



**ALTERAÇÕES NA MUCOSA NASAL PROVOCADAS  
PELA PRESSÃO ATMOSFÉRICA, OXIGÉNIO E OUTROS  
FACTORES**

**PAULO SÉRGIO ALVES VERA-CRUZ PINTO**

Dissertação de doutoramento em Ciências Médicas

2009

PAULO SÉRGIO ALVES VERA-CRUZ PINTO

**ALTERAÇÕES NA MUCOSA NASAL PROVOCADAS PELA  
PRESSÃO ATMOSFÉRICA, OXIGÉNIO E OUTROS FACTORES**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Carlos Zagalo, professor do Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Co-Orientador – Professor Doutor Artur Águas, professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Porto 2009



À Carla, ao Gonçalo e ao Bernardo



**“Try and leave this world a little better than you found it  
and when your turn come to die, you can die happy in  
feeling that at any rate you have not wasted your time  
but have done your best.”**

Lord Robert Baden-Powell's Last Message to Scouts, 1941



## ÍNDICE

Preceitos legais .....	9
Agradecimentos.....	10
INTRODUÇÃO.....	12
1- Anatomia das Fossas Nasais no Humano .....	12
2 - Anatomia das Fossas Nasais no Rato .....	14
3 - Fisiologia da Mucosa Nasal.....	15
4 – Factores Moduladores de Respostas da Mucosa Nasal .....	16
4.1. - Fármacos de aplicação tópica nasal .....	17
4.2. - Efeitos da pressão atmosférica na via aérea.....	19
5 – A Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) .....	20
6 - Hipótese .....	26
7 – Objectivos .....	27
RESULTADOS .....	29
1 - Aplicações actuais da oxigenoterapia hiperbárica em Otorrinolaringologia .....	30
2 - Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration....	36
3 - Chronic hyperbaric oxygen therapy causes only minor ultrastructural changes in the human nasal epithelium.....	42
4 - Structure of the rat nasal mucosa after acute and chronic hyperbaric oxygen therapy .....	52
5 - Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin ...	71
6 - Hyperbaric oxygen improves nasal air flow .....	84
DISCUSSÃO.....	99
1 - Aspectos anatomo-clínicos da mucosa nasal humana .....	103
1.1. - Após Oxigenoterapia Hiperbárica.....	103
1.2. - Após aplicação tópica de outros fármacos .....	106
2 - Aspectos anatomo-clínicos da mucosa nasal do rato .....	107
3 – Diferenças entre o humano e o rato .....	109
4 – Oxigenoterapia Hiperbárica noutros órgãos; perspectiva futura .....	110
5 – Avaliação clínica da Oxigenoterapia Hiperbárica na fisiologia nasal.....	111
6 – Perspectiva médico-naval.....	112
CONCLUSÕES.....	115
RESUMOS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	126



## **Preceitos legais**

De acordo com o nº 2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados para esta tese resultados contidos nos seguintes trabalhos publicados:

### **Artigos publicados ou aceites para publicação:**

- Paulo Vera-Cruz, Sara Baptista, Aplicações actuais da oxigenoterapia hiperbárica em Otorrinolaringologia, Clin Inves Otorri (2008):18-22
- Paulo Vera-Cruz, Marco Ferreira, Carlos Zagalo, José Martins dos Santos, Artur P. Águas, Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration, Rhinology, 2008, 46, 297-301
- Paulo Vera-Cruz, Marco Ferreira, Carlos Zagalo, José Martins dos Santos, Artur P. Águas, Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin, European Review of ENT
- Paulo Vera-Cruz, José Croca, Carlos Zagalo, Hyperbaric oxygen improves nasal air flow, Undersea & Hyperbaric Medicine

### **Artigos em impressão:**

- Paulo Vera-Cruz, Carlos Zagalo, José Martins dos Santos, Artur P. Águas, Chronic hyperbaric oxygen therapy causes only minor ultrastructural changes in the human nasal epithelium, European Journal of Anatomy
- Paulo Vera-Cruz, Marco Ferreira, Carlos Zagalo, José Martins dos Santos, Artur P. Águas, Structure of the rat nasal mucosa after acute and chronic hyperbaric oxygen therapy, American Journal of Rhinology

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Carlos Zagalo pelo estímulo e pela confiança que me dedicou. Pelos sacrifícios da sua vida pessoal para me apoiar e pela orientação pragmática nos períodos de maior dúvida.

Ao Professor Doutor Artur Águas pelo exemplo humano, científico e médico, pela permanente disponibilidade, pelo apoio constante e pela confiança que em mim depositou.

Ao Professor Doutor Martins dos Santos pelo estímulo e pelas facilidades concedidas no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Ao Dr. Marco Ferreira pela sua disponibilidade e ajuda imprescindível na observação e interpretação das preparações histológicas das peças humanas e dos animais de experiência.

Ao Professor Doutor, Almirante Telles Martins pela amizade, pelo apoio nas fases difíceis e pelo estímulo constante.

Ao Almirante Valdemar Goulart Porto pela confiança, pela amizade e pelo apoio que me dedicou.

Aos Directores do Hospital da Marinha, CMG MN Filipe Roque e CMG MN Menezes Cordeiro pelas facilidades concedidas e pelo apoio prestado.

Ao CFR MN Albuquerque e Sousa pela disponibilização dos recursos do Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha.

