la respiration pulmonaire chez le chien éveillé. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1965; 157: 253-271.

Brewis RA: Oxygen toxicity during artificial ventilation. *Thorax* 1969; 24: 656-666.

Brown OR. Reversible inhibition of respiration of *Escherichia coli* by hyperoxia. *Microbios* 1972; 5: 7-16.

Brummelkamp WH, Hogendijk J, Boerema I. Treatment of anaerobic infections (clostridial myositis) by drenching the tissues with oxygen under high atmospheric pressure. *Surgery* 1961; 49: 299-302.

Bulow K. Respiration and wakefulness in man. *Acta Physiol. Scand.* 1963; 59(Suppl.): 209: 1-110.

Cain SM. Peripheral oxygen uptake and delivery in health and disease. In: Matthay RA; Matthay MA e Dantzker DR (Eds.). *Clinics in chest medicine* 1983; 4(2): p139-148.

Cain SM, Chapler CK: Oxygen extraction by canine hindlimb during hypoxic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 1979; 46: 1023-1028.

Cain SM, Chapler CK: Hindlimb resistance in hypoxic dogs after adrenergic blockade or denervation. *Am. J. Physiol.* 1982; 243: H1010-H1017.

Caldwell PRB, Lee WLJr, Schildkraut HS, Archibald ER: Changes in lung volume, diffusing capacity, and blood gases in men breathing oxygen. *J. Appl. Physiol.* 1966; 21: 1477-1483.

Camporesi EM, Mascia MF, Thom SR. Physiological principles of hyperbaric oxygenation In: Oriani G, Marroni A, Wattel F. (Eds.). *Handbook on hyperbaric medicine*. Milano. Springer-Verlag 1996; p35-58.

Castleman B, McNeely BV. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 7-1967. *N. Engl. J. Med.* 1967; 276: 401-411.

Caulfield JB, Shelton RW, Burke JF. Cytotoxic effects of oxygen on striated muscle. *Arch. Pathol.* 1972; 94: 127-132.

Chance B, Willians GR. The respiratory chain and oxydative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 1956; 17: 65-134.

Chance B, Jamieson D, Coles H. Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro. *Nature* 1965; 206: 257-263.

Cherniack NS, von Euler C, Homma I, Kao FF. Graded changes in central chemoreceptor input by local temperature changes on the ventral surface of the medulla. *J. Physiol.* 1979; 287: 191-211.

Chiodi H, Dill DB, Consolazio F, Horvath SM. Respiratory and circulatory responses to acute CO poisoning. *Am. J. Physiol.* 1941; 134: 683-693.

Clark JM. Oxygen toxicity. In: Bennett PB, Elliot, DH (Eds.). *The physiology and medicine of diving*. London. Baillière Tindall 1982; p200-238.

Clark JM. Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp. Lung Res.* 1988; 14: 897-910.

Clark JM. Oxygen toxicity. In: Bennett PB, Elliot, DH (Eds.). *The physiology and medicine of diving*. London. W.B. Saunders Co. 1993; p121-169.

Burakovsky VI, Bockeria LA. The influence of hyperbaric oxygenation on the living organism. In: *Hyperbaric Oxygenation and its value in cardiovascular surgery*. Moscou. Mir Publishers 1981; p52-80.

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

Clark JM, Lambertsen CJ. Rate of development of pulmonary oxygen toxicity in man during oxygen breathing at 2.0 Ata. *J. Appl. Physiol.* 1971b; 30: 739-752.

Clark JM, Fisher AB. Oxygen toxicity and extension of tolerance in oxygen therapy. In: Davis JC, Hunt TK (Eds.). *Hyperbaric Oxygen Therapy*. Bethesda. Undersea Medical Society 1977; p61-77.

Clark JM, Lambertsen CJ, Montabana DJ, Gelfand R, Cobbs WH. Comparison of visual function effects in man during continuous oxygen exposure at 3.0 and 2.0 ATA for 3.4 and 9 hours (in Predictive Studies V). *Undersea Biomed. Res.* 1988; 15(Suppl.): 32.

Clark JM, Gelfand R, Stevens WC, Lambertsen CJ. Comparison of human visual and pulmonary responses to continuous and intermittent oxygen exposure at 2.0 ATA in Predictive Studies V and VI. *Undersea Biomed. Res.* 1991; 18(Suppl.): 86.

Clark JM, Lambertsen CJ, Gelfand R, Troxel AB. Optimization of oxygen tolerance extension in rats by intermittent exposure. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100: 869-879.

Comroe JHJr, Schmidt CF. The part played by reflexes from the carotid body in the chemical regulation of respiration in the dog. *Am. J. Physiol.* 1938; 121: 75-97.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (Eds.). *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia. W. B. Saunders Company. 1999; 1251p.

Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu. Rev. Physiol.* 1986; 48: 721-731.

Davies RO, Nishino T, Lahiri S. Sympathectomy does not alter the response of carotid chemoreceptors to hypoxemia during carboxyhemoglobinemia or anemia. *Neurosci. Lett.* 1981; 21: 159-163.

de Burgh Daly M, Lambertsen CJ, Schwetzer A. Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *J. Physiol.* 1954; 125: 67-89.

de Burgh Daly M, Unger A: Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog. *J. Physiol.* 1966; 182: 379-403.

