

EFEITOS DA INALAÇÃO DE OZÔNIO EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*).

GARCIA, C.A.¹; STANZIOLA, L.²; SILVA, M.C.³; OLIVEIRA, O.M.^{3*}; SOUZA, T.I.M.³

RESUMO

É reconhecido que curtos períodos de exposição ao ozônio através das vias aéreas produz reações que incluem: redução da função ventilatória; aumento da permeabilidade e reatividade da árvore respiratória; aumento dos mediadores endógenos e células inflamatórias, e uma diminuição de pneumócitos tipo I nos alvéolos. Líquidos de lavagem broncoalveolar obtidos de humanos expostos ao ozônio exibiram aumento na infiltração de neutrófilos e no conteúdo de mediadores inflamatórios e citocinas. Alguns pesquisadores correlacionam a infiltração de neutrófilos com altos níveis de interleucina 8 (IL-8) que são encontradas nesses líquidos . Os danos causados pelo ozônio inalado estão relacionados com a liberação de ácido aracdônico das membranas celulares dos pulmões, produzindo um aumento nos níveis de leucotrienos, os primeiros responsáveis pelos processos de quimiotaxia. Como resultado, neutrófilos são atraídos até o tecido pulmonar causando danos locais. Os efeitos adversos bem conhecidos quando o ozônio é inalado, tanto quanto os efeitos paradóxicos encontrados depois da utilização do gás provocam muitas razões para reflexão e conclusões que futuros estudos deveriam investigar uma maior faixa de variáveis, esforçando-se para obter uma interpretação mais compreensiva dos fenômenos descritos na literatura. Este trabalho objetivou estudar alterações fisiológicas e de comportamento de camundongos expostos à inalação de ozônio em câmara fechada por diferentes tempos de exposição. Quatro lotes de 10 camundongos, foram contidos em ambiente fechado e submetidos à inalação da mistura oxigênio – ozônio produzida por gerador de ozônio com capacidade de produção fixa, dosada volumetricamente por iodeto de potássio e titulação com tiosulfato de sódio (IOA), de 0,00023 gramas de ozônio por minuto ou 0,014 g de ozônio por hora, alimentado por uma ampola de oxigênio com 99,5% de pureza, à pressão de 200 Kgf/cm², num fluxo de 5 litros/min durante 15, 30, 45 e 60 minutos. As alterações observadas, bem como os óbitos, estão em conformidade com os achados de autores. A dispnéia acentuada, broncoespasmo e constricção retroesternal, estão bem evidenciadas pela apatia e contrações abdominais observadas no tempo de 15 minutos de inalação da mistura oxigênio-ozônio. Observou-se um total de 10 óbitos, que se iniciaram após 30 minutos de inalação e continuaram acontecendo até completarem-se 60 minutos. Estes achados corroboram algumas afirmações de autores, no entanto, diferem no que diz respeito ao tempo de inalação.

1 – Docente da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU

2 – Docente do Instituto de Ciências Biomédicas – UFU

3 – Acadêmicos da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU

Faculdade de Medicina Veterinária da UFU - Rua Ceará s/nº - Bloco 2 D – Sala 2D
34 – Campus Umuarama – Uberlândia – MG, CEP 38405-240.

drvirus@famev.ufu.br

Os autores afirmam acontecerem os óbitos após 4 horas de inalação, enquanto que no presente trabalho estes eventos foram observados a partir de 30 minutos de inalação. Acreditamos que esta discrepância encontra justificativa nas concentrações da mistura oxigênio-ozônio utilizadas por aquele autor e as concentrações implementadas neste trabalho. As manifestações de dispnéia acentuada, edema pulmonar agudo e parada respiratória encontram confirmação nos achados histopatológicos de edema pulmonar, ruptura alveolar e hemorragias pulmonares.

INTRODUÇÃO

É reconhecido que curtos períodos de exposição ao ozônio através das vias aéreas produz reações que incluem: redução da função ventilatória; aumento da permeabilidade e reatividade da árvore respiratória; aumento dos mediadores endógenos e células inflamatórias, e uma diminuição de pneumócitos tipo I nos alvéolos (MORTON, 1993; MADDEN et al, 1991; DOELMAN, 1991).

