

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

Exposição de pequenos animais à hiperoxia – um modelo para estudo do papel do músculo liso na hiperreactividade brônquica

Hyperoxia – a model to study the role of airway smooth muscle on bronchial hyperresponsiveness

T GAMBOA*, A BENSABAT RENDAS**

Departamento de Fisiopatologia, Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Nova de Lisboa.

(Director: Professor Doutor António Manuel Bensabat Rendas)

* Assistente de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

** Professor Catedrático de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa

Recebido para publicação: 02.04.18

Aceite para publicação: 02.06.04

RESUMO

A exposição de pequenos animais a níveis elevados de oxigénio no ar inspirado reproduz muitas das alterações morfológicas e funcionais que se encontram na displasia broncopulmonar e na asma brônquica. Assim, alguns grupos têm utilizado modelos animais expostos à hiperoxia com o objectivo de determinar o papel das modificações da arquitectura das vias aéreas na génese da hiperreactividade brônquica que se encontra em ambas as patologias humanas. Estudos realizados na última década, demonstraram, através de técnicas *in vivo* e *in vitro*, uma associação entre as modificações induzidas pelo oxigénio sobre o músculo liso brônquico e a resposta a agonistas colinérgicos. Contudo, as diferenças entre os protocolos tornam difícil a comparação e a interpretação dos resultados obtidos entre os diferentes grupos. Assim, foi objectivo desta revisão fazer uma síntese das informações disponíveis sobre os métodos de exposição à hiperoxia, de indução e monitorização da resposta, os critérios que determinaram a escolha da espécie animal e da fase do desenvolvimento em que se iniciou a exposição e ainda sobre os efeitos biológicos correspondentes. Concluiu-se que a exposição à hiperoxia, pelas alterações morfo-funcionais que provoca, pode constituir um modelo útil para avaliação dos mecanismos responsáveis pela hiperreactividade brônquica, particularmente quanto ao contributo das alterações qualitativas e quantitativas do músculo liso para esse fenómeno.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (3): 223-235

Palavras-chave: asma; displasia broncopulmonar; oxigénio; agonistas colinérgicos; reactividade; sensibilidade; modelos animais.

ABSTRACT

Exposure of small animals to high oxygen concentrations can induce morphological and functional changes usually found in the airways of patients with bronchopulmonary dysplasia and asthma. This led to the use of animal models based on exposure to high concentrations of oxygen in order to study the relation between these airway changes and the development of hyperresponsiveness. During the last ten years several studies, using *in vivo* and *in vitro* techniques, have shown a close association between cholinergic responsiveness and airway wall remodeling in rats exposed to high levels of oxygen in the inspired air. However, the comparison and interpretation of the results obtained by the various groups is often a difficult task due to the methodological differences found between the protocols. The objective of this paper is to synthesize the information concerning the hyperoxia exposure techniques, the airway challenging agents used and their methods of administration and also the parameters used to measure the responses. It is also included a review of the criteria that determined the choice of particular animal species, the stage of development more often chosen to begin the hyperoxic exposure and also its biological effects on the structure and function of the airways. It is concluded that the hyperoxic rat is a suitable model to evaluate the mechanisms involved in bronchial responsiveness, in particular the contribution of the qualitative and quantitative changes occurring in the airway smooth muscle.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (3): 223-235

Key-words: asthma; bronchopulmonary dysplasia; oxygen; cholinergic agonists; reactivity; sensitivity; animal models.

I. INTRODUÇÃO

A primeira publicação em que se demonstrou que a exposição à hiperoxia determina um aumento da resposta contráctil do músculo liso brônquico *in vitro* e um aumento da resistência das vias aéreas data de 1989¹. As publicações anteriores avaliam exclusivamente os efeitos do oxigénio sobre a circulação pulmonar e o desenvolvimento do parênquima pulmonar.

A ideia de aplicar este modelo à avaliação do papel do músculo liso na hiperreactividade brônquica (HRB) baseou-se na relação estabelecida no humano entre a administração de fracções elevadas de oxigénio no ar inspirado e a displasia broncopulmonar (BPD) na criança². A exposição à hiperoxia é apontada como um dos principais mecanismos patogénicos da BPD, que se caracteriza morfológicamente por alterações da arquitectura das vias aéreas com metaplasia pavimentosa epitelial, aumento do músculo liso, fibrose brônquica e peribrônquica³ e por complicações clínicas tardias que incluem manifestações de HRB semelhantes às de doentes asmáticos⁴. Assim, independentemente dos mecanismos envolvidos, estabeleceu-se uma relação de causalidade entre o designado “*stress oxidativo*” e a presença de hiperreactividade brônquica (HRB).

