

BÁRBARA RESTEL BERTÉ

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE MDA EM TECIDO PULMONAR E PLASMA DE
RATOS SUBMETIDOS A HIPERÓXIA INDUZIDA EM DIFERENTES NÍVEIS DE
OXIGÊNIO**

CAMPO GRANDE

2014

BÁRBARA RESTEL BERTÉ

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE MDA EM TECIDO PULMONAR E PLASMA DE
RATOS SUBMETIDOS A HIPERÓXIA INDUZIDA EM DIFERENTES NÍVEIS DE
OXIGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Áreas de Concentração: Tecnologia e Saúde

Linha de Pesquisa: Modelos Animais de Doença

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schetttert Silva

CAMPO GRANDE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA RESTEL BERTÉ

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE MDA EM TECIDO PULMONAR E PLASMA DE
RATOS SUBMETIDOS A HIPERÓXIA INDUZIDA EM DIFERENTES NÍVEIS DE
OXIGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iandara Schettert Silva
Instituição UFMS.

Profa. Dra. Lenir Cardoso Porfírio
Instituição UFES.

Profa. Dr. Ricardo Dutra Aydos
Instituição UFMS

Dedicatórias

Aos meus pais, **Vilmar José Berté** e **Tamy Ingrid Restel**, pela oportunidade de formação, pelo exemplo, amor, incentivo e sacrifícios a mim dedicados.

Ao meu avô **Milton Restel**, pelo amor e inteligência sempre disposto a ajudar.

A **Lúcia Terezinha Restel Silva**, minha tia e mãe de alma, que colaborou com seu amor e fornecimento de alguns materiais para o experimento.

Ao grande **amor** da minha vida, minha avó **MARIA ELIZABETH**

(*in memorian*)...um amor pra toda a eternidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus **professores da graduação** que sem seus vastos conhecimentos e amor ao magistério não teria chegado até aqui. A todos o meu muito obrigado.

A minha Orientadora Professora Doutora **Iandara Schettert Silva**, por sua inesgotável paciência, por seus conselhos e por ter acreditado em mim, na importância deste trabalho, e estimulado a realizá-lo e acompanhado durante toda a trajetória, meu eterno agradecimento.

A **Vera Nascimento Silva**, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela sua paciência e disposição, meus sinceros agradecimentos.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação** pelos conhecimentos, técnicas e postura ética com que me ensinaram.

Ao Professor Doutor **Carlos Alberto do Nascimento Ramos** por ter realizado as análises estatísticas deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A **Elaine Silva de Pádua Melo** e **Patrícia Lira Bezerra** pela colaboração para a execução da parte experimental deste trabalho.

Quero do fundo do meu coração e com o mais profundo respeito agradecer àqueles que sem eles, este trabalho não teria sentido, ***Rattus norvegicus***, linhagem **WISTAR** e o meu sincero reconhecimento da sua importância para a Ciência.

“Na intensidade, desaparecem passado e futuro. Porque a vida se reconcilia com o presente. É absorvida por ele. Por isso, quando a vida é intensa o tempo passa, e você não percebe. Pelo menos para você, é centelha de eternidade. Presente que não vira passado”.

Clóvis de Barros Filho.

RESUMO

BERTÉ BR. Avaliação de níveis de MDA em tecido pulmonar e plasma de ratos submetidos a hiperóxia induzida em diferentes níveis de oxigênio. Campo Grande; 2013. [Dissertação - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Com o objetivo de estudar o efeito de diferentes concentrações de O₂ em fluxos variáveis de 24 e 60% no pulmão de ratos da linhagem Wistar, foram determinadas a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma e no pulmão dos ratos, pela reação de ácido tiobarbitúrico (TBAR). Assim, foram utilizados 18 ratos machos com peso corporal médio de 330g. A exposição dos animais a hiperóxia foi realizada em caixa de polipropileno transparente, desenvolvida para o estudo, com as dimensões de 30x40x15cm, com fechamento hermético. Os resultados para os níveis de MDA dosados no plasma encontraram-se elevados a 60% e 24% com diferença significativa ($p<0,01$) a 24%, quando comparado entre grupos. Conclui-se que quanto maior a concentração de oxigênio a que os animais foram expostos, maior a concentração de MDA no tecido pulmonar.

Palavras-chave: Hiperóxia, malondialdeído, estresse oxidativo.

ABSTRACT

BERTÉ BR. Evaluation of MDA levels in lung tissue and in the plasma of rats subjected to hyperoxia induced at different oxygen levels. The Central Animal Facility of UFMS. Campo Grande; 2013. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

With the objective of studying different O₂ concentrations in streams variables of 24 and 60% in the lung of rats of the Wistar strain, were certain the MDA concentration in the plasma and in the lungs of rats, based on the reaction of malondialdehyde (MDA) with the thiobarbituric acid (TBAR). For quantification of the levels of MDA were used 18 male rats with average body weight of 330g. The exposure of animals to hyperoxia was performed in polypropylene housing transparent, developed for the study, with the dimensions of 30x40x15cm, with hermetic sealing. The results for the levels of MDA measured in plasma was found to be high in groups hyperoxia 60% and 24%, but only the hyperoxia group 24% showed a significant difference ($p < 0.01$) when compared with those in normoxia group 21%. It is concluded that the higher the concentration of oxygen to which the animals were exposed, the greater the concentration of MDA in lung tissue.

Keywords: Hyperoxia. Malondialdehyde, oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Lesão celular e o papel do O ₂ . Com a redução do suprimento às células de O ₂ , produz uma injúria isquêmica, enquanto outros estímulos induzem a lesão celular por meio de espécies ativas tóxicas de O ₂ . Fonte: COTRAN, KUMAR et al., (2000).....	17
FIGURA 2. Concentração de malondialdeído (MDA) no plasma de ratos expostos a diferentes condições de oxigênio, grupo normóxia 21%; grupo hiperóxia 24% (3 horas); grupo hiperóxia 60% (3 horas).....	30
FIGURA 3. Concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão de ratos expostos a diferentes condições de oxigênio, grupo normóxia 21%; grupo hiperóxia 24% (3 horas); grupo hiperóxia 60% (3 horas).....	31
FIGURA 4. Pesagem dos animais para formação dos grupos experimentais.....	32
FIGURA 5. Grupo de animais submetidos a hiperóxia em caixa de polipropileno. ...	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Ativador de proteína 1
AECOPD	Vias aéreas de pacientes com exacerbação aguda de DPOC
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evalution II- é um sistema de classificação de prognóstico
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
DPOC	Doença Pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
IRpA	Insuficiência respiratória aguda
MAPKs	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
mtALDH ou ALDH2	Aldeído desidrogenase mitocondrial
NF-KB	Fator nuclear kappa B
RL	Radicais livres
RLO	Radicais livres de oxigênio
ROS	Hiperóxia
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
VM	Ventilação mecânica
VMI	Ventilação mecânica invasiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Oxigenioterapia.....	14
2.2 Lesão celular e o papel do O₂.....	15
2.3 Estresse Oxidativo.....	18
2.4 Defesa Antioxidante	21
2.5 Peroxidação lipídica, MDA, TBAR.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Animais experimentais.....	27
4.2 Exposição ao oxigênio.....	27
4.3 Procedimentos de coleta de amostra.....	27
4.4 Determinação de malondialdeído (MDA).....	28
4.5 Eutanásia e Necropsia.....	28
4.6 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES.....	36
8 REFERÊNCIAS	35
ANEXO 1	42

INTRODUÇÃO

Manifestações clínicas como hipoxemia seguida de cianose é uma das causas de morte de crianças no mundo, ainda nos primeiros 28 dias de vida. Estima-se que mais de 96% de todas essas mortes ocorrem em países em desenvolvimento (REIS et al., 2013).