Ao Almirante Gonçalves de Brito, CFR EMQ Almeida Machado e CFR EMQ Costa Campos pelo empenho que dedicaram ao planeamento, construção e funcionamento da câmara hiperbárica para animais de pequeno porte.

Ao Sr. Emanuel Monteiro por ter proporcionado toda a sua experiência e saber nas preparações da microscopia electrónica de transmissão.

À Dra. Sara Viana Baptista pela amizade, colaboração e conselhos clínicos preciosos durante todo o trabalho.

À Dra. Rita Certã e ao Dr. José Ferreira pelo cuidadoso trabalho das preparações histológicas e imunohistoquímicas para microscopia óptica.

À Sra. D. Fátima Silveiro pela aplicada colaboração em todas as fases deste trabalho e pela amizade e estímulo com que sempre me contemplou.

Ao Prof. Dr. José Brito pela análise estatística dos dados.

Aos colegas e colaboradores do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital da Marinha que, em verdadeiro espírito de equipa, participaram activamente nas várias tarefas deste projecto, com uma colaboração preciosa.

Ao Sr. José Orlando Ferreira pelas revisões de texto em língua francesa.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar por todas as facilidades e apoio concedido.

À Marinha de Guerra Portuguesa pela confiança, pelo apoio e pelas facilidades concedidas.

À Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior, Crl por todas as facilidades disponibilizadas.

À Dra. Arminda Sustelo, D. Ana Amorim Neves e D. Dina Pereira do Centro de Documentação do Hospital Fernando Fonseca pelo apoio na obtenção de publicações periódicas.

## INTRODUÇÃO

### 1- Anatomia das Fossas Nasais no Humano

O nariz é habitualmente apresentado, sob o ponto de vista anatómico, como um órgão ímpar localizado em posição mediana no terço médio da face. É constituído pela pirâmide nasal e pelas fossas nasais.

Embriologicamente, forma-se a partir de diversos processos mesenquimatosos à volta da boca primitiva ou *stomodeum*. Entre esses processos insinua-se um espessamento ectodérmico – o placódio olfativo – que formará o epitélio olfativo.

A pirâmide nasal é uma estrutura fibro-óssea-cartilagínea com um revestimento exterior, com músculos e pele, e um revestimento interior de mucosa e pele circunscrita à região narinária onde se encontram pêlos volumosos ou vibrissas. As fossas nasais são duas fendas paralelas ao grande eixo sagital, separadas pelo septo nasal, que se estendem desde as narinas até às choanas.

No septo nasal, que é a parede interna das fossas nasais, descrevem-se três porções: a membranosa, a cartilagínea e a óssea que inclui a lámina perpendicular do etmóide, o vómer e duas cristas ósseas da maxila e do osso palatino. A parede inferior é composta nos seus três quartos anteriores pelas apófises palatinas da maxila, e pela lámina horizontal dos ossos palatinos no quarto posterior. A parede superior é formada de frente para trás pelos ossos nasais, espinha nasal do osso frontal, lámina horizontal do etmóide e corpo do esfenóide.

A parede externa das fossas nasais integra seis ossos: maxila, esfenóide, palatino, unguis ou lacrimal, concha nasal inferior e etmóide. Topograficamente identificam-se três a cinco conchas, cornetas ou turbinatos nasais (inferior, média, superior, de Santorini e de Zuckerkandl) e os respectivos meatos. No meato inferior abre-se o orifício do canal lacrimonasal. No meato médio encontram-se os *ostia* de drenagem do seio maxilar e das células etmoidais anteriores e no meato superior processa-se a drenagem das células etmoidais posteriores. O *ostium* do seio esfenoidal situa-se no recesso etmoido-esfenoidal, internamente à concha nasal superior.

A vascularização arterial das fossas nasais provém do sistema da carótida externa, através de ramos da artéria maxilar, como são a artéria palatina superior, a pterigopalatina e a esfenopalatina que irrigam a maior parte das conchas e meatos e do sistema da carótida interna através de ramos da artéria oftálmica, como são as artérias

etmoidais, que irrigam a porção superior da parede externa. Estes dois sistemas arteriais apresentam múltiplas áreas de anastomose em cada fossa nasal e entre estas. Para a irrigação do vestíbulo das fossas nasais contribuem também ramos da artéria labial superior.

A drenagem venosa é assegurada pela veia esfenopalatina e pelas veias etmoidais e a drenagem linfática faz-se anteriormente para os gânglios submandibulares e posteriormente para os gânglios laterofaríngeos, retrofaríngeos e cervicais profundos.

A enervação das fossas nasais é sensorial pelo nervo olfativo, sensitiva, dependente do trigélio e vegetativa, proveniente da cadeia simpática cervical e da parassimpática (facial e glossofaríngeo) (*Standring, 2005; Rouvière e Delmas, 1984; Lund, 1997; Ruah e Ruah, 1998*).

Classicamente, identificam-se dois tipos de epitélio nas fossas nasais: o olfativo e o respiratório. No entanto, em adultos, considera-se como normal a presença de um epitélio pavimentoso, após processo de metaplasia do epitélio respiratório, na porção anterior dos cornetas inferiores. Este processo poderá estar associado ao efeito da corrente aérea sobre a mucosa e/ou às sequenciais agressões a que este epitélio é sujeito ao longo da vida (*Lund, 1997*).