De Castro F. Sur la structure de la synapse dans les chemorecepteurs: leur mecanisme d'excitation et rôle dans la circulation sanguine locale. *Acta Physiol. Scand.* 1951; 22: 14-43.

De Martino G, Luchetti M, De Rosa RC. Toxic effects of oxygen. In: Oriani G, Marroni A, Wattel F. (Eds.). *Handbook on hyperbaric medicine*. Milano. Springer-Verlag 1996; p59-74.

Dejours P. Chemoreflexes in breathing. *Physiol. Rev.* 1962; 42(3): 335-358.

Deneke SM, Barry, LF. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N. Engl. J. Med.* 1980; 303: 76-86

Di Giulio C, Di Muzio M, Sabatino G, Spoletini L, Amicarelli F, Di Ilio C, Modesti A. Effect of chronic hyperoxia on young and old rat carotid body ultrastructure. *Exp. Gerontol.* 1998; 33(4):319-29.

Dickens F. The toxic effects of oxygen on brain metabolism and on tissue enzymes. *Biochem. J.* 1946; 40: 145-186.

Domizi DB, Perkins Jr JF, Byrne JS. Ventilatory response to fixed acid evaluated by "Iso-PCO₂" technique. *J. Appl. Physiol.* 1959; 14: 557-561.

Donald KW. Oxygen poisoning in man I. *Br. Med. J.* 1947a; 1: 667-672.

Donald KW. Oxygen poisoning in man II. *Br. Med. J.* 1947b; 1: 712-717.

Downes JJ, Lambertsen CJ. Dynamic characteristics of ventilatory depression in man on abrupt administration of O₂ at 1.0 atm. *J Appl. Physiol.* 1966; 21(2): 447-453.

Dripps RD, Comroe JH Jr. The respiratory and circulatory response of normal man to inhalation of 7.6 and 10.4 per cent CO₂ with a comparison of the maximal ventilation produced by severe muscular exercise, inhalation of CO₂ and maximal voluntary hyperventilation. *Am. J. Physiol.* 1947; 149: 43-51

Duke HN, Green JH, Neil E. Carotid chemoreceptor impulse activity during inhalation carbon monoxide mixtures. *J. Physiol.* 1952; 118: 520-527.

Duling BR, Berne RM. Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension: a possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ Res.* 1970; 27: 669-678.

Edström JE, Röckert H. The effect of oxygen at high pressure on the histology of the central nervous system and sympathetic. *Acta physiol. Scand.* 1962; 55: 255-263.

Edwards C, Heath D, Harris P, Castillo Y, Krüger H, Arias-Stella J. The carotid body in animals in high altitude. *J. Pathol.* 1970; 104: 231-238.

Eyzaguirre C, Lewin J. Effect of different oxygen tensions of the carotid body in vitro. *J. Physiol.* 1961; 159: 238-250.

Eyzaguirre C, Uchizono K. Observations on the fiber content of nerves reaching the carotid body of the cat. *J. Physiol.* 1961; 159: 268-281.

Eyzaguirre C, Koyano H. Effects of hypoxia, hypercapnia and pH on the chemoreceptor activity of the carotid body in vitro. *J. Physiol.* 1965; 178(3): 385-409.

Fay FS. Oxygen consumption of the carotid body. *Am. J. Physiol.* 1970; 218: 518-523.

Fidone SJ, Sato A. A study of chemoreceptor and baroreceptor A and C-fibres in the cat carotid nerve. *J. Physiol.* 1969; 205: 527-548.

Fidone SJ, Gonzalez C. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In: Fishman AP, Cherniack NS, Widdicombe JG, Geiger SR. (Eds.). Handbook of physiology. The respiratory system. Control of breathing. Bethesda. Am. Physiol. Soc. 1986; II (part 1): p247-312.

Fink BR. The stimulant effect of wakefulness on respiration: clinical aspects. *Br. J. Anaesth.* 1961; 33: 97-101.

Fitzgerald RS, Zajtchuk JT, Penman RWB, Perkins RF Jr. Ventilatory response to transient perfusion of carotid chemoreceptors. *Am. J. Physiol.* 1964; 207: 1305-1313.

Fitzgerald RS, Parks DC. Effect of hypoxia on carotid chemoreceptor response to carbon dioxide in cats. *Respir. Physiol.* 1971; 12: 218-229.

Fitzgerald RS, Dehghani GA. Neural responses of the cat carotid and aortic bodies to hypercapnia and hypoxia. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ Exercise Physiol.* 1982; 52: 596-601.

Fitzgerald RS, Lahiri S. Reflex response to chemoreception stimulation. In: Fishman AP, Cherniack NS, Widdicombe JG, Geiger SR. (Eds.). Handbook of physiology. The respiratory system. Control of breathing. Bethesda. Am. Physiol. Soc. 1986; II(part 1): p313-362.

Floyd TF, Clark JM, Gelfand R, Detre JA, Ratcliffe S, Guvakov D, Lambertsen CJ, Eckenhoff RG. Independent cerebral vasoconstrictive effects of hyperoxia and accompanying arterial hypocapnia at 1 ATA. *J. Appl. Physiol.* 2003; 95: 2453-2461.

Foster CA, Churchill-Davidson I. Response to high pressure oxygen of conscious volunteers and patients *J. Appl. Physiol.* 1963; 18: 492-496.

Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 10986-10992.