Por outro lado, os dados obtidos a partir das vias aéreas de doentes asmáticos através de broncoscopia, do estudo da composição do lavado broncoalveolar e de amostras obtidas por biópsia e de peças de autópsia, revelaram alterações da arquitectura das vias aéreas (*remodeling*) que incluem: fibrose subepitelial, hiperplasia dos miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia dos miócitos, edema, infiltrado de células inflamatórias, hiperplasia glandular e hipertrofia epitelial. O conjunto destas alterações contribui para o aumento da espessura da parede das vias aéreas, relativamente a um grupo de controlo, quer nos casos fatais de asma quer nos casos menos graves^{5,6,7}.

A semelhança entre as alterações morfológicas

e funcionais encontradas na BPD e na asma e as induzidas pela hiperoxia em pequenos animais levaram alguns grupos a usar este modelo na avaliação de mecanismos envolvidos na HRB.

É objectivo desta revisão sintetizar os aspectos metodológicos e os resultados até agora obtidos quando a exposição de pequenos animais a níveis elevados de oxigénio foi usada como modelo de hiperreactividade brônquica. A primeira parte aborda os métodos de exposição a hiperoxia e os resultados funcionais obtidos *in vivo* e *in vitro*; a segunda parte contém uma síntese dos efeitos do oxigénio sobre as vias aéreas de pequenos animais e a sua relação com o desenvolvimento de HRB.

II. REVISÃO DA LITERATURA – ORIGEM E ÂMBITO DAS PUBLICAÇÕES

A revisão das publicações entre 1963 e Janeiro de 2002 resultou em 15 artigos (Tabela I), onde os autores usaram animais expostos à hiperoxia com o objectivo de esclarecer mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de hiperreactividade brônquica e a sua relação com as alterações da arquitectura das vias aéreas^{1,2,8-20}.

A maior parte da informação sobre as alterações morfofuncionais induzidas pela hiperoxia resulta dos artigos publicados por grupos norte-americanos entre 1989 e 1995^{1,2,8-14,16,18}. Szarek demonstrou que a exposição de ratos adultos a 85% de oxigénio levava a um aumento da reactividade brônquica medida *in vivo* e *in vitro*^{1,2}. Seguiu-se um conjunto de publicações⁸⁻¹³, com um protocolo muito semelhante, *in vivo*, em ratos jovens, que confirmaram as observações de Szarek^{8,9,13}. Demonstraram também que havia uma relação entre as alterações da arquitectura das pequenas vias aéreas e o nível de sensibilidade a estímulos colinérgicos e que as alterações funcionais se deviam parcialmente a hipertrofia/ou hiperplasia do músculo liso das vias aéreas de pequeno e médio calibre^{11,13}. Finalmente, encontraram um

aumento da actividade mitogénica do lavado broncoalveolar^{12,13}.

Nos anos seguintes, a exposição a hiperoxia foi usada para a identificação de mediadores responsáveis por estas alterações morfológicas e funcionais, que revelaram um aumento da síntese de leucotrienos^{16,17} e de citocinas pelas vias aéreas^{14,20}. Outro estudo demonstrou que a exposição à hiperoxia em fases precoces do desenvolvimento inibe o efeito relaxante do óxido nítrico endógeno sobre o músculo liso das vias aéreas centrais, resultados sugestivos de que alterações dos mecanismos de relaxamento podem ser também responsáveis pela

presença de hiperreactividade brônquica¹⁵. Recentemente um grupo europeu retomou a avaliação das alterações morfofuncionais induzidas pelo oxigénio como modelo animal de estudo dos mecanismos envolvidos no aumento da reactividade das vias aéreas²¹.

III. MÉTODOS DE EXPOSIÇÃO DE PEQUENOS ANIMAIS A HIPEROXIA

Os aspectos mais importantes dos métodos usados pelos diferentes grupos para expor pequenos

TABELA I
Síntese dos protocolos em que a hiperoxia foi usada como modelo de hiperreactividade brônquica

	Hiperoxia (%)	Débito O ₂ (l/min)	Idade (dias)	Monitorização O ₂ (x/dia)	Tempo total de exposição (dias)
Szarek ^{1,2}	O ₂ > 80 O ₂ > 85	2,5 4	adultos	1	7 1 a 7
Hershenson <i>et al</i> ⁹⁻¹¹ Naureckas <i>et al</i> ¹² Solway <i>et al</i> ¹³	O ₂ > 95 CO ₂ < 0.3	25	21	contínua	8
Agani <i>et al</i> ¹⁴ Iben <i>et al</i> ¹⁵	O ₂ > 95	1 1 e 12	7 e 13 a 15	– 4	7 4 a 6
Burghardt <i>et al</i> ¹⁶ Boros <i>et al</i> ¹⁷	O ₂ > 95 → 65 O ₂ > 95 CO ₂ < 0.5	–	21	1	10 a 18
Laudert <i>et al</i> ¹⁸	O ₂ > 100 <i>ou</i> O ₂ > 50 (48 a 72h) → 100	10	2-12 h, 27, 48 e 96	–	7 21
Shenberger <i>et al</i> ¹⁹	O ₂ > 95 CO ₂ < 0.3	–	4	1	14
Johnston <i>et al</i> ²⁰	O ₂ > 85 (7 d) → 100 (48, 72 e 96h)	–	adultos	–	11
Denis <i>et al</i> ²¹	O ₂ = 50 ± 1	3,5	0 h	contínua	15

– : parâmetro não avaliado

animais (ratos) a hiperoxia estão sintetizados na Tabela I. Foram seleccionados os protocolos de avaliação funcional *in vivo* e *in vitro* em que o objectivo foi induzir um aumento da reactividade brônquica e identificar os mecanismos responsáveis.