A mucosa olfactiva ocupa 2 a 3 cm<sup>2</sup> na parede superior das fossas nasais insinuando-se para o septo e para o corneto superior e é constituída por um epitélio prismático pseudoestratificado ciliado, com três tipos de células (receptoras neurossensoriais, de sustentação e basais). A mucosa respiratória tem um epitélio com células ciliadas, células com microvilosidades, células caliciformes e células basais. Cada célula ciliada contém 150 a 200 cílios com cerca de 6 a 8 micra de comprimento e 0,3 de diâmetro. Cada cílio apresenta os característicos nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, unidos entre si. As células com microvilosidades, apresentam 300 a 400 destas evaginações que aumentam significativamente a superfície de trocas. As células caliciformes são cilíndricas, produtoras de glicoproteínas, que acumulam em grânulos de secreção. As células basais, de forma prismática triangular, são uma população de reserva capaz de originar todas as categorias celulares, atrás nomeadas.

É possível ainda identificar o epitélio do canal excretor das glândulas serosas, mucosas ou seromucosas. O epitélio está separado do córion por um fina membrana basal.

No córion descreve-se uma substância fundamental na qual se encontram células residentes (macrófagos, fibroblastos, mastócitos) e células móveis capazes de infiltrar

de forma transitória, como os linfócitos e os leucócitos polimorfonucleares. Encontram-se ainda focos de linfócitos e de plasmócitos correspondentes ao RALT (“Respiratory Associated Lymphoid Tissue”). A este nível identificam-se três sistemas vasculares com diferentes funções. Um circuito de troca representado pela microcirculação subepitelial e periglandular constituído por capilares fenestrados com esfínter précapilar, que permitem rápidas e volumosas transsudações de líquido, um circuito de capacitância representado pelos plexos cavernosos, e um circuito de resistência representado pelas anastomoses artériovenosas directas do córion profundo (Wayoff *et al.*, 1991).

## 2 - Anatomia das Fossas Nasais no Rato

O rato albino (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, que foi utilizado em estudos experimentais desta dissertação, é frequentemente empregue como modelo experimental em investigações da via aérea e particularmente das fossas nasais (Woutersen *et al.*, 1984).

As características anatómicas e fisiológicas da passagem do ar são semelhantes no Homem e nos restantes mamíferos, nomeadamente nos roedores. No rato, as duas cavidades, por onde circula o ar, estão separadas pelo septo nasal e têm uma área total de cerca de 3 cm<sup>2</sup>. A distância das narinas até à nasofaringe é proporcional ao tamanho da cabeça. No vestíbulo nasal, identificam-se cornetas atriais que deflectem o ar e retêm partículas grandes. Na parede externa das fossas nasais do rato encontram-se os cornetas maxilares (*concha nasalis dorsalis, media e ventralis*) e posteriormente os cornetas etmoidais (Reznik, 1990; Popesko *et al.*, 1992). Figura 1

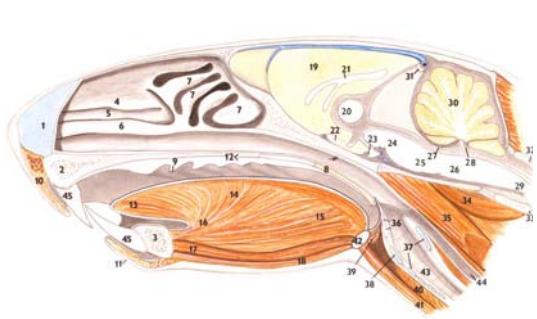


Fig. 1a - Corte sagital da cabeça do rato (6 – *concha nasalis ventralis*).

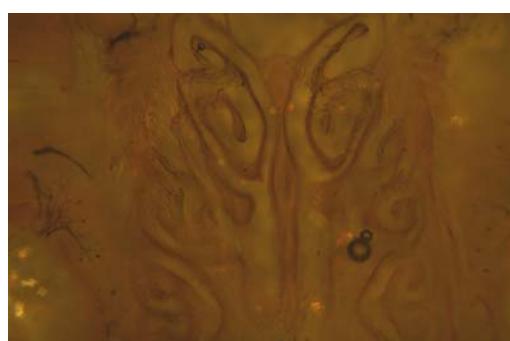


Fig. 1b - Corte coronal de cabeça diafanizada de rato (Cortesia do Prof. Dr. Pedro Oliveira).

Na mucosa nasal do rato identificam-se seis tipos de células: células caliciformes semelhantes às dos humanos, células basais, células ciliadas, células colunares não-ciliadas, células cubóides e “*brush cells*”. As células colunares não-ciliadas têm microvilosidades curtas e uma extensa rede de retículo endoplasmático liso no seu vértice. As células cubóides têm microvilosidades curtas, mas menos densas que nas colunares não-ciliadas. As “*brush cells*”, também denominadas “*tufted cells*” ou “*caveolated cells*” (Höfer e Drenckhanh, 1996), são piriformes com uma base larga adjacente à membrana basal e apresentam extensas microvilosidades na sua superfície (Reznik, 1990).

### **3 - Fisiologia da Mucosa Nasal**

Entre as funções desempenhadas pelas fossas nasais incluem-se a olfactiva, a respiratória e a imunitária. A função olfactiva, enquanto sensorial, promove o reconhecimento de partículas pelo epitélio e a activação de uma transdução eléctrica para o sistema nervoso central. Na função respiratória as fossas nasais conseguem aquecer, filtrar, humidificar e regular o débito do ar inspirado. A respiração nasal prepara, desta forma, o ar para que a via aérea inferior cumpra eficazmente a sua função. O aquecimento do ar resulta de uma transferência de calor das anastomoses directas presentes no córion profundo que estão permanentemente a 37°C, segundo a equação:

$$Q = Hc (Ta-Tm)$$

Q – Fluxo calórico por unidade de superfície em cal/s/cm<sup>2</sup>.