A administração de altas concentrações de oxigênio (hiperóxia) é um dos pilares do tratamento de suporte para pacientes que sofrem de insuficiência respiratória grave LEE, CHOI, (2003) e angústia respiratória (GORE et al., 2010).

A ventilação mecânica (VM) é utilizada para tratar pacientes com incapacidade de manter adequada ventilação alveolar, além de aperfeiçoar as trocas gasosas e evitar a fadiga de músculos respiratórios (POWERS et al., 2002).

A ventilação mecânica invasiva (VMI) consiste em um método de suporte de pressão positiva nas vias aéreas através de tubo endotraqueal para o tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda (IRpA) ou crônica agudizada. A manutenção das trocas gasosas através da VMI traz consequências ao organismo e seus sistemas. Acredita-se que, tanto a pressão positiva mais elevada, quando frações inspiradas de oxigênio acima de 21% causam estresse oxidativo em níveis tão altos que os métodos antioxidantes são pouco eficazes (MAZULLO FILHO et al., 2012)

O oxigênio é largamente prescrito por profissionais da UTI e quando administrado corretamente pode salvar vidas, no entanto é ofertado sem avaliação cuidadosa de seus potenciais benefícios ou efeitos colaterais. Como os de qualquer outra droga, existem claras indicações para tratamento com oxigênio e métodos apropriados de administração. Uma dose inapropriada e a falha da monitorização desse tipo de tratamento podem gerar graves consequências. A monitorização cuidadosa para detectar e corrigir os efeitos adversos de forma rápida é essencial (VALENÇA et al., 2007).

A ventilação mecânica constitui um dos pilares terapêuticos da unidade de terapia intensiva, entretanto devem-se avaliar os efeitos deletérios por ela ocasionados (MAZULLO FILHO et al., 2012).

Em relação ao ambiente de cuidados intensivos e ao procedimento de suporte ventilatório artificial, em consenso, se descreve que o uso de concentrações de frações inspiradas de oxigênio acima de 60% pode produzir efeitos secundários, como alteração da formação de surfactante, efeitos citotóxicos e traqueobronquites, a síndrome da angústia respiratória aguda e displasia broncopulmonar, dentre outras (PEREIRA et al., 2008).

A lesão pulmonar aguda é uma consequência da oxigenoterapia (MANTELL, LEE, 2000), mesmo que a administração de altas concentrações de oxigênio (hiperóxia) seja um dos pilares do tratamento de suporte para pacientes que sofrem de insuficiência respiratória grave (LEE e CHOI, 2003).

Estudos em ratos Wistar demonstraram ação não desejável do oxigênio ofertado em elevada concentração através de parâmetros como histologia, estereologia, lavado broncoalveolar e dano oxidativo. Apesar do influxo de células inflamatórias e do dano oxidativo ser observado em estudo experimental agudo, a possível implicação de distúrbio na histoarquitetura pulmonar induzido por concentrações elevadas de oxigênio em humanos não deveria ser descartada (VALENÇA et al., 2007).

Diante do exposto no presente estudo analisaram-se os efeitos agudos da oxigenoterapia a 24% e a 60% comparando-se com o grupo controle a 21%, pelos níveis de malondialdeído (MDA), através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido pulmonar e no plasma de ratos Wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oxigenioterapia

O estudo dos ambientes que favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio pela hiperóxia e seus efeitos deletérios motivam o esclarecimento e a difusão de informações, uma vez que no ambiente hospitalar, frequentemente são observadas situações clínicas de pacientes que apresentam estados clínicos de hipóxia e hiperóxia (PEREIRA et al., 2008).

A inalação de oxigênio medicinal, comumente empregado para reverter os casos de hipóxia, doenças respiratórias e cardíacas graves, tem sido relacionada com a retinopatia da prematuridade, doença pulmonar crônica, displasia broncopulmonar, atelectasia por reabsorção, traqueobronquite, depressão da atividade mucociliar, náuseas, anorexia, cefaleia, dano epitelial pulmonar, destruição da barreira hematoaérea e edema pulmonar (REIS et al., 2013).

O tempo é um fator importante e crucial para o processo de injúria induzida pela hiperóxia. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar induzida por oxigênio são complexos, mas sugere-se, mesmo em uma fase aguda, possível efeito deletério para o pulmão (VALENÇA et al., 2007).

Em relação às doenças causadas pela toxicidade do oxigênio, quando administrado de forma inadequada, ocorre retinopatia, DPOC, edema pulmonar, displasia broncopulmonar, atelectasia, traqueobronquite, dano epitelial pulmonar, atividade mucociliar reduzida entre outros sinais relacionados a náuseas, anorexia, cefaleia bem como a destruição da barreira hematoaérea (REISSMANN et al., 2005).

As injúrias provocadas por estresse oxidativo apresentam efeitos cumulativos e estão relacionadas a uma série de doenças, como o câncer, a aterosclerose e o diabetes (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Estudos recentes apontam que o dano epitelial pulmonar induzido pela exposição às concentrações elevadas de oxigênio, especificamente tem sido associado ao estresse oxidativo (SILVA, 2013)

PEREIRA et al (2008), ao avaliarem os efeitos da concentração de oxigênio a 100% em tempo de exposição de 72 horas no tecido pulmonar de ratos Wistar observaram alterações histológicas compatíveis com início do processo inflamatório no tecido pulmonar e aumento da atividade celular desse tecido, indicadas pelo aumento significativo da espessura dos septos alveolares por célula para os animais expostos.

Para KOCK et al (2014) a avaliação de 33 pacientes, com média de idade de 71 ± 12 anos sendo 54,5% homens em uso de oxigênio, a análise dos dados das gasometrias mostrou que pouco mais da metade dos indivíduos analisados se encontravam dentro dos valores desejados, ou seja, entre 60 e 100 mmHg, e, quase a metade restante estava recebendo dose excessiva de oxigênio. Isto significa que muitos doentes poderiam não estar necessitando de oxigênio suplementar e, portanto, estariam potencialmente expostos a tratamento e aos seus efeitos colaterais.