Em comum, a maioria de estes trabalhos têm: a fase precoce da maturação em que estes animais foram expostos à hiperoxia; apenas dois grupos usaram animais adultos; com duas excepções^{20,21} todos os grupos usaram ratos da estirpe Sprague-Dawley; a percentagem de oxigénio elevada que a maioria usou (80% a 95% de oxigénio). A monitorização do oxigénio foi feita pelo menos uma vez por dia, geralmente após uma fase inicial de medição contínua para verificação da estabilidade ao longo do dia (admitindo uma variação de 5%). Quanto ao *tempo de exposição*, mais 50% das publicações refere períodos de sete dias, que consideram corresponder à exposição crónica.

IV. MÉTODOS DA ESTIMULAÇÃO DO MÚSCULO LISO

Como está representado na Tabela II, nos estudos *in vitro*, a acetilcolina (Ach) foi o agente farmacológico mais usado em concentrações crescentes mínimas entre 10^{-8} e 10^{-7} M e máximas de 10^{-3} ou 10^{-2} M. A estimulação eléctrica a diferentes frequências (EFS) foi usada em três desses trabalhos. O efeito da EFS é semelhante ao da estimulação colinérgica, uma vez que parece actuar através de alterações da actividade da acetilcolinesterase, com a vantagem de não estar dependente da difusão através das diferentes estruturas da amostra de tecido.

Os resultados obtidos (Tabela III) com estes dois estímulos após hiperoxia são semelhantes em relação à tensão isométrica máxima que é superior à dos grupos de controlo, traduzindo um aumento da reactividade ($E_{máx}$). Já em relação à *sensibilidade* (expressa pela dose ou concentração de Ach ou pela frequência eléctrica que provoca 50% da res-

posta máxima – $EC_{50\%}$), a EFS revela alterações da sensibilidade que não são detectadas pela Ach. As razões destas diferenças não foram, no entanto, discutidas pelos autores.

Nos estudos *in vivo* (Tabelas IV e V) observou-se em todos os casos um aumento da sensibilidade à acetilcolina e metacolina, geralmente administradas por via endovenosa, sem variações significativas da reactividade ($E_{máx}$) medida pela resistência total do sistema respiratório.

V. MÉTODOS MEDIÇÃO DA RESPOSTA FUNCIONAL E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os grupos que fizeram estudos *in vitro* mediram a tensão isométrica (Tabela II), no que se afastam da preferência pela tensão isotónica que é muito evidente em protocolos de outra natureza (por exemplo, sobre o desenvolvimento do músculo das vias aéreas). Esta opção poderá corresponder a uma tentativa de “isolar” funcionalmente o músculo das restantes estruturas da mucosa, uma vez que a tensão isométrica traduz apenas a força desenvolvida pelas proteínas contrácteis sem que haja encurtamento dos miócitos. Em contrapartida, não é possível avaliar outras propriedades do músculo liso brônquico que podem ser responsáveis pelo aumento da reactividade – mesmo sem hipertrofia – como a velocidade de encurtamento.

Um aspecto importante nos estudos *in vitro* é a necessidade de usar amostras de anéis de traqueia ou dos brônquios principais, já que não é possível tecnicamente colocar nos suportes do transdutor de tensão brônquios de médio e pequeno calibre. Esta limitação não impediu de se demonstrar um aumento da contractilidade induzida pela hiperoxia (Tabela III).

Quanto à expressão dos resultados (Tabelas III e V), existe uma grande heterogeneidade (tal como em todos os estudos *in vitro* do músculo liso das vias aéreas) que se deve fundamentalmente à cor-