Hc – Coeficiente de transferência calórica em cal/cm<sup>2</sup>/s/°C.

Ta-Tm – Gradiente de temperatura entre as paredes da fossa nasal e o ar inspirado.

A filtração do ar resulta da presença do muco, com as suas propriedades adesivas e da mudança do fluxo aéreo de laminar a turbilhonar, devido às características anatómicas da parede externa das fossas nasais, aumentando desta forma a superfície de contacto.

A humidificação do ar faz-se por convecção e difusão molecular, uma vez que o ar entra em contacto directo com o muco, o qual contém 95% de água, segundo a equação:

$$N = Kc (Ca-Cm)$$

N – Fluxo da massa de ar por unidade de superfície em mol/s/cm<sup>2</sup>.

Kc – Coeficiente de transferência de massa.

Ca-Cm – Gradiente de concentração de moléculas envolvidas na transferência entre o ar inspirado e a interface mucosa-ar.

A regulação do débito aéreo depende do sistema nervoso vegetativo, segundo uma alternância de congestão e descongestionamento dos plexos cavernosos em oposição de fase em cada fossa nasal, mantendo a resistência total próxima de um valor constante, denominada ciclo nasal, definido desde 1895 por Kaiser (*Proctor e Andersen, 1982*). Este ciclo nasal identifica-se em 80% dos adultos saudáveis e tem uma duração de 3 a 4 horas (*Wayoff et al., 1991*).

#### **4 – Factores Moduladores de Respostas da Mucosa Nasal**

Podem-se dividir em físicos e químicos os factores que afectam e promovem respostas da mucosa nasal. Entre os factores físicos encontram-se a pressão atmosférica, a temperatura ambiente e a humidade atmosférica. Quanto aos factores químicos, as agressões ao nariz e à via respiratória, em geral, estão indelevelmente associadas desde o século XIX à revolução industrial que era baseada na capacidade energética da queima do carvão e consequente inalação de produtos da sua combustão.

Ao longo do tempo as substâncias inaladas accidentalmente, na comunidade, em ambiente laboral, com objectivo recreativo ou com fins terapêuticos, têm crescente repercussão clínica. Neste contexto o fumo do tabaco é o principal factor de risco quando consideramos a patologia maligna desta região anatómica. Outros, porém, têm que ser valorizados, como o níquel, crómio, aldeídos, e as madeiras quer com o componente físico pela pequena dimensão das partículas de corte (1 a 10 micra) quer pelo componente químico atribuído aos taninos. Estes factores, classicamente ligados ao adenocarcinoma etmoidal, estão hoje também ligados aos carcinomas pavimento-celulares naso-sinusais (*Simon et al., 1997*).

Desta grande quantidade de factores seleccionámos alguns que, pelo contexto comunitário da sua utilização ou pela pertinência médico-naval, assumem particular importância.

#### **4.1. - Fármacos de aplicação tópica nasal**

O nariz é também sede da aplicação de fármacos. Com objectivo terapêutico local destacam-se os corticosteróides, anti-histamínicos e descongestionantes nasais. Com fins recreativos são empregues o tabaco, a *cannabis* ou a cocaína. Com um objectivo de acção sistémica utiliza-se, por exemplo, a calcitonina. Em fase experimental, destaca-se a utilização da via nasal para obtenção de efeitos centrais como, por exemplo, com a insulina (*Haruta et al., 2003; Owens et al., 2003; Turker et al., 2004*), os neuropéptidos e outras moléculas de grande peso molecular usadas no tratamento da Doença de Parkinson ou de Alzheimer (*Illum, 2004*) e a cafeína (*Sacchetti et al., 2002*). A via nasal permite obviar o efeito de primeira passagem hepática dos fármacos, graças às particularidades da via olfactiva (*Illum, 2004*). Esta previsível maior utilização do nariz, enquanto via de administração de fármacos, desperta curiosidade em saber como será a reacção da mucosa à presença frequente de moléculas estranhas.

Seleccionámos o Furoato de Mometasona (FM), a Azelastina (AZ) e a Calcitonina de Salmão (CS) para avaliar os efeitos produzidos pelos fármacos, em geral, sobre a mucosa nasal. A escolha destes fármacos deveu-se ao facto de serem bons exemplos do seu grupo terapêutico e à grande frequência com que são prescritos em Portugal e no mundo. O FM ( $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$ ; massa molecular 539,45 g/mol) é um corticóide com acção anti-inflamatória na pele, nariz e pulmão. A nível nasal utiliza-se na rinite persistente e intermitente.

A AZ ( $C_{22}H_{24}ClN_3O$ ; massa molecular 381.898 g/mol) é um anti-histamínico  $H_1$  de aplicação tópica nasal para controlo da sintomatologia da rinite de tipo alérgico.