2.2 Lesão celular e o papel do O₂

A exposição a altas concentrações de oxigênio causa dano oxidativo direto às células através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Lesão pulmonar *in vivo* induzida por oxigênio, está bem caracterizada em roedores e tem sido utilizada como um modelo válido de síndrome do desconforto respiratório humano. Lesão pulmonar induzida por hiperóxia pode ser considerada como um processo bimodal resultante (1) a partir de toxicidade direta de oxigênio e (2) a partir da acumulação de mediadores inflamatórios nos pulmões. Tanto a apoptose e necrose foram descritos em células alveolares, epiteliais e endoteliais, durante a hiperóxia. Enquanto a resposta *in vitro* de oxigênio parece ser dependente do tipo de células em culturas de tecidos, não são ainda claros quais são os mecanismos de morte e vias implicadas *in vivo*. Ainda não é possível distinguir inequivocamente entre apoptose, necrose ou outra forma intermediária de morte celular, uma grande variedade de estratégias tem sido mostrada para prevenir dano alveolar e para aumentar a sobrevivência dos animais durante a hiperóxia (PAGANO, BARAZZONE-ARGIROFFO, 2003).

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbicos, utilizados, tanto na produção de energia por meio da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. O oxigênio consumido tem como principal via de metabolismo o sistema aeróbico, ou seja, as mitocôndrias. Esse sistema é responsável pela utilização de 85 a 90% de todo o oxigênio consumido, os outros 10 a 15% são utilizados por enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta (SCHENEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Ratos submetidos a hiperóxia, expostos à condição ambiente de concentração de 100% de oxigênio por tempo de 72 horas apresentaram sinais relacionados à toxicidade do oxigênio. Tal fato pode explicar a causa de óbito em alguns animais do grupo antes mesmo de completado o período total da exposição ou imediatamente ao final dela (PEREIRA et al., 2008).

A exposição a hiperóxia de acordo com VALENÇA et al (2007) é prejudicial e lesiva ao pulmão de ratos Wistar sob concentração de aproximadamente 100% na câmara de exposição. Sugere-se que o tempo é fator importante e crucial para o processo deste modelo de injúria, o que pode ser estendido a seres humanos, embora as doses e a duração permaneçam pouco esclarecidas.

Em camundongos neonatos a hiperóxia por 24 horas promoveu alteração na histoarquitetura pulmonar, porque aumentou as áreas de atelectasia e hemorragia alveolar difusa (REIS et al., 2013).

Os efeitos deletérios do oxigênio (O_2) ocorrem devido à elevada produção de radicais livres (RL) ou de espécies reativas de oxigênio (EROS) (TIEPPO, 2006).

A redução de O_2 para $2H_2O$ requer quatro elétrons, assim, os intermediários serão encontradas nesta via univalente e estes são superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($HO\cdot$). São estes intermediários que são responsáveis pela toxicidade do O_2 , e as defesas contra a toxicidade devem incluir a redução da sua produção como medida máxima possível e eliminar aquela produção que não pode ser evitada (FRIDOVICH, 1998).

A patogênese da lesão induzida por hiperóxia no pulmão não é bem compreendida, mas acredita-se ser mediada pelos danos diretos a célula por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (NAGATA et al., 2007).

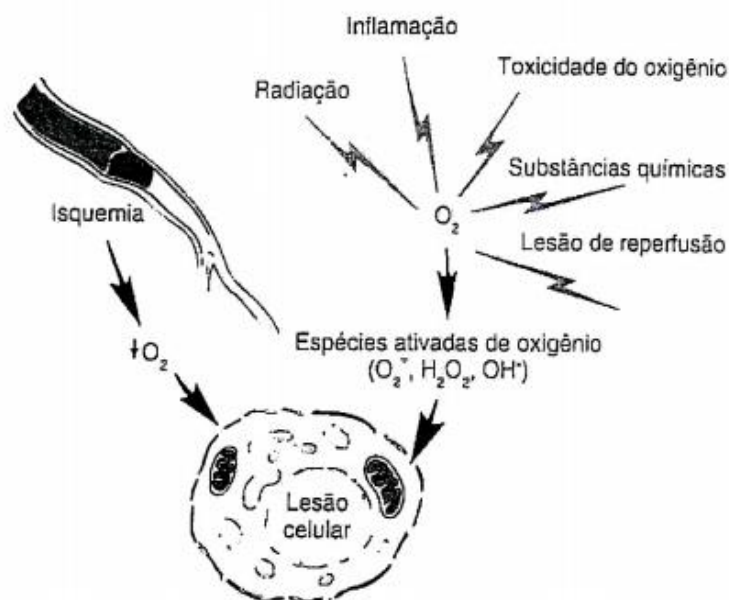


FIGURA 1. Lesão celular e o papel do O₂. Com a redução do suprimento às células de O₂, produz uma injúria isquêmica, enquanto outros estímulos induzem a lesão celular por meio de espécies ativas tóxicas de O₂. Fonte: COTRAN, KUMAR et al., (2000).

A maior concentração de oxigênio implica também maior substrato oxidante disponível para as reações com maior formação de radicais livres ativados do oxigênio; também ocorre uma vasoconstrição generalizada, sendo exceção à circulação pulmonar (POWERS et al., 2002).

Quando a ventilação mecânica se torna invasiva e está associada a altas concentrações de O₂ pode induzir complicações como infecção, barotrauma, lesões cardiovasculares, ferimentos traqueais, lesão pulmonar induzida pelo ventilador e toxicidade de oxigênio (VASSILAKOPOULOS, PETROF, 2004), durante a exposição prolongada a hiperóxia (WANG et al., 2004)

A expressão de várias proteínas reguladoras apoptóticas alteradas, tais como p53 e Bcl-2, e proteínas induzida por dano de DNA está associada com a morte celular e lesão pulmonar em consequência da hiperóxia (MANTELL, LEE, 2000).

A hiperóxia, gerando excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) sistêmicos, pode exacerbar a insuficiência de órgãos. Por conseguinte, um melhor entendimento das vias de transdução de sinal de hiperóxia pode fornecer base para intervenções terapêuticas eficazes. Os principais efeitos biológicos da hiperóxia incluem a morte celular, a indução de respostas de stress, inflamação, e modulação do crescimento celular (LEE, CHOI, 2003).

Estudos também têm sugerido que a exposição a hiperóxia causa lesão pulmonar pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NARASARAJU et al., 2003).

A exposição prolongada a hiperóxia conduz à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) em excesso, causando danos celulares e disfunção de múltiplos órgãos (GORE et al., 2010).causando lesão celular (LEE, CHOI, 2003).

2.3 Estresse Oxidativo

A vida aeróbica evoluiu de uma dependência de oxigênio molecular para a sua mera sobrevivência. A fosforilação oxidativa mitocondrial requer oxigênio para gerar a energia. A homeostase fisiológica destes organismos é estritamente mantida por um estado celular e tecidual ideal de oxigenação por meio de mecanismos de detecção de complexos de oxigênio, cascatas de sinalização, e os processos de transporte. No caso de flutuações nos níveis de oxigênio que conduzem a um aumento (hiperóxia) ou diminuição (hipóxia) no oxigênio celular, o organismo enfrenta uma crise envolvendo depleção das reservas de energia, alteração na cascata de sinalização celular, reações e eventos oxidativos e eventualmente a morte celular ou danos nos tecidos. O oxigênio molecular é ativado por ambos os mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos em espécies reativas de oxigênio (EROS). Os organismos aeróbios desenvolveram defesas antioxidantes eficazes para neutralizar a reatividade de EROS (KULKARNI, KUPPUSAMY PARINANDI, 2007).