Líquidos de lavagem broncoalveolar obtidos de humanos expostos ao ozônio exibiram aumento na infiltração de neutrófilos e no conteúdo de mediadores inflamatórios e citocinas (WRIGHT, 1994). Alguns pesquisadores correlacionam a infiltração de neutrófilos com altos níveis de interleucina 8 (IL-8) que são encontradas nesses líquidos (McBRIDE et al, 1994).

Os danos causados pelo ozônio inalado estão relacionados com a liberação de ácido aracdônico das membranas celulares dos pulmões, produzindo um aumento nos níveis de leucotrienos, os primeiros responsáveis pelos processos de quimiotaxia. Como resultado, neutrófilos são atraídos até o tecido pulmonar causando danos locais (DOELMAN, 1991).

Em animais que inalaram ozônio por horas ou dias, foram observadas alterações na bioquímica e morfologia pulmonar além de potencial para infecções respiratórias bacterianas. Estas alterações aconteceram nos brônquios terminais e alvéolos, acompanhados por danos às células ciliadas e epitélio alveolar tipo I, tecidos estes, que foram substituídos por uma proliferação de células de Clara e células epiteliais tipo II. Tem sido reportado que a presença de adenomas pleurais em animais que inalaram o ozônio, mostrou aumento significativo em relação aos animais não expostos ao ozônio, além de hiperplasia e metaplasia celular, bem como reações inflamatórias (VICTORIN, 1992).

Animais expostos à inalação de ozônio mostram efeitos dependentes da dose, gerando inflamação na região centroacinar dos pulmões com posterior fibrose (BOORMAN, 1994).

É também reportado que a exposição ao ozônio provoca danos ao DNA (CAJIGAS et al, 1994).

Pesquisas têm mostrado resultados diferentes e algumas vezes paradóxicos sobre os efeitos deletérios do ozônio. Por exemplo, tem sido mostrado que inalação de ozônio não produz efeitos carcinogênicos nem aumenta a incidência de neoplasia pulmonar em ratos de ambos os sexos (BOORMAN, 1994).

Schulz et al, 1989, reportou os efeitos anticarcinogênicos em camundongos NMRI tratados com uretano e ozônio.

Boccci 2000, relata os efeitos tóxicos do ozônio presente no ar correlacionando as concentrações de ozônio (ppm) com os efeitos tóxicos correspondentes no quadro abaixo:

| CONCENTRAÇÃO DE O₃ NO AR (ppm) | EFEITOS TÓXICOS |
|--|--|
| 0,1 | IRRITAÇÃO DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES E LECRIMEJAMENTO |
| 1,0 – 2,0 | RINITE, TOSSE, CEFALÉIA, NÁUSEAS, VÔMITOS, CRISES DE ASMAS. |
| 2,0 – 5,0 (10 – 20 MIN) | DISPNÉIA ACENTUADA, BRONCOESPASMO, CONSTRIÇÃO RETROESTERNAL |
| 5,0 (60 MIN) | EDEMA PULMONAR AGUDO E PARADA RESPIRATÓRIA |
| 10,0 | MORTE EM APROXIMADAMENTE 4 HORAS |
| 50,0 | MORTE EM ALGUNS MINUTOS |

Animais que inalaram baixas doses de ozônio por tempo prolongado apresentaram aumento no nível de enzimas antioxidantes, principalmente glutathion-S-transferase, glutathion peroxidase, catalase e superóxido dismutase (PLOPPER et al, 1994).

Outros estudos mostraram uma diminuição nos danos causados ao trato respiratório de ratos expostos a baixas doses do gás por 7 dias consecutivos em altas concentrações de ozônio, isto sugere que baixas doses iniciais podem reduzir a permeabilidade das vias respiratórias inferiores provendo proteção posterior quando concentrações maiores de ozônio são administradas (VAN der WAL et al, 1994).