Fridovich J. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provides an important defense. *Science* 1978; 201: 875-880.

Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Rep.* 1999; 19: 235-251.

Fujishiro N, Endo Y, Warashina A, Inoue M. Mechanisms for hypoxia detection in O₂-sensitive cells. *Jpn. J. Physiol.* 2004; 54: 109-123.

Fuson RL, Saltzman HA, Smith WW, Whalen RE, Osterhout S, Parker RF: Clinical hyperbaric oxygenation with severe oxygen toxicity. *Report of a case. N. Engl. J. Med.* 1965; 273: 415-419.

Gallego R, Eyzaguirre C, Monti-Bloch L. Thermal and osmotic responses of arterial receptors. *J. Neurophysiol.* 1979; 42: 665-680.

Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626.

Gerschman R, Gilbert DL, Caccamise D. Effects of various substances on survival times of mice exposed to different high oxygen tensions. *Am. J. Physiol.* 1958; 563-571.

Gelfand R, Lambertsen CJ, Clark JM, Hopkin E. hypoxic ventilatory sensitivity in man is not reduced by prolonged hyperoxia (Predictive Studies V and VI). *J. Appl. Physiol.* 1998; 84: 292-302.

Gesell R. On the chemical regulation of respiration. I. The regulation of respiration with special references to the metabolism of the respiratory center and the coordination of the dual function of the hemoglobin. *Am. J. Physiol.* 1923; 66: 5-49.

Giese K, Berndt J, Berger W. Interaction of central and peripheral respiratory drives in cats II. Peripheral and central interaction of hypoxia and hypercapnia. *Pflügers Arch.* 1978; 374: 211-217.

Goldberg LI, Volkman PH, Kohli JD. A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1978; 18: 57-79.

Goldstein JR, Mengel CE. Hemolysis in mice exposed to varying levels of hyperoxia. *Aerosp. Med.* 1969; 40: 12-13.

Goodman AH, Einstein R, Granger HJ: Effect of changing metabolic rate on local blood flow control in the canine hindlimb. *Circ. Res.* 1978; 43: 769-776.

Gould VE, Tosco R, Wheelis RF, Gould NS, Kapanci Y. Oxygen pneumonitis in man. *Lab. Invest.* 1972; 26: 499-508.

Granger HJ, Goodman AH, Cook BK: Metabolic models of microcirculatory regulation. *Fed. Proc.* 1975; 34: 2025.

Grover RF, Vogel JH, Voigt GC, Blount SGJr. Reversal of high altitude pulmonary hypertension. *Am. J. Cardiol.* 1966; 18: 928-932.

Guimarães CA, Linden R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271: 1638-1650.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyegaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-394.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Philadelphia. W.B. Saunders Company 2000; p474-483.

Hansen JT. Morphology of the carotid body chemoreceptor in aged primates. In: Lahiri S, Foster RE, Davis RO, Pack AI (Eds). Chemoreceptor and reflexes in breathing. New York, NY. Oxford University Press 1989; p31-36.

Harabin AL, Farhi LE. Arterial hyperoxemia with tissue hypoxia during exposure to 100% O₂ at 1 ATA (Abstract). *Physiologist*. 1978; 21(4): 50.

Harabin LA, Homer LD, Bradley ME. Pulmonary oxygen toxicity in awake dogs: metabolic and physiological effects. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1984; 57: 1480-1488.

Heath D. The human carotid body in health and disease. *J. Pathol.* 1991; 164: 1-8.

Heistad DD, Marcus ML: Evidence that neural mechanisms do not have important effects on cerebral blood flow. *Circ. Res.* 1978; 42: 295-302.

Hendricks PL, Hall DA, Hunter Jr WH, Haley PJ. Extension of pulmonary oxygen tolerance in man at 2 ATA by intermittent oxygen exposure. *J. Appl. Physiol.* 1977; 42: 593-599.

Hess RT, Menzel DB. Effect of dietary antioxidant level and oxygen exposure on the fine structure of the proximal convoluted tubules. *Aerosp. Med.* 1971; 42: 646-649.

Hess A, Zapata P. Innervation of the cat carotid body; normal and experimental studies. *Fed. Proc.* 1972; 31: 1365-1382.

Heymans C, Bouckaert JJ, Dautrebande L. Sinus carotidien et reflexes respiratoires; sensibilité des sinus carotidiens aux substances chimiques. Action stimulante respiratoire réflexe du sulfure de sodium, du cyanure de potassium de la nicotine et de la lobéine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1931; 40: 54-91.

Hill GB, Osterhout S. Experimental effects of hyperbaric oxygen on selected clostridial species. 1. In-vivo studies. *J. Infect. Dis.* 1972; 125: 17-25.

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 191-220.

Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubinik R, Diez M. Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1337-1356.

Hoffman BB, Taylor P. Neurotransmissão. Os sistemas nervosos autônomo e motor simpático. In: Hardman JG, Limbird LE (Eds.). Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro. McGraw-Hill Companies. 2003; 6: p89-117.

Holm BA, Notter RH, Siegle J, Matalon S. Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J. Appl. Physiol.* 1985; 59: 1402-1049.

Holton P, Wood JB. The effects of bilateral removal of the carotid sinuses in two human subjects. *J. Physiol.* 1965; 181: 365-378.