A ventilação mecânica com hiperóxia é necessária para tratar pacientes criticamente enfermos. No entanto, prolongada exposição a hiperóxia conduz à geração de espécies reativas de oxigênio excessivas (EROS), o que pode causar

lesão pulmonar inflamatória aguda. Um dos principais efeitos da hiperóxia é a lesão e morte de epitélio pulmonar, que é acompanhado pelo aumento dos níveis pulmonar de citocinas pró-inflamatórias e excessiva infiltração de leucócitos. A interleucina (IL)-8 e outras quimiocinas CXC são importantes mediadores da infiltração de leucócitos. Em adição a estas quimiocinas clássicas, também se discute o grupo de alta mobilidade da proteína-1(HMGB1), que é uma citocina pró-inflamatória recentemente identificada na inflamação sistêmica e pode ter um impacto importante sobre a inflamação por hiperóxia em lesão pulmonar (ZAHHER et al., 2007).

O estresse oxidativo é uma característica central de muitas doenças, particularmente os pulmões que são suscetíveis a lesões por radicais livres e as defesas antioxidantes pulmonares são amplamente distribuídas e inclui tanto sistemas enzimáticos como não enzimáticos (TORRES et al., 2004).

Quando espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas em excesso podem ter efeitos prejudiciais, em um estado conhecido como estresse oxidativo, no entanto desempenham papel importante na regulação da função celular normal (ROSENFELDT et al., 2013).

Os efeitos nocivos gerados por hiperóxia (ROS) se destaca no epitélio respiratório e endotélio *in vivo*, no entanto, pode provocar lesão celular sistêmica em outros órgãos (LEE, CHOI, 2003).

Quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante pode ser estabelecido o distúrbio conhecido como estresse oxidativo, que é caracterizado pela oxidação excessiva de macromoléculas biológicas como DNA, carboidratos, lipídeos e proteínas, podendo causar danos às células, tecidos e órgãos (AYALA et al., 2014).

Para FRIDOVICH (1998) o estresse oxidativo pode causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O alvo principal do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, o tipo de exposição e a severidade desse estresse.

Os termos radicais livres, oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio são usados no meio científico para identificar os intermediários químicos

reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, entre eles: o radical superóxido (O_2^-); o radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA e BICUDO, 2009).

Os radicais livres quando aumentam de modo excessivo provocam demasiada produção de intermediários reativos como proteínas carboniladas, malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídios levando a uma interferência nas vias bioquímicas normais das células (VICENT et AL., 2004).

A morte celular epitelial e infiltração de leucócitos induzida por hiperóxia desempenham papéis essenciais na patogênese da lesão pulmonar hiperóxica. Ambos os eventos são conseqüências de muitas vias de sinalização complicadas e sobrepostas, incluindo aquelas que são mediadas por MAPKs e fatores de transcrição redox, especialmente de NF- κ B. Danos induzidos pela hiperóxia a células epiteliais pulmonares, envolve a morte celular por apoptose multimodal e não apoptótica. O duplo papel de NF- κ B na modulação tanto epitelial, como lesão celular/morte e respostas inflamatórias pulmonares, faz um alvo para concepção de novas estratégias para tratamento. Devido aos efeitos opostos de NF- κ B (inibição de apoptose oxidativa e morte epitelial não apoptótica, a ativação ou inibição global simples de NF- κ B no pulmão não é susceptível de ser benéfica. No entanto, modificando a atividade de NF- κ B em tipos específicos de células durante janelas de tempo específicos, tais como o aumento da ativação do NF- κ B em células epiteliais do pulmão, pode ser mais eficaz na redução dos danos epiteliais por hiperóxia e lesão pulmonar inflamatória. Um melhor entendimento das vias de sinalização que se sobrepõem iria ajudar a identificar novos alvos para minimizar, tanto a morte das células epiteliais pulmonares e respostas pró-inflamatórias como levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de lesão oxidativa no pulmão de pacientes ventilados (ZAHER et al., 2007).

O estresse oxidativo no organismo representa um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade dos mecanismos antioxidantes de defesa para desintoxicar os intermediários reativos. Um excesso de ROS pode danificar todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Quanto maior for o stress oxidativo, mais grave o dano celular

resultante. A oxidação moderada pode desencadear a apoptose, tensões mais intensas podem causar necrose (ROSENFELDT et al., 2013).

As principais vias de sinalização que parecem estar envolvidos incluem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), AP-1 e NF- κ B, que convergem, em última instância, para a expressão de uma variedade de genes de resposta ao stress, as citocinas e fatores de crescimento (LEE e CHOI, 2003)..

2.4 Defesa Antioxidante

A toxicidade do oxigênio é um dos principais fatores de risco no desenvolvimento da doença pulmonar crônica ou displasia broncopulmonar em prematuros. Usando análise proteômica, descobriram que aldeído desidrogenase mitocondrial (mtALDH ou ALDH2) foi menos regulada em pulmão de rato neonatal após exposição por hiperóxia. Os dados demonstraram que a sobre-expressão aldeído desidrogenase mitocondrial (mtALDH) poderia reduzir a produção intracelular de ROS derivado de mitocôndrias das células epiteliais do pulmão durante a exposição hiperóxica. O reduzido ROS em células mtALDH-A549 pode atrasar a morte celular induzida por hiperóxia (XU et al., 2006).

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são formados pela redução incompleta do O₂, gerando espécies que apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA.

(SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

O dano celular resulta basicamente de ataque de espécies reativas de oxigênio (EROS), de nitrogênio (ERN) sobre as macromoléculas, tais como açúcares (CHOH)_n, DNA, proteínas e lipídios. Por outro lado, é também fato reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da

pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos (VASCONCELOS et al., 2007).

No sangue, circulam importantes antioxidantes, a exemplo das vitaminas C, E, beta caroteno etc., bem como biomarcadores do dano causado por ERO e ERN e outros, como malondialdeído (MDA), isoprostanos, lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas e por isso podem ser analisados em plasma ou soro. (VASCONCELOS et al., 2007), reportam que o sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator.

Durante a sua redução para água, o oxigênio dá origem a intermediários reativos. Esta ameaça é reduzida por famílias de enzimas que incluem superóxido dismutase, catalases e peroxidases. As reações em cadeia de radicais são controladas por antioxidantes, tais como ascorbato e os tocoferóis, e danos oxidativos, que ocorre apesar destas defesas, e é amplamente reparado ou anulado por nova biossíntese. No entanto, algum dano é sustentado e que contribui para a mutagênese, a senescência e para inúmeros processos patológicos (FRIDOVICH, 1998).