A CS ( $C_{145}H_{240}N_{44}O_{48}S_2$ , massa molecular 3431.85 g/mol) é um polipéptido sintético que coopera com a hormona paratiroideia no controlo homeostático do cálcio e, por esse motivo, é empregue em doentes com osteoporose, particularmente em mulheres após a instalação da menopausa. Figura 2

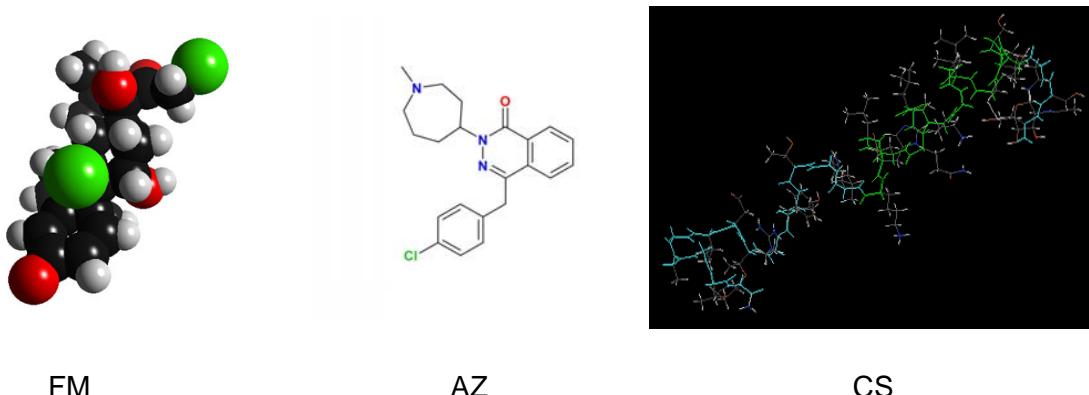


Fig. 2 - Esquemas moleculares do FM, AZ e CS.

O oxigénio foi descoberto em trabalhos separados realizados pelo farmacêutico sueco Karl W. Scheele e pelo químico amador inglês Joseph Priestley, em 1772 (*Priestley, 1923*). É o oitavo elemento da tabela periódica, fazendo parte do grupo VI e o seu isótopo mais comum é o  $^{16}\text{O}$ . Surge na natureza na fórmula molecular de  $\text{O}_2$  ou  $\text{O}_3$ . Depois de inspirado, processa-se a hematose a nível alveolar e atinge a circulação sanguínea. É transportado até aos tecidos ligado à hemoglobina e 90% do consumo de oxigénio ocorre nas mitocôndrias.

A hiperoxia é uma preocupação constante nas actividades de mergulho, no manuseio terapêutico de câmaras hiperbáricas, em recém-nascidos prematuros com suplemento de oxigénio, em doentes com ventilação assistida e em astronautas. Considera-se existir risco de toxicidade pulmonar quando a exposição é superior a 16–24 horas, em concentrações de oxigénio superiores a 50%. Esta hiperoxia crónica está relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de displasia broncopulmonar em crianças e à síndrome de stress respiratório agudo do adulto. O mecanismo fisiopatológico subjacente poderá basear-se na acumulação de formas reactivas de oxigénio que conduzem a um stress oxidativo e consequente dano tecidual. O dano imposto pelo stress oxidativo verifica-se ao nível dos fosfolípidos das membranas celulares e no ADN das células. O resultado final, com repercussão clínica, é o desenvolvimento de um processo de atelectasia alveolar (*Demchenko et al., 2007*). A relação entre a hiperoxia e o dano pulmonar foi apoiada em trabalhos com ratos nascidos pré-termo, sujeitos a hiperoxia, na tentativa de estabelecer um modelo animal para o estudo da displasia broncopulmonar (*Xu et al., 1998*).

Por outro lado, a hipóxia crónica está associada ao desenvolvimento de fibrose pulmonar e de hipertensão pulmonar por provável fibrose da parede dos vasos (*Steinke et al., 2008*).

#### **4.2. - Efeitos da pressão atmosférica na via aérea**

As principais situações disbáricas, encontradas na vida do dia-a-dia, são as deslocações em transporte terrestre em diferentes altitudes, as viagens de avião, o mergulho recreativo e profissional, a ventilação mecânica, o trabalho ou lazer em altitude ou nas minas e o trabalho ou tratamento em câmaras hipo ou hiperbáricas. Em meio militar naval destacam-se as missões envolvendo submarinos, navios pressurizados, mergulho, pára-quedismo e voo em aeronaves não-pressurizadas.

O aumento da pressão atmosférica constitui um estímulo mecânico sobre os tecidos. Na via aérea é conhecido um efeito de diminuição do transporte mucociliar em situações de oscilação de 16 Hz e diferenças de pressão de 200 mmHg (*Deitmer e Muller, 1998*). Em doentes tratados com CPAP por períodos muito longos (média de 6737 horas), as biopsias nasais demonstraram uma metaplasia pavimentosa e uma infiltração de células arredondadas no córion (*Schroeter et al., 2004*). Num modelo de CPAP, aplicado a ratos durante cinco horas a 10 cmH<sub>2</sub>O, verificou-se uma resposta inflamatória da mucosa nasal com infiltração de PMN, mediada pela proteína inflamatória dos macrófagos (MIP-2) que é um análogo da interleucina 8, um potente estimulador dos neutrófilos (*Almendros et al., 2008*).