Honda Y. Role of carotid chemoreceptors in control of breathing at rest and in exercise: studies on human subjects with bilateral carotid body resection. *Jpn. J. Physiol.* 1985; 35: 535-544.

Hornbein TF, Roos A. Specificity of H⁺ ion concentration as a carotid chemoreceptor stimulus. *J. Appl. Physiol.* 1963; 18: 580-584.

Hoshi T, Lahiri S. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* 2004; 306(5704): 2093-2097.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 377(6546): 239-242.

Hulpieu HR., Cole VV. The effect of humidity and temperature on oxygen toxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 1944; 29: 1134-1138.

Hunt TK, Niinikolski J, Zederfeldt BH, Silver IA. Oxygen in wound healing enhancement: cellular effects of oxygen. In: Davis JC, Hunt TK (Eds.). *Hyperbaric Oxygen Therapy*. Bethesda. Undersea Medical Society 1977; p111-122.

Hyacinthe R. L'Hypercapnie. In: Broussolle B (Ed.). *Physiologie et médecine de la plongée*. Paris. Ellipses 1992 ; p318-322.

Iazzetti PE. Hiperoxigenação hiperbárica. In: Terzi RGG (Ed.). *Equilíbrio ácido-básico e transporte de oxigênio*. São Paulo. Manole 1992; p180-204.

Iazzetti PE. Oxigenoterapia Hiperbárica. *Medical Master: Anais de Atualização Médica* 1998; 3: 73-84.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 34: 879-886.

Jacobson I, Harper AM, McDowall DG. The effects of oxygen under pressure on cerebral blood flow and cerebral venous oxygen tension. *Lancet* 1963; 2: 549.

Jamieson D. The effect of anaesthesia and carbon dioxide on survival time and lung damage in rats exposed to high pressure oxygen. *Biochem. Pharmacol.* 1966; 15: 2120-2122.

Jamieson D, Cass N: CNS and pulmonary damage in anesthetized rats exposed to hyperbaric oxygen. *J. Appl. Physiol.* 1967; 23: 235-242.

Kapanci Y, Weibel ER, Kaplan HP, Robinson FR: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab. Invest.* 1969; 20: 101-118.

Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes – physiology and clinical implications. *Acta Physiol. Scand.* 2003; 177: 377–384.

Ketty SS, Schmidt CF. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J. Clin. Invest.* 1948; 27: 484-492.

Kindall EP, Goldmann RW. Hyperbaric medicine procedures. St. Luke's Hospital, Milwaukee, MI (E.U.A) 1970; 204p.

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: 605-628.

Klein J. Normobaric pulmonary oxygen toxicity. *Anesth. Analg.* 1990; 70: 195-207.

Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 821–826, 2002.

Kondo H. Innervation of the carotid body of the adult rat. A serial ultrathin section analysis. *Cell Tissue Res.* 1976; 173: 1-15.

Kuo L, Pittman RN. Effect of hemodilution on oxygen transport in arteriolar networks of hamster striated muscle. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H331-H339.

Lahiri S. Role of arterial O₂ flow in peripheral chemoreceptor excitation. *Fed. Proc.* 1980; 39: 2648-2652.

Lahiri S, Delaney RG. Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir. Physiol.* 1975; 24: 249-266.

Lahiri S, DeLaney RG. Relationship between carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir. Physiol.* 1975; 24: 267-286.

Lahiri S, Mokashi A, DeLaney RG, Fishman AP. Arterial PO₂ and PCO₂ stimulus threshold for carotid chemoreceptors and breathing. *Respir. Physiol.* 1978; 34: 359-375.

Lahiri S, Nishino T, Mokashi A, Mulligan E. Interaction of dopamine and haloperidol with O₂ and CO₂ chemoreception in carotid body. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1980; 49: 45-51.

Lahiri S, Mulligan E, Nishino T, Mokashi A, Davies RO. Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to carboxyhemoglobinemia. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1981a; 50: 580-586.

Lahiri S, Mokashi A., Mulligan E., Nishino T. Comparison of aortic and carotid chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1981b; 51: 55-61.

Lahiri S, Mulligan E, Andronikou S, Shirahata M, Mokashi A. Carotid body chemosensory function in prolonged normobaric hyperoxia in the cat. *J. Appl. Physiol.* 1987; 62: 1924-1931.

Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR. Oxygen sensing in the body. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2006; 91(3): 249-286.

Laidler P, Kay JM. A quantitative morphological study of the carotid bodies of rats living at a simulated altitude of 4300. *J. Pathol.* 1975; 117: 183-191.

Lambertsen CJ. Carbon dioxide and respiration in acid-base homeostasis. *Anesthesiology* 1960; 21: 642-651.

Lambertsen CJ. Oxygen. Introductory remarks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962; 117: 727-729.

Lambertsen CJ: Therapeutic gases: oxygen, carbon dioxide and helium. In: DiPalma JR. (Ed.). *Drill's pharmacology in medicine*. New York. McGraw-Hill Book Co. 1971; p1145-1179.

Lambertsen CJ. A atmosfera e as permutas gasosas com os pulmões e com o sangue. In: Mountcastle VB. (Ed.). *Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978a; p1377-1403.

Lambertsen CJ. Transporte de oxigênio e gás carbônico pelo sangue In: Mountcastle VB. (Ed.). *Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978b; p1404-1428.