Para MAZZULO FILHO e colaboradores (2012), estudo com pacientes em ventilação mecânica invasiva apresentam aumento do estresse oxidativo ao final da VMI, com aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diminuição das dosagens séricas da superóxido dismutase e catalase.

Para estudar o papel de aldeído desidrogenase mitocondrial (mtALDH) em lesão pulmonar por hiperóxia, que a expressão de mtALDH em células epiteliais do pulmão humano (A549). XU et al (2006), descobriram que mtALDH reduziu significativamente a morte celular induzida por hiperóxia. Em comparação com células do grupo controle (neo-A549), a morte celular por necrose em células que

expressam mais mtALDH (mtALDH-A549) diminuiu 25,3-6,5%, 50,5 a 9,1%, e de 52,4-15,1% após 24, 48, e 72h de exposição hiperóxica, respectivamente.

Estudos sugerem que nitração de proteínas durante a hiperóxia pode ser mediada, em parte, pela MPO gerado a partir de células fagocíticas ativadas, e tais modificações de proteínas podem contribuir para a lesão pulmonar mediada por hiperóxia (MAZULLO FILHO et al., 2012).

Todas estas informações estimulam o desenvolvimento de outras pesquisas experimentais e clínicas, como os estudos de marcadores específicos de apoptose para macrófagos que se encontram nos alvéolos, para se identificar terapêuticas para tratamento da exposição ao oxigênio medicinal em altas concentrações (HAY, BELL, 2000).

2.5 Peroxidação lipídica, MDA, TBAR

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e é propagada por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo (LIMA, ABDALLA, 2001).

Em vista dos principais componentes celulares atacados serem os lipídios, o que favorece a peroxidação lipídica, que leva a formação de mais radicais livres e EROS, podendo prejudicar outros componentes celulares (URSO e CLARKSON, 2003).

A peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma EROS (geralmente OH) e todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades

físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com consequente morte celular. Reações envolvendo os vários intermediários entre si levam a novos produtos, como malondialdeído (MDA) que reage com o grupo amina de purinas e HNE que reage com guanosina, entre outras reações (VASCONCELOS et al., 2007).

O stress oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Mudanças no nível de malondialdeído (MDA), um produto final de peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, foram investigadas nas vias aéreas de pacientes com exacerbação aguda de DPOC (AECOPD). Os níveis de MDA foram mensurados utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (ANTUS et al., 2014).

A quantificação de MDA é amplamente utilizada como um marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas, e é importante no desenvolvimento de novas metodologias que forneçam resultados com adequada sensibilidade e especificidade. Dados da literatura demonstram valores de concentrações plasmáticas inferiores a 0,2 μM para a forma livre (ANTUNES et al., 2008).

Para NADER-DJALAL et al (1998), o dano oxidativo pode ser evidenciado por peroxidação de lipídios no pulmão por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio está associado ao mau funcionamento do endotélio em consequência de VMI prolongada, levando a hiperóxia e consequente estresse oxidativo demonstrado pelo aumento do TBARS o que causam dano tanto pulmonar como sistêmico (COSTA-HONG et al., 2009).

Lesões celulares podem ser intensificadas por radicais livres quando a oferta de O_2 segue um período de disóxia. Neste caso, avalia-se a concentração plasmática de TBARS, que é resultado da ação deletéria dos radicais livres sobre as células (SANTOS, 2013).

TORRES et al (2004), demonstram em estudos que o pulmão de ratos submetidos à estresse oxidativo crônico, induz ao aumento nos níveis de TBARS, que é um indicador de lipoperoxidação em lipídeos.

Pacientes, submetidos à ventilação mecânica invasiva, podem apresentar alteração do estado redox, marcado pelo aumento no TBARS e redução das enzimas antioxidantes (MAZULLO FILHO et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de MDA em tecido pulmonar e plasma de ratos submetidos a hiperóxia induzida em diferentes níveis de oxigênio

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma dos ratos submetidos a hiperóxia em 60% e 24%, com base na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBAR),

Determinar a concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão dos ratos submetidos a hiperóxia em 60% e 24%, com base na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBAR),

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul com protocolo de número 458/2012.

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 18 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com peso corporal médio de 330 g. Os animais foram mantidos em estante ventilada durante o tempo de adaptação em condições controladas de luminosidade (12h dia/12h noite) e temperatura de $21\pm 1,2^{\circ}\text{C}$, com alimentação comercial (Nuvilab) e água *ad libitum* até o final do trabalho.

4.2 Exposição ao oxigênio

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos com 6 animais cada: grupo controle (Normóxia) - ratos expostos ao ar ambiente (21%); grupo Hiperóxia 24% - ratos expostos 1L/min de oxigênio por 3 h; grupo Hiperóxia 60% - ratos expostos 12L/min de oxigênio por 3 h.

A exposição dos animais a hiperóxia foi realizada em caixa de polipropileno transparente, desenvolvida para o estudo, com as dimensões de 30x40x15cm, com fechamento hermético.

4.3 Procedimentos de coleta de amostra

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação cloridrato de xilazina (2mg/kg) e cloridrato de cetamina (10mg/kg), para a realização da punção cardíaca e obtenção de 5mL de sangue em tubo com gel separador contendo o anticoagulante EDTA. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm, por 5 minutos, a 4°C . O plasma foi separado e armazenado a -196°C até o momento da realização das dosagens de malondialdeído (MDA)

4.4 Determinação de malondialdeído (MDA)

A determinação da concentração de MDA dosados no plasma e no pulmão dos ratos foi realizada com base na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBAR), em baixo pH e temperatura elevada na qual se forma o complexo MDA-TBAR, formando uma reação rosada que é detectada por método colorimétrico.

Os pulmões foram descongelados em temperatura ambiente, diluídos 1:10 em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,5% (MERCK), macerados em disruptor ultrassônico e centrifugados a 3.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C.

Alíquotas de 500 µL de sobrenadante do macerado de pulmão e de 500 µL de plasma de cada animal estudado foi adicionado a 1.000 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% (Sigma) e incubado por 1 hora a 90°C. A solução foi resfriada por 15 min, homogeneizada com 4 mL de álcool n-butílico (MERCK), e centrifugada a 3.000 rpm por 10 min, a 4°C.

O sobrenadante foi utilizado para realizar a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. As dosagens foram expressas em ng/mL.

4.5 Eutanásia e necrópsia

Após a coleta de sangue, os animais foram submetidos à eutanásia com a administração de dose letal do anestésico pentobarbital sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a constatação do óbito, os pulmões foram removidos com os animais posicionados em decúbito dorsal, por incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide. Após a pleurotomia e ressecção, os pulmões foram lavados em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,5% e congelados imediatamente a -196°C até o momento da realização das dosagens de MDA.

4.6 Análise estatística

A comparação entre os valores médios de malondialdeído determinadas nos grupos normóxia 21%, hiperóxia 60% e 24% foi realizada por meio do teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey, considerando o o nível de significância a 5%.