Para além do estímulo mecânico, o aumento da pressão atmosférica está associado a alterações dos gases respirados. Consideremos a equação do gás alveolar:

$$\text{PAPO}_2 = \text{PIPO}_2 - \frac{\text{PACO}_2}{\text{R}} + \frac{\text{PACO}_2 \times (1 - \text{R}) \times \text{FIO}_2}{\text{R}}$$

PAO<sub>2</sub> - Pressão parcial alveolar de O<sub>2</sub> (mmHg)

PIO<sub>2</sub> - Pressão parcial inspiratória de O<sub>2</sub> (mmHg)

PACO<sub>2</sub> - Pressão parcial alveolar de CO<sub>2</sub> (mmHg)

R - Quociente respiratório (CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub>)

FIO<sub>2</sub> - Fracção de O<sub>2</sub> no gás inspirado seco

Verificamos que uma hipoventilação significativa durante a respiração de ar em ambiente hiperbárico, não conduz à hipoxia. Isto deve-se a que a inspiração de uma fracção constante de O<sub>2</sub> conduz a um aumento da PO<sub>2</sub> proporcional à pressão. O principal problema da hipoventilação em ambiente hiperbárico é a hipercapnia (Weslau, 2006).

## 5 – A Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB)

A mais antiga intervenção terapêutica documentada na área da Rinologia data de cerca de 3500 a.C. pelo egípcio Sekhet'enanch, médico de Sahura, (Figura 3) um dos faraós da V dinastia em cujo túmulo está esculpida a imagem do médico e da sua família, com a legenda: “E ele curou as fossas nasais do rei” (Clode, 2003).



Fig. 3 - Faraó Sahura (escultura pequena) (Metropolitan Art Museum – Nova Iorque).

Em Portugal as primeiras referências à Otorrinolaringologia publicadas, atribuem-se a João Curvo Semmedo (Figura 4) no século XVII, no livro “Observações médicas doutrinais de cem casos gravíssimos” (Clode, 2003). É também durante este século que começam as primeiras experiências com o hiperbarismo, já com um objectivo terapêutico.

Pela cada vez maior importância clínica e à possibilidade do estabelecimento de um modelo de estudo, seleccionámos as situações hiperbáricas associadas à inalação de oxigénio a 100%.

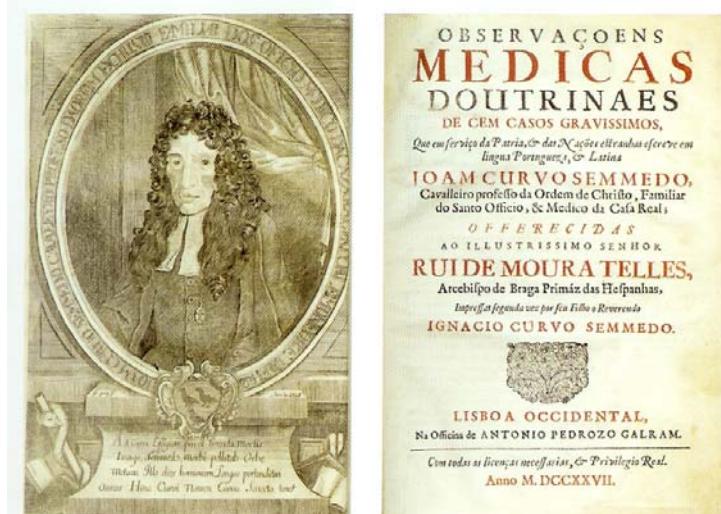


Fig. 4 - João Curvo Semmedo e o seu livro “Observações médicas doutrinais de cem casos gravíssimos”.

Este tratamento desenvolveu-se na Europa durante o século XIX e na América do Norte no século XX, com alguns exageros e desadequação nas indicações clínicas o que descredibilizou a OHB, levando à necessidade do estabelecimento de sociedades científicas que produzissem conhecimento na área, enumerassem indicações terapêuticas, modalidades de tratamento, contra-indicações e identificassem os eventos adversos. Sem controvérsia esteve a sua aplicação ao tratamento da síndrome de descompressão e das intoxicações por monóxido de carbono, nas quais as vantagens são óbvias e imediatas.

Em Portugal a primeira câmara hiperbárica foi instalada em 1953 na Escola de Mergulhadores da Esquadilha de Submarinos da Marinha de Guerra e funcionava só a ar. A primeira câmara, com possibilidade de pressurização a oxigénio, foi instalada em 1968 e a primeira câmara de grandes dimensões, aberta à comunidade civil, foi instalada em 1989 nas instalações do Hospital da Marinha. Actualmente, o país dispõe de quatro centros hiperbáricos: Lisboa (Hospital da Marinha), Matosinhos (Hospital Pedro Hispano), Açores (Hospital da Horta) e Madeira (Hospital Central do Funchal).

O Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha dispõe actualmente de duas câmaras unidas entre si, permitindo o tratamento simultâneo de vinte e seis doentes. Está operacional para responder às situações urgentes durante vinte e quatro horas por dia e cumpre duas ou três sessões de tratamento diário. Este centro permite o tratamento de doentes acamados, podendo o oxigénio ser inalado por máscara oro-facial, tenda cefálica, cânula de traqueotomia ou tubo de ventilação oro ou nasotraqueal. Com 479 doentes tratados em 2007 e 3751 desde a sua fundação, é o centro com maior experiência em Portugal.

Os fundamentos da aplicação clínica da OHB baseiam-se na quantidade de oxigénio dissolvido no plasma. Se, ao nível do mar, respirarmos ar com cerca de 21% de O<sub>2</sub>, então 100 ml de sangue transportam 19 ml de O<sub>2</sub> associado à hemoglobina (Hb) e 0,32 ml dissolvidos no plasma.