Lambertsen CJ. Fatores neurogênicos no controle da respiração. In: Mountcastle VB. (Ed.). *Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978c; p1429-1453.

Lambertsen CJ. Controle químico da respiração em repouso. In: Mountcastle VB. (Ed.). *Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978d; p1454-1503.

Lambertsen CJ, Kough RH, Cooper DY, Emmal AL, Loeschicke HH, Schmidt CF. Oxygen toxicity: effects in man of oxygen inhalation at 1 and 3.5 atmospheres upon blood gas transport, cerebral circulation and cerebral metabolism. *J. Appl. Physiol.* 1953; 5: 471-486.

Lambertsen CJ, Wendel H, Chiodi H, Owen SG: Respiratory effects of .08 and .8 atmospheres of inspired PO_2 at a "constant" alveolar PCO_2 of 43 mm. Hg, *Fed. Proc.* 1957; 16: 76.

Lambertsen CJ, Semple SJG, Smyth MG, Gelfand R. H^+ and PCO_2 as chemical factors in respiratory and cerebral circulatory control. *J. Appl. Physiol.* 1961; 16: 473-484.

Lambertsen CJ, Hall P, Wollman H, Goodman MW: Quantitative interactions of increased PO_2 and PCO_2 upon respiration in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1963; 109: 731-742.

Landgren S, Neil E. Chemoreceptor impulse activity following haemorrhage. *Acta Physiol. Scand.* 1951; 23: 158-167.

Larkin, EC, Adams JD, Williams WT, Duncan DM. Hematologic responses to hypobaric hypoxia. *Am. J. Physiol.* 1972; 223: 431-437.

Lassen NA: Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol. Rev.* 1959; 39(2): 183-238.

Lee KD, Mayou RA, Torrance RW. The effect of blood pressure upon chemoreceptor discharge to hypoxia, and the modification of this effect by the sympathetic-adrenal system. *Q. J. Exp. Physiol.* 1964; 49: 171-183.

Lee LY, Milhorn HTJr. Central ventilatory responses to O₂ and CO₂ at three levels of carotid chemoreceptor stimulation. *Respir. Physiol.* 1975; 25: 319-333.

Leitner LM, Pages B, Puccinelli R, Dejours P. Etudes simultanées de la ventilation et des décharges des chemorecepteurs du glomus carotidien chez le chat. I. Au cours d'inhalations brèves d'oxygène pur. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1965; 154: 421-426.

Leitner LM, Liaubet MJ. Carotid body oxygen consumption of the cat *in vitro*. *Pflügers Arch.* 1971; 323: 315-322.

Leusen I. Regulation of cerebrospinal fluid composition with reference to breathing. *Physiol. Rev.* 1972; 52: 1-56.

Levitzky MG. Pulmonary Physiology. New York. Mc Graw-Hill 1995; 9: p197-199.

Li Y-L, Li Y-F, Liu D, Cornish KG, Patel KP, Zucker IH, Channon KM, Schultz HD. Gene transfer of neuronal nitric oxide synthase to carotid body reverses enhanced chemoreceptor function in heart failure rabbits. *Circ. Res.* 2005; 97: 260-267.

Liberzon I, Arieli R, Kerem D. Attenuation of hypoxic ventilation by hyperbaric O₂: effects of pressure and exposure time. *J. Appl. Physiol.* 1989; 66: 851-856.

Lloyd BB. The interactions between hypoxia and other ventilatory stimuli. In: Hatcher JD, Jennings B. (Eds.). Proceedings of international symposium on cardiovascular and respiratory effects of hypoxia. Basel. Karger 1966; p146-165.

Lloyd BB, Jukes MGM, Cunningham DJC: The relation between alveolar oxygen pressure and the respiratory response to carbon dioxide in man. *Q. J. Exp. Physiol.* 1958; 43: 214-227.

Love TL, Schnure, JJ, Larkin EC, Lipman RL, Lecocq FR. Glucose intolerance in man during prolonged exposure to hypobaric-hyperoxic environment. *Diabetes* 1971; 20: 282-285.

Lugliani R, Whipp J, Seard C, Wasserman K. Effect of bilateral carotid-body resection on ventilatory control at rest and during exercise in man. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285: 1105-1111.

MacDougall JDB, Coupland RE. Organ culture under hyperbaric oxygen. *Exp. Cell Res.* 1967; 45: 385-398.

Mader JT. La OHB en enfermedades infecciosas. Anais do 1o Congresso Panamericano de Medicina Hyperbárica e do Mergulho, Buenos Aires 1988.

Marshall JR, Lambertsen CJ. Interactions of increased pO₂ and pCO₂ effects in producing convulsions and death in mice. *J. Appl. Physiol.* 1961; 16: 1-7.

Martin-Body RL, Robson GJ, Sinclair JD. Restoration of hypoxic respiratory responses in the awake rat after carotid body denervation by sinus nerve section. *J. Physiol.* 380: 61–73, 1986.

Matalon S, Nesarajah MS, Farhi LE. Pulmonary and circulatory changes in conscious sheep exposed to 100% O₂ at 1 ATA. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1982; 53: 110-116.

McCloskey DI, Torrance RW. Autorregulation of blood flow in the carotid body. *Respir. Physiol.* 1971; 13: 23-35.

McDonald DM. Structure-function relationships of chemoreceptive nerves in the carotid body. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1977; 115 (6 Pt 2): 193-207.