5 RESULTADOS

No presente estudo, os níveis de MDA dosados no plasma encontravam-se elevados nos grupos hiperóxia 60% e 24%, porém apenas o grupo hiperóxia 24% apresentou diferença significativa ($p<0,01$) quando comparado com o grupo normóxia 21%.

O grupo hiperóxia 24%, apresentou diferença significativa ($p<0,01$) inclusive em relação ao grupo hiperóxia 60%, como pode ser observado na Figura 2.

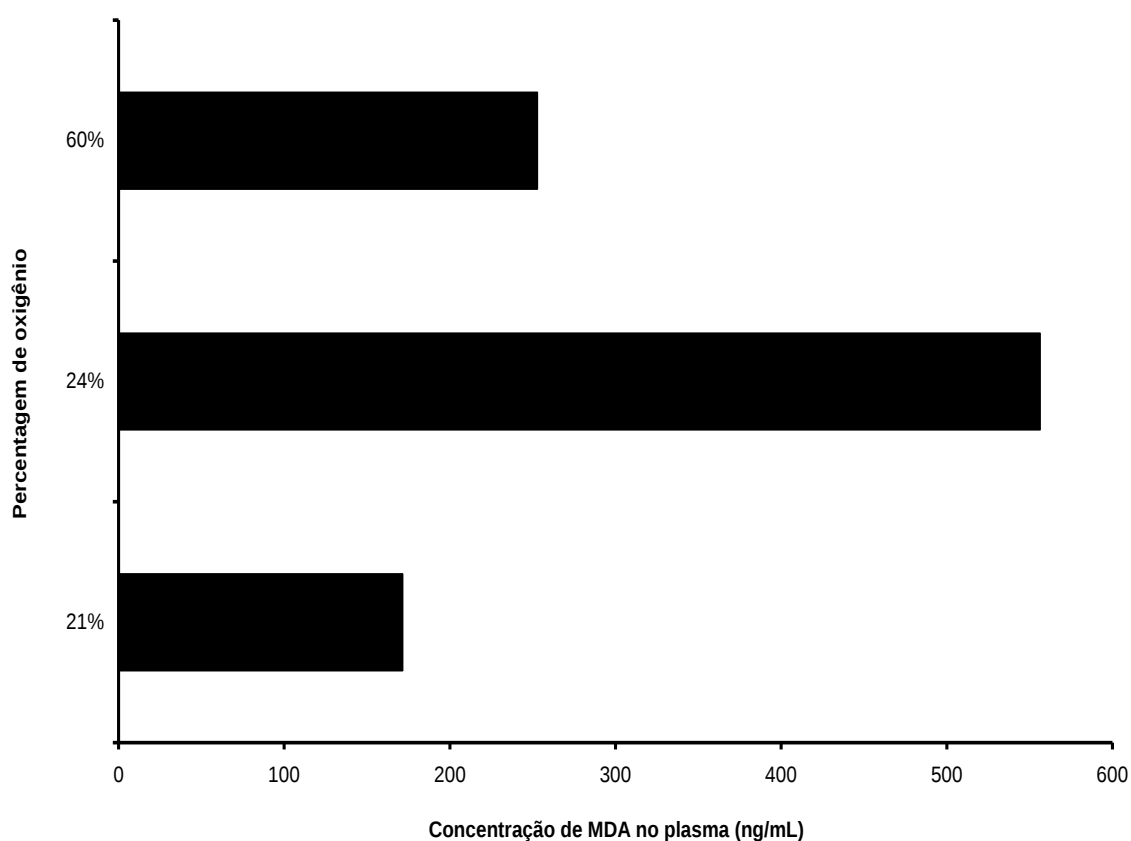


FIGURA 2. Concentração de malondialdeído (MDA) no plasma de ratos expostos a diferentes condições de oxigênio, grupo normóxia 21%; grupo hiperóxia 24% (3 horas); grupo hiperóxia 60% (3 horas).

Os níveis de MDA dosados no plasma encontravam-se elevados nos grupos hiperóxia 60% e 24%, porém apenas o grupo hiperóxia 24% apresentou diferença significativa ($p<0,01$) quando comparado com o grupo normóxia 21%.

O grupo hiperóxia 24%, apresentou diferença significativa ($p<0,01$) inclusive em relação ao grupo hiperóxia 60% (Figura 3).

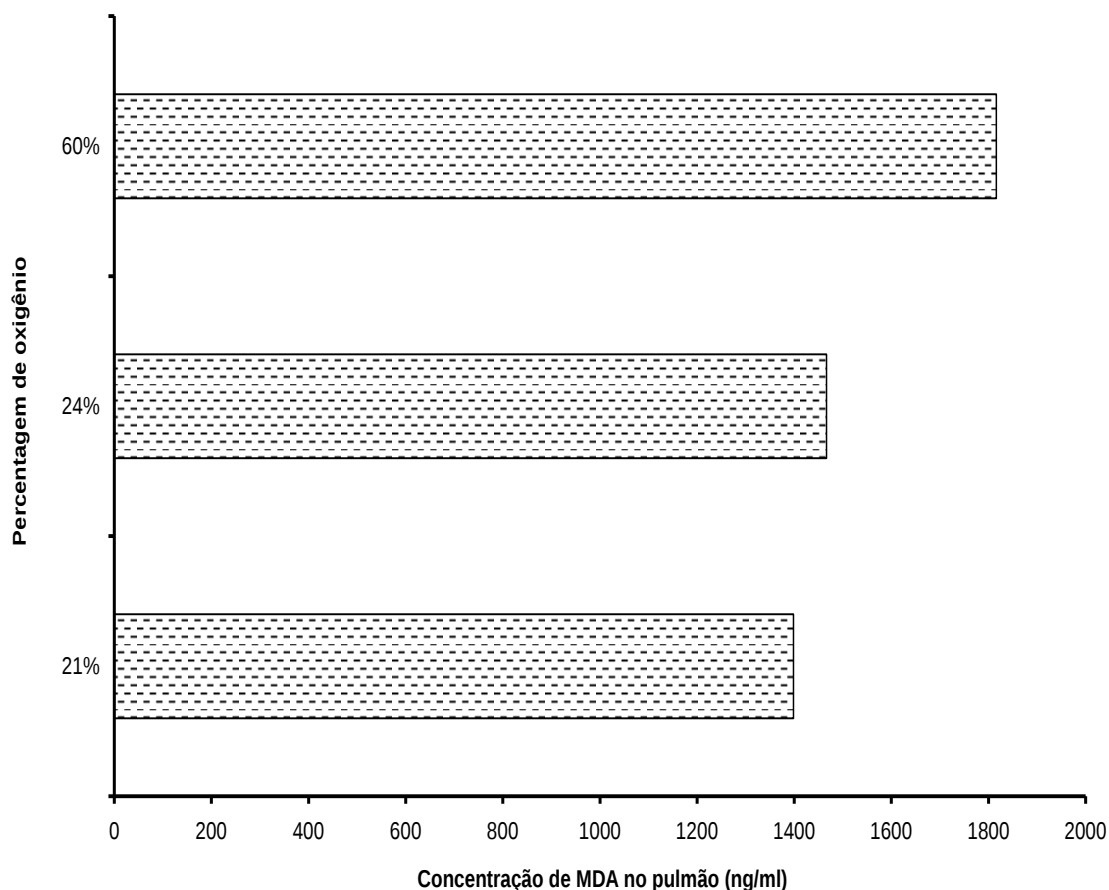


FIGURA 3. Concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão de ratos expostos a diferentes condições de oxigênio, grupo normóxia 21%; grupo hiperóxia 24% (3 horas); grupo hiperóxia 60% (3 horas).