TABELA II
Protocolos de hiperoxia *in vitro* – Métodos

	Idade exposição O ₂ (dias)	Idade da avaliação (dias)	Estímulos músculo liso	Parâmetros Funcionais	Morfometria e outros métodos
Szarek ¹	adultos (250-330g)	–	5-HT Betanecol	CDR E _{max} EC _{50%}	Microscopia óptica
Hershenson <i>et al</i> ¹⁰	21	29	EFS Ach 10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M	CDR E _{max} / Am (g/mm ²) EC _{50%} (regressão linear)	Morfometria digital: perímetro membrana basal; ℓm; Am. Cálculo da massa média músculo
Szarek ²	adultos (270-330g)	+1, +3, +5 e +7	EFS Ach 10 ⁻⁸ -10 ⁻² M	CDR E _{max} (mN/mm) E _{max} /Am (mN/mm ²) EC _{50%}	Morfometria digital: Am normalizada para ℓm
Agani <i>et al</i> ¹⁴	7	21	EFS Ach 10 ⁻⁷ -10 ⁻³ M	E _{max} (g)	Morfometria digital: perímetro posterior, Am; volume de músculo = Am x 3 mm Western blot – conteúdo em miosina Northern blot
Denis <i>et al</i> ²¹	0 e adultos	15 –	Carbacol 10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M	CDR E _{max} (mg) E _{max} /Am (g/mm ²) EC _{50%} (regressão logística)	Microscopia óptica/vídeo: ℓm e Am; ℓe e Ae

+ : dias após passagem para o ar ambiente; M: molar; mN: 10⁻³ Newton; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; Ach: acetilcolina; EFS: estimulação eléctrica a diferentes frequências; CDR: curva dose-resposta; E_{max}: Tensão isométrica máxima; EC_{50%}: concentração provocadora de 50% da resposta máxima; ℓm: comprimento de músculo; Am: área de músculo; ℓe: comprimento de epitélio; Ae: área epitelial.

recção da E_{max} e da EC_{50%} para a “quantidade de músculo” (Tabela II). A forma como a zona correspondente ao músculo pode ser medida varia de grupo para grupo tornando muito difícil a comparação dos resultados.

Contudo, quando os resultados são corrigidos para parâmetros morfométricos é possível aprofundar a relação reactividade/músculo uma vez que, teoricamente, passa a ser possível distinguir o

componente do aumento de força que se deve simplesmente a hiperplasia ou hipertrofia do que se deve a alterações puramente funcionais da contratilidade.

Nos protocolos *in vivo* a resistência total do sistema respiratório por pletismografia foi o método usado para avaliar a resposta das vias aéreas. O parâmetro escolhido pela maioria dos grupos para a expressão dos resultados foi a resistência do sis-

TABELA III
Protocolos de hiperoxia *in vitro* – Resultados

	Segmento das vias aéreas	Tensão isométrica máxima <i>reactividade</i>	EC ₅₀ <i>sensibilidade</i>	Área músculo	Epitélio
Szarek ¹	brônquio primário	↑ 5-HT betanecol (não variou) (mN/mm)	↓ ↓	-	-
Hershenson <i>et al</i> ¹⁰	traqueia	↑ (g/mm ²)	não variou	↓	↓
Szarek ²	brônquio primário	↑ (mN/mm)	não variou	↑	-
Agani <i>et al</i> ¹⁴ 1997	traqueia	↑ (g)	não variou	↓	↓
Denis <i>et al</i> ²¹	traqueia*	↑ (mg)	não variou	↑	não variou

EC₅₀/ED₅₀: concentração/dose provocadora de x% de aumento do valor basal; 5-HT: 5-hidroxitriptamina

↑: aumento; ↓: diminuição; -: parâmetro não avaliado

* Não se observaram variações nos adultos

tema respiratório considerando significativo um aumento de 200 por cento em relação ao valor basal, para efeitos de cálculo da concentração provocadora (Tabela IV). Nestes casos a maior uniformidade nos métodos e expressão de resultados, em que a constante foi a determinação da sensibilidade através da concentração provocadora de um aumento significativo da resistência, facilita a comparação de resultados que é sobretudo prejudicada pelas diferentes vias de administração do agente constritor (aerossol ou endovenosa).

VI. RELAÇÃO ENTRE HIPEROXIA, REACTIVIDADE, SENSIBILIDADE A AGENTES FARMACOLÓGICOS E A ESTRUTURA DAS VIAS AÉREAS

Os grupos representados por Hershenson^{8,9}, Naureckas¹¹ e Solway¹³ apresentaram uma série de publicações em que exploraram a correlação entre

as alterações do músculo liso e epitélio e o desenvolvimento de hiperreatividade brônquica induzida pelo oxigénio. Os trabalhos foram feitos na sua maioria *in vivo*, tendo medido a resistência das vias aéreas por pletismografia (Tabela IV). Observaram um aumento da *sensibilidade* a estímulos colinérgicos (metacolina e acetilcolina) e estimulação eléctrica (EFS) após 7 dias de exposição, sem variações significativas da *reactividade* e que estes resultados se correlacionavam quer com a espessura do epitélio quer do músculo liso das vias aéreas de pequeno e médio calibre (Tabela V). Realizaram apenas um único estudo *in vitro* usando anéis de traqueia¹⁰ onde obtiveram resultados funcionais semelhantes, mas acompanhados de uma diminuição da área de músculo. Este mesmo padrão – aumento da reactividade e redução da área de músculo na traqueia – foi encontrado num grupo de animais recém-nascidos exposto durante 14 dias à hiperoxia¹⁴. No entanto, os resultados obtidos recentemente²¹ em que a exposição de ratos da