McDonald DM. Regulation of chemoreceptor sensitivity in the carotid body: the role of presynaptic sensory nerves. *Fed. Proc.* 1980; 39: 2627-2635.

McDonald DM. A morphometric analysis of blood vessels and perivascular nerves in the rat carotid body. *J. Neurocytol.* 1983; 12:155-199.

McDonald DM, Mitchell RA. The innervation of glomus cell, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* 1975; 4:177-230.

McDonald DM, Larue DT. The ultrastructure and connections of blood vessels supplying the rat carotid body and carotid sinus. *J. Neurocytol.* 1983; 12:117-153.

McGregor KH, Gil J, Lahiri S. A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1984; 57: 1430-1438.

McMahon TJ, Hood JS, Kadowitz PJ. Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the cat. *Circ. Res.* 1992; 70: 364-369.

Michel CC. Csf [HCO₃⁻] during respiratory acid-base disturbance. *J. Physiol.* 1964; 170(Suppl): 66P-67P.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2146-2152.

Miller JP, Cunningham DJ, Lloyd BB, Young JM. The transient respiratory effects in man of sudden changes in alveolar CO₂ in hypoxia and in high oxygen. *Respir. Physiol.* 1974; 20: 17-31.

Miller MJ, Tenney SM. Hyperoxic hyperventilation in carotid-deafferented cats. *Respir. Physiol.* 1975; 23: 23-30.

Mills E, Edwards MWJr. Stimulation of aortic and carotid chemoreceptors during carbon monoxide inhalation. *J. Appl. Physiol.* 1968; 25: 494-502.

Milnor WR. Sistema Cardiovascular. In: Mountcastle VB. (Ed.). Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978a; p841-850.

Milnor WR. Mecanismos autonômicos e periféricos de controle. In: Mountcastle VB. (Ed.). Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978b; p943-957.

Milnor WR. Circulações regionais. In: Mountcastle VB. (Ed.). Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978c; p993-1007.

Milnor WR. Circulação Pulmonar. In: Mountcastle VB. (Ed.). Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 1978d; p1008-1017.

Mitchell RA, McCloskey DI. Chemoreceptor responses to sympathetic stimulation and changes in blood pressure. *Respir. Physiol.* 1974; 20: 297-302.

Mokashi A, Lahiri S. Aortic and carotid body chemoreception in prolonged hyperoxia in the cat. *Respir. Physiol.* 1991; 86: 233-243.

Mokashi A, Di Giulio C, Morelli L, Lahiri S. Chronic hyperoxic effects on cat carotid body catecholamines and structure. *Respir. Physiol.* 1994; 97: 25-32.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* 1997; 49: 137-142.

Moody EJ, Simon BA, Johns RA. Gases terapêuticos. Oxigênio, dióxido de carbono, óxido nítrico e hélio. In: Hardman JG, Limbird LE (Eds.). Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro. The McGraw-Hill Companies 2003; p293-302.

Morrell ED, Tsai BM, Crisostomo PR, Wang M, Markel TA, Lillemoe KD, Meldrum DR. Therapeutic concepts for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving ion regulation and the smooth muscle contractile apparatus. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006; 40: 751-60.

Morrill CG, Meyer JR, Weil JV. Hypoxic ventilatory depression in dogs. *J. Appl. Physiol.* 1975; 38: 143-146.

Mulligan E, Lahiri S. Dependence of carotid chemoreceptor stimulation by metabolic agents on PaO_2 and PaCO_2 . *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1981; 50: 884-891.

Mulligan E, Lahiri S. Separation of carotid body chemoreceptor responses to O_2 and CO_2 by oligomycin and by antimycin A. *Am. J. Physiol.* 1982; 242(3): C200-C206.

Nahas GG, Ligou JC, Mehlman B. Effects of pH changes on O_2 uptake and plasma catecholamine levels in the dog. *Am. J. Physiol.* 1960; 198: 60-66.

Nair P, Spande JI, Whalen WJ. Marking the tip location of PO_2 microelectrodes or glass micropipettes. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1980; 49: 916-918.

Nash G, Blennerhassett JB, Pontoppidan H. Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation. *N. Engl. J. Med.* 1967; 276:368-374.

Nichols CW, Lambertsen CJ. Effects of high oxygen pressure on the eye. *N. Engl. J. Med.* 1969; 281: 25-30.

Nielsen M, Smith H. Studies on the regulation of respiration in acute hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 1952; 24(4): 293-313.

Nishi K, Stensaas LJ. The ultrastructure and source of nerve endings in the carotid body. *Cell Tissue Res.* 1974; 154: 303-319.

Nishiki K, Jamieson D, Oshino N, Chance B. Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions. *Biochem. J.* 1976; 160: 343-355.

O'Regan RG. Oxygen usage of the cat carotid body perfused with cell-free solutions. *Ir. J. Med. Sci.* 1979; 148: 69-77.

O'Regan RG. Responses of carotid body chemosensory activity and blood flow to stimulation of sympathetic nerves in the cat. *J. Physiol.* 1981; 315: 81-88.

Oriani G, Michael M, Marroni A, Longoni C. Physiology and physiopathology of hyperbaric oxygen. In: Oriani G, Marroni A, Wattel F. (Eds.). Handbook on hyperbaric medicine. Milano. Springer-Verlag 1996; p1-34.