Os animais foram pesados para a formação dos grupos experimentais, e foram distribuídos de forma aleatória em três grupos contendo 6 animais, com peso médio de 330g cada.



FIGURA 4. Pesagem dos animais para formação dos grupos experimentais.



FIGURA 5. Grupo de animais submetidos a hiperóxia em caixa de polipropileno.

6 DISCUSSÃO

Ao analisar a Figura 2 que representa os animais submetidos a hiperóxia a 24% pelo período de 3 horas, observa-se aumento significativo na concentração de malondialdeído (MDA). Deve-se considerar que conforme a técnica utilizada, o plasma destes animais foram submetidos à incubação por 1 hora a 90°C, para que ocorresse a formação do complexo MDA-TBA, no entanto, de acordo com ANTUNES, et al. (2008), as temperaturas elevadas na reação entre MDA e TBA podem acarretar formação *in vitro* de TBARS.

Para MAZULLO FILHO et al., (2012), a maior parte dos analitos quantificados foi gerada durante o aquecimento na execução da técnica do TBARS. A não adição de hidroxitolueno butilado (BHT) pode aumentar a geração endógena dos analitos levando a alteração na detecção dos níveis de TBARS. Quanto a esta observação, não ocorreu no presente estudo, pois foi acrescido o álcool n-butílico na dose 4 mL, para então a solução ser resfriada por 15 min.

Ao avaliar o dano oxidativo pelo TBARS VALENÇA et al. (2007) consideraram o grupo controle como 100% e os outros grupos como variação do grupo controle. Observaram aumento progressivo da detecção de TBARS no grupo 10' ($143 \pm 7,8$, $p < 0,05$), 30' ($180,4 \pm 5,6$, $p < 0,001$) e 90' ($235 \pm 13,7$, $p < 0,001$) em comparação ao grupo controle ($100,6 \pm 1,7$). No presente trabalho foi observado este aumento progressivo na concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão de ratos expostos a diferentes condições de oxigênio, grupo normóxia 21%; grupo hiperóxia 24% e grupo hiperóxia 60% o que pode se analisado na Figura 3.

MAZULLO FILHO et al., (2012) na avaliação do estresse oxidativo em pacientes submetidos à ventilação mecânica invasiva (VMI) obtiveram valores de TBARS no início $3,54 \pm 0,74$ nmol/mg proteína e no final da VMI valores de $4,96 \pm 1,47$ nmol/mg proteína ($p = 0,04$), os resultados apresentados no presente estudo foram em ng/mL de MDA nos pulmões, e de aproximadamente 1400 ng/mL no grupo controle, 1500 ng/mL com 24% de O₂ e 1800 ng/mL (por mL de soro) com 60% de hiperóxia.

Os pacientes em ventilação mecânica invasiva apresentaram média de idade de $64,8 \pm 17,6$ anos; volume corrente de $382 \pm 44,5$ mL e APACHE II de 15 ± 7 . Quando comparado o TBARS inicial e ao final da ventilação houve diferença

significativa ($3,54 \pm 0,74$ vs. $4,96 \pm 1,47$; $p=0,04$). Em relação às enzimas antioxidantes não houve diferença. Observa-se correlação entre as variáveis $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e TBARS ($r = 0,4$); SOD e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = 0,51$) e SOD e APACHE II ($r = 0,56$). Quanto ao desfecho da internação, 6 pacientes foram a óbito (MAZULLO FILHO et al., 2012). No presente estudo, não houve óbito, no entanto, os animais foram submetidos à eutanásia no final do experimento para análise da concentração de MDA no tecido pulmonar.

KOCK et al., (2014) concluíram que apenas 51,6% dos 33 pacientes estavam com os valores de PaO_2 adequados, quando em uso de oxigênio. Houve correlação dos valores de saturação medidos por gasometria e oximetria. Nenhum dos dispositivos apresentou a correlação $\text{FiO}_2 \times \text{Fluxo}$ esperado. E, que este trabalho possa conscientizar e ser um ponto de partida para a inserção de práticas estratégicas, como programas de formação para médicos, enfermeiros e fisioterapeutas em oxigenoterapia, melhorando os cuidados prestados. Sem dúvida, os cuidados precisam ser tomados e com observação constante, visto que com apenas 3 horas de hiperóxia houve alteração significativa de TBARS indicando presença de estresse oxidativo, em ratos, este comportamento de hiperóxia será certamente semelhante em um neonato humano.

Ratos Wistar machos adultos, pesando 180-230 g foram submetidos a diferentes fatores de estresse e os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nenhuma diferença em TBARS foi observada após o estresse de restrição crônica, e concluíram que diferentes fatores de estresse induzem efeitos diferentes no estado oxidativo do organismo (TORRES et al., 2004).

Foi estabelecido o intervalo de referência das concentrações médias de MDA para o método, a partir das análises de amostras de indivíduos adultos saudáveis, de $3,31 \mu\text{M} \pm 0,38$ ($n=38$), dentre este grupo considera-se os valores para mulheres de $3,24 \pm 0,34$ ($n=27$) e $3,47 \pm 0,44$ para homens ($n=11$) (ANTUNES et al., 2008). Na técnica descrita no presente trabalho, os valores de MDA obtidos no plasma dos ratos submetidos a hiperóxia foram de aproximadamente 190 ng/mL no grupo controle, com 60% de O_2 obteve-se menores valores (± 250 ng/mL) do que com 24% de O_2 cujos valores alcançaram a concentração de ± 550 ng/mL de plasma, e corrobora com esses autores quando reportam que os valores de

referência para os níveis de MDA total relatados na literatura apresentam grande variabilidade, estando relacionados com as condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios. Acrescenta-se a esta observação às várias unidades utilizadas nas diversas pesquisas analisadas e com diferentes espécies. Concorde-se com ZAHER et al (2007) quando descrevem que apesar de extensos estudos com foco na redução de lesão celular e inflamação, e as intervenções terapêuticas terem sido desenvolvidas para combater a lesão pulmonar oxidativa, resultante da ventilação mecânica com hiperóxia. Deve-se levar em consideração que de acordo com (KULKARNI, KUPPUSAMY PARINANDI, 2007) os organismos aeróbios desenvolveram defesas antioxidantes eficazes para neutralizar a reatividade de ROS. Embora ROS, também são necessários para muitas funções fisiológicas normais, a produção de ROS juntamente com a sua eliminação insuficiente por antioxidantes endógenos vai levar ao prejudicial estresse oxidativo.