TABELA IV
Protocolos de hiperoxia *in vitro* – Métodos

	Idade exposição O ₂ (dias)	Idade da avaliação (dias)	Estímulos músculo liso	Avaliação Funcional	Parâmetros Funcionais
Szarek ¹	adultos (250-330g)	–	5-HT (e.v.)	Pletismografia	G _i C _{dyn} log ED ₃₀ G _i
Hershenson <i>et al</i> ⁸	21	29	Mch (e.v.)	Pletismografia	CDR R _L máx EC ₂₀₀
Hershenson, <i>et al</i> ⁹	21	29	Ach aerossol	Pletismografia	CDR R _L máx EC ₂₀₀
Burghardt <i>et al</i> ¹⁶	4	14	Mch (e.v.)	Pletismografia	CDR R _L EC ₂₀₀
Iben <i>et al</i> ¹⁵	6-7 e 13-15	4 a 6	EFS vago	Pletismografia	CDR R _L e E _L

e.v.: endovenosa; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; Ach: acetilcolina; Mch: metacolina EFS: estimulação eléctrica a diferentes frequências; CDR: curva dose-resposta; G_i: Condutância; C_{dyn}: compliance dinâmica; R_L: resistência total do sistema respiratório; E_L: elastância total do sistema respiratório; EC_{x%}/ED_{x%}: concentração/dose provocadora de x% de aumento do valor basal; v.a.: vias aéreas; At: área total da via aérea; Am: área muscular; Ae - área epitelial

TABELA V
Protocolos de hiperoxia *in vivo* – Resultados

	Resistência máxima <i>reactividade</i>	EC/ED _{x%} <i>sensibilidade</i>	Área músculo	Epitélio
Hershenson <i>et al</i> ⁸	não variou	↑ 5-HT	↑	↑
Hershenson <i>et al</i> ⁹	não variou	↑	↑ ? (v.a. médio calibre)	↑ ↑
Hershenson <i>et al</i> ¹¹	–	↑	↑	↑
Iben <i>et al</i> ¹⁵	↑	↑	não variou	–
Burghardt <i>et al</i> ¹⁶	–	↑	↑	não variou

↑ : aumento; ↓ : diminuição; – : parâmetro não avaliado; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; v.a.: vias aéreas

estirpe Wistar foi feita logo após o nascimento, com níveis de oxigénio inferiores aos usados em todos os outros protocolos (50%), demonstrou que existia um aumento da massa de músculo na traqueia e aumento da tensão isométrica que não se observava em animais adultos sujeitos às mesmas condições. Estes resultados, discordantes nas alterações morfológicas e funcionais em relação aos referidos anteriormente são ainda difíceis de interpretar já que, nos animais jovens, a exposição se fez logo após o nascimento; os níveis de oxigénio usados quer nos recém-nascidos quer nos ratos adultos foi inferior à de todos os outros grupos atrás referidos.

VII. EM SÍNTESE, ESTES DADOS DEMONSTRAM QUE A HIPEROXIA:

- induz alterações da contractilidade do músculo liso que se traduzem por um aumento da sensibilidade *in vivo* e por um aumento da reactividade e redução do relaxamento *in vitro*;
- provoca alterações da arquitectura das vias aéreas de médio e pequeno calibre que se traduzem, na maior parte dos casos, por aumento da espessura do epitélio e do músculo liso;
- na traqueia, observa-se um aumento da reactividade *in vitro*, mas acompanhado de repercussões discordantes sobre a arquitectura das vias aéreas, o que se pode em parte atribuir aos níveis diferentes de oxigénio administrados.

VIII. REPERCUSSÕES PULMONARES DA EXPOSIÇÃO À HIPEROXIA

1. Sobrevivência em hiperoxia

a) *Diferenças entre espécies*

A capacidade de sobrevivência em condições de hiperoxia varia de espécie para espécie e, dentro

da mesma espécie, consoante a fase da maturação em que se inicia a exposição²². Frank *et al* demonstraram que entre as diferentes espécies de animais (como o rato, o cobaio e o hamster), o rato Sprague-Dawley é o que tem maior capacidade de sobrevivência tanto no período neonatal como em adulto. Todos os adultos têm tempos de sobrevivência em hiperoxia inferiores aos animais que foram expostos logo após o nascimento^{18,22}. Uma explicação destas diferenças foi avançada pelos mesmos autores que avaliaram a resposta à agressão directa do pulmão provocada pelo oxigénio através da libertação de radicais livres de oxigénio, fazendo o doseamento de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatião peroxidase (GP). O doseamento destas enzimas revelou um aumento da sua actividade antioxidante (desencadeada pela exposição a >95% de O₂) apenas em ratos e no coelho jovens o que pode em parte explicar a maior tolerância destas espécies nas fases precoces do seu desenvolvimento. A ausência de alteração destas enzimas em adultos das mesmas espécies, associada a maior taxa de mortalidade, vem corroborar esta hipótese. Quanto ao cobaio, que é de todos os animais estudados o mais sensível, não se observaram alterações da actividade enzimática (SOD, CAT ou GP).