Paintal AS. Mechanisms of stimulation of aortic chemoreceptors by natural stimuli and chemical substances. *J. Physiol.* 1967; 189: 63-84.

Patel YZ, Gowdey CW: Effects of single and repeated exposures to oxygen of high pressure on normal rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1964; 42: 245-264.

Patz A. The role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 1957; 19: 504-524.

Penrod KE. Nature of pulmonary damage produced by high oxygen pressures. *J. Appl. Physiol.* 1956; 9: 1-4.

Pierce EC, Jacobson JH. Cerebral edema. In: Davis JC, Hunt TK (Eds.). Hyperbaric Oxygen Therapy. Bethesda. Undersea Medical Society 1977; p287-301.

Piiper J, Di Prampero PC, Cerreteli P: Oxygen debt and high-energy phosphates in gastrocnemius muscle of the dog. *Am. J. Physiol.* 1968; 215: 523-531.

Prabhakar NR, Kumar GK, Chang CH, Agani FH, Haxhiu MA. Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. *Brain Res.* 1993; 625: 16-22.

Prabhakar NR, Peng Y-J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96: 359-366.

Priestley J. Experiments and observations on different kinds of air. J. Johnson at St. Paul's Churchyard. London. 1775; Vol. 2: p101.

Purves MJ. The effect of hypoxia, hypercapnia and hypotension upon carotid body blood flow and oxygen consumption in the cat. *J. Physiol.* 1970a; 209: 395-416.

Purves MJ. The role of cervical sympathetic nerve in the regulation of oxygen consumption of the carotid body of the cat. *J. Physiol.* 1970b; 209: 416-431.

Rasmussen JP, Dauchot PJ, DePalma RG, Sorensen B, Regula G, Anton AH, Growenstein JS. Cardiac function and hypercarbia. *Arch. Surg. Chicago* 1978; 113: 1196-1200.

Resolução nº 1457/95 de 15 de setembro de 1995. Conselho Federal de Medicina. Diário Oficial da União. Brasília. 19 de setembro de 1995; Seção I (pt. 1): p 16.585.

Ridderstrale Y, Hanson MA. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the cat carotid body. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1984; 429: 398-400.

Riedestra JW. Influence of central and peripheral PCO₂ (pH) on the ventilatory response to hypoxic chemoreceptor stimulation. *Acta. Physiol. Pharmacol. Neerl.* 1963; 12: 407-452.

Rivero DHRF, Soares SRC, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Acute pulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol. Sci.* 2005; 85: 898-905.

Robin ED, Bromberg PA. Claude Bernard's milieu interieur extended: intracellular acid-base relationships. *Am J. Med.* 1959; 27: 689-692.

Robinson FR, Harper DTJr, Thomas AA, Kaplan HP: Proliferative pulmonary lesions in monkeys exposed to high concentrations of oxygen. *Aerosp. Med.* 1967; 38: 481-486.

Ross LL. Electron microscopic observations of the carotid body of the cat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1959; 6: 253-262.

Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 325-415.

Savitt MA, Rankin JS, Elbeery JR, Owen CH, Camporesi EM. Influence of hyperbaric oxygen on left ventricular contractility, total coronary blood flow, and myocardial oxygen consumption in the conscious dog. *Undersea Hyperb. Med.* 1994; 21: 169-183.

Schaffner F, Felig P. Changes in hepatic structure in rats produced by breathing pure oxygen. *J. Cell Biol.* 1965; 27: 505-517.

Schaffner F, Felig P, Trachtenberg E. Structure of rat lung after protracted oxygen breathing. *Arch. Pathol.* 1967; 83: 99-107.

Schlaefke ME, See WR, Herker-See A, Loeschcke HH. Respiratory response to hypoxia and hypercapnia after elimination of central chemosensitivity. *Pflügers Arch.* 1979; 381: 241-248.

Seidl E. On the variability of form and vascularization of the cat carotid body. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1976; 149(1): 70-86.

Severinghaus JW, Mitchell RA, Richardson BW, Singer MM. Respiratory control at high altitude suggesting active transport regulation of CSF pH. *J. Appl. Physiol.* 1963; 18: 1155-1166.

Shaw LA, Behnke AR, Messer AC. The role of carbon dioxide in producing symptoms of oxygen poisoning. *Am. J. Physiol.* 1934; 108: 652-661.

Smith JL. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J. Physiol.* 1899; 24: 19-35.

Smith LJ. Hyperoxic lung injury: biochemical, cellular, and morphologic characterization in the mouse. *J. Lab. Clin. Med.* 1985; 106: 269-278.

Smith P, Jago R, Heath D. Anatomical variation and quantitative histology of the normal and enlarged carotid body. *J. Pathol.* 1982; 137: 287-304.

Sokolovsky M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 1995; 68: 435-471.

Sperling DR. Hyperbaric oxygen toxicity in newborn and developing mice. *J. Appl. Physiol.* 1970; 29: 472-474.

Stadie WC, Riggs BC, Haugaard N. Oxygen poisoning: III. The effect of high oxygen pressures upon the metabolism of brain. *J. Biol. Chem.* 1945a; 160: 191-208.

Stadie WC, Riggs BC, Haugaard, N. Oxygen poisoning: IV. The effect of high oxygen pressures upon the metabolism of liver, kidney, lung and muscle tissue. *J. Biol. Chem.* 1945b.160: 209-216.