Estas discrepâncias nos dados de pesquisa, os efeitos adversos bem conhecidos quando o ozônio é inalado, tanto quanto os efeitos paradóxicos encontrados depois da utilização do gás provocam muitas razões para reflexão e conclusões que futuros estudos deveriam investigar uma maior faixa de variáveis, esforçando-se para obter uma interpretação mais compreensiva dos fenômenos descritos acima.

Este trabalho objetivou estudar alterações fisiológicas e de comportamento de camundongos expostos à inalação de ozônio em câmara fechada por diferentes tempos de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quatro btes de 10 camundongos, foram contidos em ambiente fechado e submetidos à inalação da mistura oxigênio – ozônio produzida por gerador de ozônio com capacidade de produção fixa, dosada volumetricamente por iodeto de potássio e titulação com tiosulfato de sódio (IOA), de 0,00023 gramas de ozônio por minuto ou 0,014 g de ozônio por hora, alimentado por uma ampola de oxigênio com 99,5% de pureza, à pressão de 200 Kgf/cm², num fluxo de 5 litros/min durante 15, 30, 45 e 60 minutos.

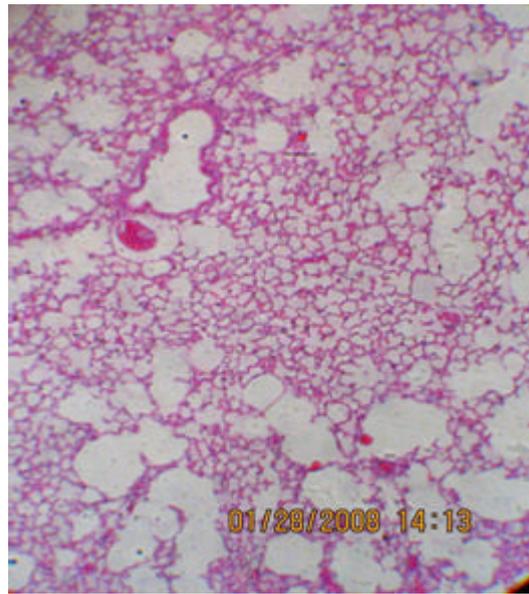
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações observadas nos animais durante os diferentes tempos de inalação da mistura oxigênio-ozônio podem ser observadas no quadro e fotografias abaixo:

| | |
|---------------------------------|---|
| GRUPO 1 (15 minutos) | APATIA, CONTRAÇÕES ABDOMINAIS, DEFECAÇÃO, ? RESPOSTA À ESTÍMULOS EXTERNOS. APÓS 45 MINUTOS DE OBSERVAÇÃO, RECUPERAÇÃO DOS MOVIMENTOS E DA COORDENAÇÃO MOTORA. APÓS 60 MINUTOS, RECUPERAÇÃO TOTAL. AUSÊNCIA DE MORTES. |
| GRUPO 2 (30 minutos) | IDEM ACIMA. 02 MORTES APÓS 30 MINUTOS DE OBSERVAÇÃO, OS DEMAIS RECUPERARAM-SE TOTALMENTE EM 60 MINUTOS. Nº TOTAL DE MORTOS: 02 (20%) |
| GRUPO 3 (45 minutos) | APATIA, CONTRAÇÕES MUSCULARES, SIALORRÉIA, TREMORES, INCOORDENAÇÃO MOTORA, ? RESPOSTA À ESTÍMULOS. APÓS 15 MINUTOS DE OBSERVAÇÃO APRESENTARAM SALTOS, EXCITAÇÃO, CONVULSÕES. MORTE DE 05 ANIMAIS APÓS 45 MINUTOS. COM 60 MINUTOS OS DEMAIS RECUPERARAM OS MOVIMENTOS. Nº TOTAL DE MORTOS: 05 (50%) |
| Grupo 4 (60 minutos) | 02 MORTES NO INICIO DA OBSERVAÇÃO. AGITAÇÃO, SALTOS, INCOORDENAÇÃO MOTORA. 05 MORTES APÓS 10 MINUTOS DE OBSERVAÇÃO COM ASFIXIA, SIALORRÉIA E CONVULSÕES. 03 MORTES APÓS 50 MINUTOS DE OBSERVAÇÃO. Nº TOTAL DE MORTOS: 10 (100%) |



Fotografia 1 – Camundongos após inalação da mistura oxigênio-ozônio.