Estes resultados poderão ter sido um dos fundamentos da escolha preferencial do rato recém-nascido e/ou jovem para os protocolos em que se avaliaram as relações hiperoxia/hiperreactividade.

b) *Diferenças entre animais jovens e adultos*

A aplicação de níveis elevados de oxigénio a animais em diferentes fases do desenvolvimento pôs em evidência a maior susceptibilidade dos adultos em relação aos animais mais jovens¹⁸. Demonstrou-se que a causa de morte é o edema pulmonar, manifestando-se por edema e infiltração por células mononucleares e macrófagos dos septos interalveolares, das regiões peribrônquica e perivascular e

edema alveolar frequentemente acompanhado por derrames pleurais. A gravidade destas lesões tem uma relação directa com a idade em que se inicia a exposição ao oxigénio¹⁸.

No rato recém-nascido, a quantidade de água no pulmão (indicador da presença de edema pulmonar), permanece idêntica ao grupo de controlo durante oito dias em hiperoxia mantendo-se aumentada a partir desta fase. Os animais com 27 dias têm um ligeiro aumento nos três primeiros dias, voltando ao valor de controle a partir dos 5-14 dias enquanto os de 44 dias têm um aumento da água no pulmão que atinge o seu máximo no 3.º dia, voltando ao normal entre os 14 e os 22 dias. Ultrapassada a fase de edema pulmonar, todos os animais desenvolvem hipertensão pulmonar e *cor pulmonale* com insuficiência respiratória.

A percentagem de sobrevivência em ratos de 27 e 44 dias, após três a cinco dias de exposição contínua a 95%-100% de O₂, é de cerca de 80%^{18,23} enquanto apenas 20% dos animais de 48 e 96 dias estão vivos ao fim de 14 a 22 dias^{16,18}. Entre os mais jovens, os recém-nascidos têm maior tolerância que todos os outros nas primeiras duas semanas, mas maior susceptibilidade a exposições mais prolongadas.

2. Tolerância à hiperoxia

mal¹¹. A observação de características iguais após a exposição durante quinze dias a 50% de oxigénio logo após o nascimento aponta para a hipótese de que uma associação entre uma fase precoce do desenvolvimento e níveis moderados de oxigénio poder induzir hipertrofia ou hiperplasia do músculo, sendo as alterações epiteliais transitórias neste ambiente.

3. Susceptibilidade entre estirpes diferentes de ratos e repercussões pulmonares da hiperoxia

Como foi referido acima, o animal mais frequentemente usado é o da estirpe Sprague-Dawley em que as alterações morfológicas responsáveis pela intolerância ao oxigénio e taxas de mortalidade em fases diferentes da maturação estão disponíveis na literatura¹⁸. A pertinência desta informação relaciona-se com a escolha da idade em que devem ser seleccionados e para o planeamento da duração da exposição.

Os dados existentes sobre outras estirpes de ratos são escassos e resultam de uma publicação em que se compararam 3 estirpes de ratos adultos que sobreviveram, em média, 3,6, 4,8 e 6 dias²⁰ o que é sugestivo de que a tolerância também varia dentro da mesma espécie. Em relação aos ratos

portam a hipótese de, uma vez desencadeada, a lesão induzida pela hiperoxia envolver mecanismos idênticos.

4. Tempo de exposição necessário para indução de hiperreactividade

Os tempos de exposição a hiperoxia variam entre 7 e 21 dias. Os resultados de diferentes grupos demonstram que ao fim de 7 dias já existe aumento da reactividade *in vitro* e *in vivo* a agonistas colinérgicos, acompanhada por alterações do epitélio e músculo das vias aéreas de médio e pequeno calibre.

Os resultados de uma publicação em que se fizeram medições diárias da reactividade brônquica e se quantificaram as alterações morfológicas da mucosa brônquica demonstraram que as alterações funcionais – aumento da tensão isométrica máxima *in vitro* – surgem mais precocemente (após 3 dias) que as alterações da espessura de músculo, só visíveis a partir do 5.º dia de exposição a 85% de O₂.

Para além do interesse metodológico, estes dados fundamentam as hipóteses que a libertação de mediadores, como prostaglandinas e taquicinas libertados pelo epitélio^{2,10,14} após a exposição a hiperoxia, podem determinar aumentos da contractilidade responsáveis pelo aumento da reactividade e que estes já estão presentes antes que as alterações morfológicas do músculo liso sejam aparentes.