Se, em vez de ar, respirarmos O<sub>2</sub> a 100%, os mesmos 100 ml de sangue transportam 20 ml de O<sub>2</sub> associado à Hb e 2,09 ml dissolvidos no plasma. Quando se aumenta a pressão atmosférica para as 2,5 Atmosferas (ATA), ao respirarmos O<sub>2</sub> a 100%, 100 ml de sangue transportam 20 ml de O<sub>2</sub> associado à Hb e 5,62 ml dissolvidos no plasma (*Roque, 2001*).

Para além das indicações urgentes, já referidas, existem outras indicações aprovadas pela “Undersea and Hyperbaric Medical Society”, das quais se destacam a gangrena gasosa, as feridas com dificuldade de cicatrização, particularmente em diabéticos, a cistite rácica e as infecções de difícil resposta aos agentes antimicrobianos, como as osteomielites. As indicações, para o tratamento hiperbárico, dividem-se em três categorias segundo o “European Committee for Hyperbaric Medicine”, conforme consensos estabelecidos seguindo a medicina baseada na evidência:

Tipo 1 - Corresponde às situações em que o prognóstico vital é positivamente influenciado.

Tipo 2 - Aplica-se a situações em que a transferência para um Centro Hiperbárico é recomendável mas não vital.

Tipo 3 - A transferência para um Centro Hiperbárico é facultativa e encarada como medida de suporte à terapêutica principal.

As indicações são consensuais nas sociedades científicas europeia e americana, com excepção à surdez neurosensorial súbita, que não é aceite nos Estados Unidos da América e da anemia por hemorragia, que não é aceite na Europa (*Wattel e Mathieu,*

2006). Existem apenas duas contra-indicações absolutas para o tratamento com OHB, que são a claustrofobia e o pneumotórax não tratado (*Kindwall*, 1995). Consideram-se, como contra-indicações absolutas adicionais, o tratamento com doxorrubicina, cisplatina, disulfiram e com acetato de mafenida.

As contra-indicações relativas são a infecção do tracto respiratório superior e ouvido, febre alta, patologia convulsiva, enfisema com retenção de CO<sub>2</sub>, antecedentes pessoais de patologia oncológica, antecedentes pessoais de cirurgia torácica, gravidez, esferocitose congénita ou anemia falciforme, São contra-indicações adicionais a hipertensão arterial, asma aguda, diabetes descompensada, crianças com retinopatia da prematuridade, displasia broncopulmonar ou patologia cardíaca congénita. As principais complicações clínicas com a OHB são a odontalgia e as do foro otorrinolaringológico, com dificuldades de equalização da pressão nos ouvidos médios e nos seios perinasais, traduzidos por dor e desconforto (*Ambiru et al.*, 2008).

A investigação básica dos efeitos da OHB tem crescido muito nos últimos anos permitindo por isso alargar as indicações reconhecidas e também as contra-indicações pois conhece-se melhor a acção, quer da pressão, quer do oxigénio.

Para investigar com recurso a animais de pequeno porte é necessário dispor de uma câmara que permita pressurização com ar e com oxigénio. As propriedades comburentes do oxigénio e os riscos associados ao seu manuseio em ambiente hiperbárico, exigem que o material utilizado seja submetido a controlo de qualidade e manutenção periódica. Aproveitando os conhecimentos e a experiência do Arsenal do Alfeite na construção e reparação naval, particularmente dos submarinos, o Hospital da Marinha solicitou ao Arsenal do Alfeite a construção de uma câmara hiperbárica que suportasse quatro gaiolas de animais de pequeno porte. Este projecto (Figura 5) e a sua execução foram atribuídas à IRS (Inspecção da Reparação de Submarinos) que o fez com prioridade total às questões de segurança. A câmara foi testada e certificada para pressurização a ar e a oxigénio, tendo os engenheiros envolvidos acompanhado o projecto desde o desenho até à utilização quotidiana da câmara. Este dispositivo é de importância significativa pois o modelo de utilização de ratos em investigação hiperbárica já está estabelecido noutras órgãos (*Lahat et al.*, 1995).