Fotografia 2 – Edema pulmonar, ruptura alveolar e hemorragias pulmonares após inalação do ozônio.

As alterações observadas, bem como os óbitos, estão em conformidade com os achados de Bocci, 2000, relacionados na introdução. A dispnéia acentuada, broncoespasmo e constricção retroesternal, estão bem evidenciadas pela apatia e contrações abdominais observadas no tempo de 15 minutos de inalação da mistura oxigênio-ozônio. Observou-se um total de 10 óbitos (Fotografia 1), que se iniciaram após 30 minutos de inalação e continuaram acontecendo até completarem-se 60 minutos. Estes achados corroboram as afirmações de Bocci, 2000, no entanto, diferem do referido autor no que diz respeito ao tempo de inalação. O autor afirma acontecerem os óbitos após 4 horas de inalação, enquanto que no presente trabalho estes eventos foram observados a partir de 30 minutos de inalação. Acreditamos que esta discrepância encontre justificativa nas concentrações da mistura oxigênio-ozônio utilizadas por aquele autor e as concentrações implementadas neste trabalho.

As manifestações de dispnéia acentuada, edema pulmonar agudo e parada respiratória relacionadas por Bocci, 2000, encontram confirmação nos achados histopatológicos de edema pulmonar, ruptura alveolar e hemorragias pulmonares evidenciados na Fotografia 2.

CONCLUSÕES

Nas concentrações e tempos de exposição testados, o ozônio inalado provocou distúrbios respiratórios, nervosos, digestivos e mortes, além de lesões pulmonares detectadas no exame histopatológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOORMAN GA. Ozone and ozone-4 (N-nitrosomethylamino-1-3(3-pyridyl)-1-butanone in Fisher-344/N rats. **Tox and Pathol.** (22)5: 545-553. 1994.
- CAJIGAS A, MITCHELL G, BEAM C, STEINBERG JJ. Ozonation of DNA forms adducts: A ³²P-DNA labeling and Thin-Layer Chromatography technique to measure DNA environmental biomarkers. **Arch of Environ Health** . (49)1: 25-36. 1994.
- DOELMAN CJ. **Reactive oxygen species and airway** . Amsterdam: Febodruk Ed. 1991.
- MADDEN MC, ELING TE, DAILEY LA, FRIEDMAN M. The effect of ozone exposure on rat alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. **Exp Lung Res.** 17:47-63. 1991.
- McBRIDE DE, KOENIG JQ, LUCHEL DL, WILLIAMS PV, HENDERSON WR. Inflammatory effects of ozone in the upper airways of subjects with asthma. **Am J Respir Crit Care Med.** 149:1192-1197. 1994.
- MORTON L. Use of human lung tissue for studies of structural changes associated with chronic ozone exposure: Opportunities and critical issues. **Environ Health Persp.** Supp. (102)Supp.4: 208-213. 1993.
- PLOPPER CG, DUAN X, BUCKPITT AR, PINKERTON KE. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lung of rats exposed for 90 days or 20 months. **Toxicol Appl Pharmacol.** 127: 124-131. 1994.
- SCHULZ S. Anticarcinogenic effect of inhaled ozone/oxygen in urethan-treated NMRI-mice. **Proceedings Ninth Ozone World Congress**, New York. 69-76. 1989.
- VAN der WAL WA, VAN BREE L, MARRA L, ROMBOUT PJ. Attenuation of acute lung injury by ozone inhalation. The effect of low level pre-exposure. **Toxicol Lett.** (72)1-3: 291-298. 1994.
- VICTORIN K. Review of genotoxicity of ozone. **Mutation Research.** 277: 221-238. 1992.
- WRIGHT DT. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicology and applied Pharmacology.** 127: 27-36. 1994.