5. Recuperação da estrutura das vias aéreas e da reactividade brônquica após exposição à hiperoxia

Esta informação resulta de um único estudo onde se fizeram medições da reactividade *in vivo* e dos índices da espessura do epitélio e músculo 3, 6, 8, 13, 16 e 48 dias após um grupo de ratos Sprague-Dawley ter sido retirado de uma câmara de exposição à hiperoxia onde tinha permanecido 8

dias¹¹. Os autores, que referem terem feito a avaliação morfométrica nas vias aéreas de pequeno e de médio calibre, concluem que ao fim de 13 dias há uma recuperação da arquitectura das vias aéreas, não se distinguindo o grupo experimental de um grupo de controle. Não encontraram também diferenças significativas na sensibilidade colinérgica e no valor máximo da resistência do sistema respiratório a partir 16.º dia de recuperação em ar ambiente. Encontraram, no entanto, correlações significativas entre o retorno da reactividade aos valores de controle e a espessura muscular e epitelial das pequenas vias aéreas.

Os dados morfométricos obtidos nas vias aéreas de menor calibre revelaram que a recuperação era progressiva, sendo mais precoce no epitélio (logo após o retorno ao ar ambiente) que no músculo (evidente a partir do 6.º dia). Não foram medidos quaisquer parâmetros funcionais entre o 3.º e o 13.º dias de recuperação.

Estes resultados demonstram que os efeitos do oxigénio são reversíveis ao fim de duas semanas e suportam a hipótese de haver uma correlação entre a arquitectura das pequenas vias aéreas, incluindo epitélio e músculo, e a reactividade medida *in vivo*, usando uma metodologia que não foi ainda aplicada *in vitro*. Contudo, não fica claro se estas observações se aplicam também às vias aéreas de maior calibre.

6. Considerações finais

Se bem que a maioria destes trabalhos tenha demonstrado que a exposição a níveis elevados de oxigénio induz aumento da resposta das vias aéreas a estímulos farmacológicos, *in vitro* e *in vivo*, acompanhada por um aumento da espessura do epitélio e músculo, nenhum foi capaz de obter resultados conclusivos sobre a forma como o músculo liso contribui para este fenómeno.

Esta dificuldade deve-se em parte ao efeito generalizado do oxigénio sobre todas as estruturas

pulmonares – vasos, parênquima e vias aéreas – e, consequentemente, os diferentes componentes da mecânica pulmonar. Não é assim de esperar que a correlação de parâmetros como a resistência ou a *compliance* em animais vivos com o aumento de músculo liso permita mais do que constatar que este é um dos diferentes mecanismos que contribuem para a reactividade brônquica.

Teoricamente, a medição da resposta contráctil *in vitro* de amostras das vias aéreas²⁵ permite contornar o efeito de outras alterações mecânicas do sistema respiratório e, por isso, uma maior aproximação ao músculo liso brônquico. Não deixa, contudo, de ser afectada pela presença de edema da mucosa que reduz o componente elástico em série contra o qual os miócitos se contraem, podendo observar-se em consequência um aumento da força e/ou da velocidade de encurtamento, sem que estejam presentes alterações morfológicas.

Não menos importante que os aspectos metodológicos é a informação biológica que se pode tirar a partir de variações de tensão sem encurtamento (isométrica): medir tensões mais elevadas significa que a alteração pode ser atribuída a um aumento da resposta dos receptores, dos mecanismos de transdução do sinal ou dos mecanismos intracelulares que levam ao estabelecimento de ligações entre as proteínas contrácteis. Portanto, o estudo das alterações isoladas da força do músculo liso das vias aéreas não permite tirar conclusões quanto ao papel da hipertrofia muscular provocada pela hiperoxia nos mecanismos de aumento da reactividade brônquica. Só com estudos complementares, como a morfometria e técnicas imunológicas e imunohistoquímicas, é possível separar o contributo do músculo dos outros elementos da parede das vias aéreas.

Há, no entanto, alguns aspectos da exposição à hiperoxia que ainda não foram completamente explorados e que poderão contribuir para o desenvolvimento de um modelo animal de hiperreactividade brônquica mais satisfatório, tais como:

a) a exposição prolongada a hiperoxia (superior aos 7 a 15 dias habitualmente usados) e a avaliação da reversibilidade das alterações funcionais e morfológicas,

- b) a resposta a fármacos relaxantes do músculo liso, uma vez que a incapacidade de voltar aos valores de repouso após a contração não pode ser excluída como causa de obstrução excessiva.
- c) a exposição a níveis de oxigénio inferiores a 80%, susceptíveis de permitir maiores tempos de sobrevivência em hiperoxia, tornando mais viável a aproximação a um modelo de inflamação crónica das vias aéreas.