Concorde-se com ANTUNES et al.(2008) quando referem-se ao malondialdeído (MDA) como um importante biomarcador para a avaliação do estresse oxidativo, haja vista que os resultados obtidos no presente estudo mostrou variações significativas em plasma e tecido pulmonar de ratos expostos a diferentes condições de hiperóxia.

7 CONCLUSÃO

Os níveis de MDA dosados no plasma encontravam-se mais elevados nos grupos hiperóxia 24% do que com 60% de oxigênio.

Quanto maior a concentração de oxigênio a que os animais foram expostos, maior a concentração de MDA no tecido pulmonar.

8 REFERÊNCIAS

ANTUNES MV, LAZZARETTI C, GAMARO GD, LINDEN R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Abr./Jun., 2008, vol. 44, n. 2, p 279-287

ANTUS B, HARNASI G, DROZDOVSZKY O, BARTA I. Monitoring oxidative stress during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations using malondialdehyde. *Respirology*, January 2014, v. 19, n.1, p. 74–9.

AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, 1-31

COSTA-HONG V, BORTOLOTTI LP, JORGETTI V, CONSOLIM-COLOMBOI F, KRIEGER EM, LIMA JJ. Estresse oxidativo e disfunção endotelial na doença renal crônica. *Arq Brás Cardiol*. 2009;92(5):413-8.

COTRAN, RS., KUMAR, V, et al., (2000). “Robbins – Patologia: Estrutural e Funcional”. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

FRIDOVICH, IRWIN. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 1998, 201, 1203–09.

GORE A, Muralidhar M, Espey MG, Degenhardt K, Mantell LL. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *J Immunotoxicol*. 2010 Oct-Dec;7(4):239-54. doi: 10.3109/1547691X.2010.492254. Epub 2010 Jun 29.

HAY WW JR, BELL EF. Oxygen therapy, oxygen toxicity, and the STOP-ROP trial. *Pediatrics*. 2000; 105:424-5.

KOCK, K de S, ROCHA, PAC, SILVESTRE, JC de C, COELHO, D, LEITE, KR. Adequações dos dispositivos de oxigenoterapia em enfermagem hospitalar avaliadas por oximetria de pulso e gasometria arterial. *ASSOBRAFIR Ciência*. 2014 Abr;5(1):53-64.

KULKARNI AC, KUPPUSAMY P, PARINANDI N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Oct;9(10):1717-30.

LEE PJ, CHOI AMK. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(4):341-50

LIMA ES, ABDALLA DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 37, n. 3, set./dez., 2001

MAIA MS, BICUDO SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.

MANTELL LL, LEE PJ. Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct;71(1-2):359-70.

MAZULLO FILHO JBR, BONA S, ROSA DP da SILVA FG, FORGIARINI JUNIOR LA, DIAS AS, MARRONI NP. Os efeitos da ventilação mecânica no estresse oxidativo. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012; 24(1):23-29

NADER-DJALAL N, KNIGHT PRD, THUSU K, DAVIDSON BA, HOLM BA, JOHNSON KJ, et al. Reactive oxygen species contribute to oxygen-related lung injury after acid spiration. *Anesth Analg*. 1998; 87(1): 127-33.

NAGATA K, IWASAKI Y, YAMADA T, YUBA T, KONO K, HOSOGI S, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury. *Respir Med*. 2007;101(4):800-7.

NARASARAJU TA, JIN N, NARENDRANATH CR, CHEN Z, GOU D, LIU L. Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(5):1037-45.

PAGANO A, BARAZZONE-ARGIROFFO C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1010:405-16.

PEREIRA, DM, SILVA, IS, SILVA, BAK da. AYDOS, RD, CARVALHO, P de TC de, ODASHIRO, AN, OLIVEIRA, LVF de. Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia) por Tempo por Tempo Prolongado no Tecido Pulmonar de Ratos Wistar. Revista Biociências, UNITAU. Volume 14, número 2, 2008. Disponível em periodicos.unitau.br

POWERS SK, SHANELY RA, COOMBES JS, KOESTERER TJ, MACKENZIE M, GAMMEREN D, et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. J Appl Physiol. 2002;92(5):1851-8

REIS RB, NAGATO AC, NARDELLI CR, MATIAS IC, LIMA WG, BEZERRA FS. Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia. J Pediatr (Rio J). 2013;89:300-6.

REISSMANN H, BÖHM SH, SUÁREZ-SIPMANN F, TUSMAN G, BUSCHMANN C, MAISCH S, et al. Suctioning through a double-lumen endotracheal tube helps to prevent alveolar collapse and to preserve ventilation. Intensive Care Med. 2005;31:431-40.

ROSENFELDT F, WILSON M, LEE G, KURE C, OU R, BRAUN L, HAAN J de. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy Experimental Gerontology 48 (2012) 45–54

SANTOS RS dos. Efeitos imediatos da fisioterapia respiratória sobre os parâmetros hemodinâmicos, metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com choque séptico. (**Dissertação**). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med Esporte, Jul/Ago, 2004, v. 10, n. 4, p.308-13.

SILVA LA da. Os efeitos do oxigênio suplementar em neonatologia e pediatria: uma revisão. (Artigo) Pós Graduação em Fisioterapia Pediátrica e Neonatal da UTI a Reabilitação Neurológica. Orientador: Prof. Dr. Giulliano Gardenghi, Goiânia, 2013

TIEPPO, J. Efeito da quercetina no pulmão de ratos com ligadura de ducto biliar comum. Um modelo experimental de síndrome hepatopulmonar. (**Dissertação**). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2006, 126 f.

TORRES R.L, TORRES I.L.S., GAMARO G.D., FONTELLA F.U, SILVEIRA P.P, MOREIRA J.S.R, LACERDA M., AMORETTI J.R., RECH D., DALMAZ C., BELLÓ A.A. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. *Braz J Med Biol Res*, 2004, v. 37, n.2, p 185-192.

URSO ML, CLARKSON PM. Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*, p. 41-54, 2003.

VALENÇA SS dos, KLOSS ML, BEZERRA FS, LANZETTI M, SILVA FL, PORTO LC. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. *J Bras Pneumol*. 2007;33(6):655-662

VASCONCELOS SML, GOULART MOF, MOURA JB de F. MANFREDINI V, BENFATO M da S, KUBOTA LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação *Quím. Nova*, Sept./Oct. 2007, v. 30, n. 5, p. 1323-38.

VASSILAKOPOULOS T, PETROF JB. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(3):336-41.

VICENT, H.K.; MORGAN, J.W.; VICENT, K.R. Obesity Exacerbates Oxidative Stress Levels after Acute Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, p.772-779, 2004.

XU D, GUTHRIE JR, MABRY S, SACK TM, TRUOG WE. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):966-75.

ZAHER ET, MILLER JE, MORROWB DMP, JAVDANB M, MANTELL LL. Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonar epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2007 April 1; 42(7): 897–908.

WANG Y, FEINSTEIN SI, MANEVICH Y, HO YS, FISHER AB. Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice. *Free Radic Biol Med.* 2004 37 (11): 1736-1743.