Starlinger H, Lübbers D. Oxygen consumption of the isolated carotid body tissue (cat). *Pflügers Arch.* 1976; 366: 61-66.

Steinsland OS, Furchgott RF, Kirpekar SM. Inhibition of adrenergic neurotransmission by parasympathomimetics in the rabbit ear artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973, 184: 346-356.

Sullivan CE, Kozar LF, Murphy E, Phillipson FA. Primary role of respiratory afferents in sustaining breathing rhythm. *J. Appl. Physiol.* 1978; 45: 11-17.

Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *N. Engl. J. Med.* 1996; 20: 1642-1648.

Torbati D, Mokashi A, Lahiri S. Effects of acute hyperbaric oxygenation on respiratory control in cats. *J. Appl. Physiol.* 1989; 67: 2351-2356.

Torbati D, Sherpa AK, Lahiri S, Mokashi A, Albertine KH, Di Giulio C. Hyperbaric oxygenation alters carotid body ultrastructure and function. *Respir. Physiol.* 1993; 92: 183-196.

Troy SS, Ford DH. Hormonal protection of rats breathing oxygen at high pressure. *Acta Neurol. Scand.* 1972; 48: 231-242.

Ungar A, Bouverot P. The ventilatory responses of conscious dogs to isocapnic oxygen tests. A method of exploring the central component of respiratory drive and its dependence on O₂ and CO₂. *Respir. Physiol.* 1980; 39: 183-197.

Valimaki M. Arterial and tissue gas tensions in rats during development of pulmonary oxygen poisoning. *Aviat. Space Environ. Med.* 1975; 46: 883-886.

van den Brenk HAS, Jamieson D. Pulmonary damage due to high pressure oxygen breathing in rats. 1. Lung weight, histological and radiological studies. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1962; 40: 37-50.

Verna A. Ultrastructure of the carotid body in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 1979; 60: 271-330.

Vinhaes ENG. Avaliação estrutural quantitativa do corpo carotídeo humano frente à hipóxia aguda. Tese de doutoramento. São Paulo. FMUSP. 1998; 76p.

Vinhaes ENG, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Morphological changes of carotid bodies in acute respiratory distress syndrome: a morphometric study in humans. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35(10): 1119-1125.

Viveros DH, Garlick DG, Renkin EM: Sympathetic beta adrenergic vasodilation in skeletal muscle of the dog. *Am. J. Physiol.* 1968; 215: 1218-1225.

von Euler US, Liljestrand G, Zotterman Y. 1939. The excitation mechanism of the chemoreceptors of the carotid body. *Skand. Arch. Physiol.* 1939; 83: 132-152.

von Euler US, Liljestrand G: Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 1946; 12: 301-320.

Wattel F. Introduction. In: Wattel F., Mathieu D. (Eds.). *Oxygénothérapie hyperbare et réanimation*. Paris. Masson 1990; p1-3.

Wattel F, Guieu J, Mathieu D. Toxicité de l'oxygène hyperbare sur le système nerveux. In: Wattel F., Mathieu D. (Eds.). *Oxygénothérapie hyperbare et réanimation*. Paris. Masson 1990; p8-15.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 1963; 12(2): 131-155.

Weir FW, Bath DW, Yevich P, Oberst FW: Study of effects of continuous inhalation of high concentrations of oxygen at ambient pressure and temperature. *Aerosp. Med.* 1965; 36: 117-120.

Welch BE, Morgan Jr. TE, Clamann HG. Time-concentration effects in relation to oxygen toxicity in man. *Fed. Proc.* 1963; 22: 1053-1056.

West JB. Control of ventilation. In: West JB. (Ed.). *Physiological basis of medical practice*. Baltimore. Williams and Wilkins 1991; p579-587.

Whalen WJ, Savoca J, Nair P. Oxygen tension measurements in carotid body of the cat. *Am. J. Physiol.* 1973; 225: 986-991.

Whalen WJ, Nair P. Some factors affecting tissue PO_2 in the carotid body. *J. Appl. Physiol.* 1975; 39: 562-566.

Whalen WJ, Nair P. PO_2 in the carotid body perfused and/or superfused with cell-free media. *J. Appl. Physiol.* 1976; 41: 180-184.

Whalen WJ, Nair P, Sidebotham L, Spande J, Lacerna M. Cat carotid body: oxygen consumption and other parameters. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1981; 50: 129-133.

Wood CD, Seager LD. The influence of autonomic blockade on aconitine induced pulmonary edema. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964; 116: 809-811.

Wood CD, Perkins GF. . Factors influencing hypertension and pulmonary edema produced by hyperbaric O_2 . *Aerosp. Med.* 1970; 41: 869-872.

Wood JD. GABA and oxygen toxicity: a review. *Brain Res. Bull.* 1980; 5(Suppl. 2): 770-780.

Wood JD, Watson WJ Stacey NE. A comparative study of hyperbaric oxygen-induced and drug-induced convulsions with particular reference to gamma-aminobutyric acid metabolism. *J. Neurochem.* 1966; 13: 361-370.

Yamamoto E, Wittner M, Rosenbaum RM. Resistance and susceptibility to oxygen toxicity by cell types of the gas-blood barrier of the rat lung. *Am. J. Pathol.* 1970; 59: 409-435.