Correspondência:

Departamento de Fisiopatologia
Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa
Campo dos Mártires da Pátria, 130
1169-05 Lisboa Codex

BIBLIOGRAFIA

1. SZAREK JL. In vivo hyperoxic exposure increases airway responsiveness in rats: demonstration in vivo and in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 942-947.
2. SZAREK JL. Time course of airway hyperresponsiveness and remodeling induced by hyperoxia in rats. *Am J Physiol* 1995; 269: L227-L233.
3. MARGRAF LR, TOMASHEFSKI JF, MARGARET CB, DAHMS BB. Morphometric analysis of lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 391-400.
4. NORTHWAY WH, MOSS RB, CARLISLE KB, PARKER BR, POPP RL, PITLICK PT, EICHLER I, LAMM RL, BROWN BW. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1990; 323: 1793-1799.
5. SEOW CY, SCHELLENBERG RR, PARÉ PD. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S179-S186.
6. BUSSE W, ELIAS J, SHEPPARD D, BANKS-SCHLEGEL S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1035-1042.

7. ELIAS JA, ZHU Z, CHUPP G, HOMER RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999; 104: 985-999.
8. HERSHENSON MB, AGHILI S, PUNJABI N, HERNANDEZ C, RAY DW, GARLAND A, GLAGOV S, SOLWAY J. Hyperoxia-induced airway hyperresponsiveness and remodeling in immature rats. *Am J Physiol* 1992; 262, 3: L263-L269.
9. HERSHENSON MB, GARLAND A, KELLEHER MD, ZIMMERMANN A, HERNANDEZ C, SOLWAY J. Hyperoxia-induced airway remodeling in immature rats. Correlation with airway responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1294-300.
10. HERSHENSON MB, WYLAM ME, PUNJABI N, UMANS JG, SCHUMACKER PT, MITCHELL RW, SOLWAY J. Exposure of immature rats to hyperoxia increases tracheal smooth muscle stress generation in vitro. *J Appl Physiol* 1994; 76: 743-749.
11. HERSHENSON MB, ABE MK, KELLEHER MD, NAURECKAS ET, GARLAND A, ZIMMERMANN A, RUBINSTEIN VJ, SOLWAY. Recovery of airway structure and function after hyperoxic exposure in immature rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1663-1669.
12. NAURECKAS ET, HERSHENSON MB, ABE MK, KELLEHER MD, FLORIO C, HEISLER SI, ABSHER M, EVANS JN, SAMSEL RW, SOLWAY J. Bronchoalveolar lavage fluid from immature rats with hyperoxia-induced airway remodeling is mitogenic for airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 268-274.
13. SOLWAY J, HERSHENSON MB. Structural and functional abnormalities of the airways of hyperoxia-exposed immature rats. *Chest* 1995; 107: 89S-93S.
14. AGANI FH, KUO NT, CHANG CH, DRESHAJ IA, FARVER CF, KRAUSE JE, ERNSBERGER P, HAXHIU MA, MARTIN RJ. Effect of hyperoxia on substance P expression and airway reactivity in the developing lung. *Am J Physiol* 1997; 273: L40-L45.¹
15. IBEN SC, DRESHAJ IA, FARVER CF, HAXHIU MA, MARTIN RJ. Role of endogenous nitric oxide in hyperoxia-induced airway hyperreactivity in maturing rats. *J Appl Physiol* 2000; 89: 1205-1212.
16. BURGHARDT JS, BOROS V, BIGGS DF, OLSON DM. Lipid mediators in oxygen induced airway remodelling and hyperresponsiveness in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 837-842.
17. BOROS V, BURGHARDT JS, MORGAN CJ, OLSON DM. Leukotrienes are indicated as mediators of alveolarization in newborn rats. *Am J Physiol* 1997; 272: L433-L441.
18. LAUDERT S, THIBEAULT DW, REZAIKHALIGH MM, MABRY SM, HUNTRAKOON M. Comparative age-related acute and chronic pulmonary oxygen tolerance in rats. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2709-2719.
19. SHENBERGER JS, SHEW RL, JOHNSON DE. Hyperoxia-induced airway remodelling and pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in the weanling rat. *Pediatr Res* 1997; 42: 539-544.¹
20. JOHNSTON CJ, STRIPP BR, PIEDBEOUF B, WRIGHT TW, MANGO GW, REED CK, FINKELSTEIN JN. Inflammatory and epithelial responses in mouse strains that differ in sensitivity to hyperoxic injury. *Exp Lung Res* 1998; 24, 2: 189-202.
21. DENIS D, FAYON MJ, BERGER P, MOLIMARD M, DE LARA MT, ROUX E, MARTHAN R. Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *Pediatr Res* 2001; 50: 515-519.
22. FRANK, L, BUCKER J, ROBERT R. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 1978; 45: 699-704.
23. CRAPO JD, BARRY BE, FOSCUE HA, SHELBORNE JD. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptative doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 123-143.
24. CHUNG KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway wall mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000; 15: 961-968.
25. MEISS A. Mechanics of smooth muscle in: A Functional View of Smooth Muscle. Lloyd Barr, George Christ (Eds) Elsevier Science 2000; 2-49.