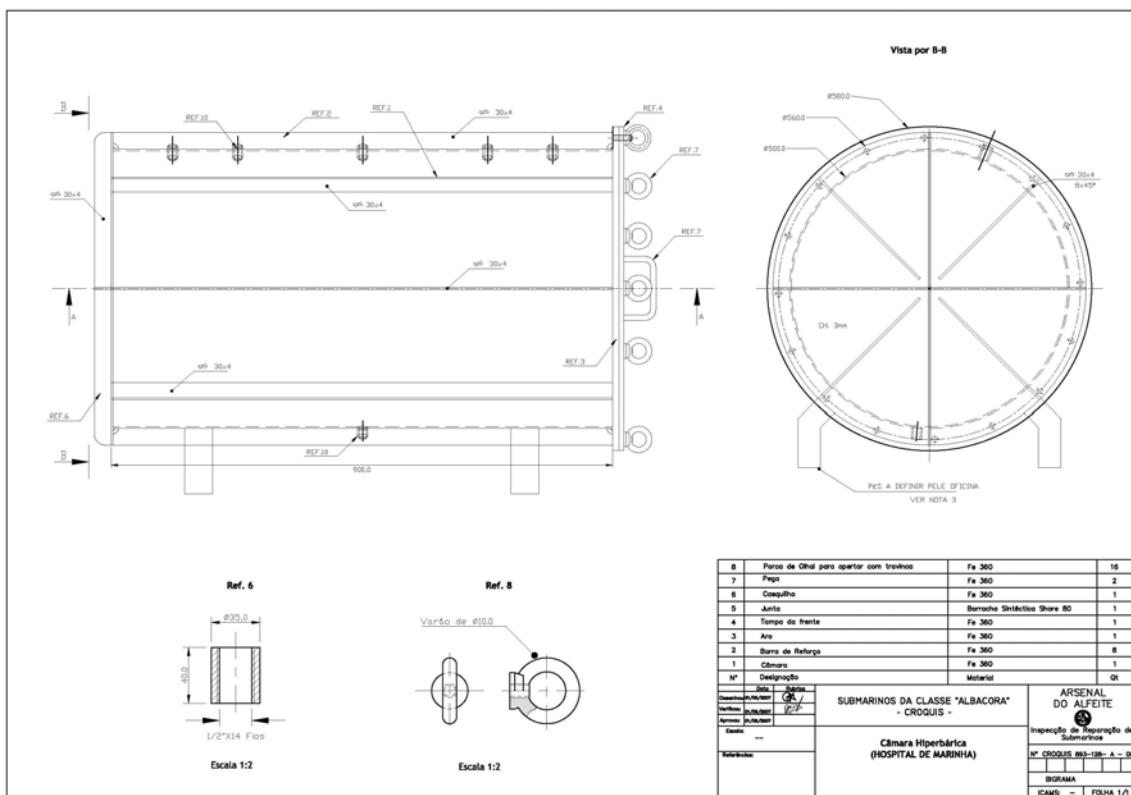


Fig.5 - Projecto da câmara hiperbárica experimental.

### Efeitos da OHB na Via Aérea

Existem poucos estudos sobre os efeitos da OHB nas fossas nasais, faringe, laringe e traqueia. Nesta última sabe-se que há um aumento da exsudação plasmática durante a OHB (*Bernareggi et al., 1999*), mas não são conhecidos estudos morfológicos sobre este tema. A maior parte da informação disponível aborda os efeitos da OHB no pulmão.

Em pressões de uso terapêutico (2 a 4 ATA), verificaram-se alterações histológicas pulmonares com edema, congestão e hemorragia intra-alveolar. Estas alterações são substancialmente diferentes das observadas em animais expostos a hiperóxia normobárica. Verificou-se também que este padrão histológico era mais evidente em ratos, que também exibiram convulsões, e que era potenciado pelo óxido nítrico exigindo uma integridade da inervação autónoma entre o cérebro e o pulmão (*Demchenko et al., 2007*).

A toxicidade do oxigénio encontra-se estudada em animais ou seres humanos saudáveis, sendo pouca a informação em indivíduos doentes. Esta toxicidade não se deve à molécula de oxigénio, mas aos radicais livres de oxigénio formados pela adição de electrões em reacções de redução. Quando a sua remoção catalizada por enzimas, como a superóxido dismutase é insuficiente, há uma acumulação de radicais livres de oxigénio e a consequente lesão. A nível celular os principais alvos são as proteínas, as enzimas e os ácidos nucleicos, valorizando-se ainda a lesão lipídica, particularmente sobre a membrana celular. Na toxicidade pulmonar descrevem-se duas fases:

- Fase exsudativa aguda.
- Fase proliferativa.

Na fase exsudativa aguda verifica-se um sequestro de plaquetas e de neutrófilos na microcirculação pulmonar, aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial. Com a persistência do estímulo evolui-se para a destruição das células endoteliais, edema intersticial, intra-alveolar e peribrônquico, hemorragia intra-alveolar, deposição de fibrina, formação de membranas hialinas e destruição das células alveolares tipo I.

A fase proliferativa corresponde à cicatrização da fase exsudativa. Assim, verifica-se uma proliferação de células tipo II e fibroblastos que podem induzir fibrose, com extensos depósitos de colagénio. Há também uma regeneração dos capilares e uma proliferação de células secretoras não-ciliadas (células de Clara) no epitélio dos brônquios terminais. Quanto à função pulmonar, o principal parâmetro afectado neste contexto é a capacidade vital (*Bitterman e Bitterman, 2006*).

## **6 - Hipótese**

O objectivo terapêutico fundamental do aumento da pressão atmosférica, em indivíduos a respirar oxigénio a 100%, é o de aumentar o oxigénio dissolvido, disponível para os tecidos. O primeiro órgão a lidar com este excesso de oxigénio é o nariz. É também o nariz o primeiro órgão a receber múltiplas partículas, fármacos e gases.

Estas substâncias, que chegam ao nariz e à restante via aérea, promovem uma resposta que está melhor documentada no pulmão do que na mucosa nasal.

Baseados nesta revisão, na vivência clínica diária num Hospital Naval, que até há pouco tempo detinha a exclusividade do tratamento por OHB, em Portugal, e a treze anos de trabalho na área da Otorrinolaringologia com especial apreço pela Rinologia, ficámos motivados para o estudo anátomo-clínico das fossas nasais em situações de agressão.

Colocamos assim a hipótese da exposição do nariz a fármacos, como o oxigénio, o FM, a AZ e a CS, não ser inócua para a mucosa nasal. Quanto ao oxigénio, particularizamos a situação em que este é administrado a 100%, em ambiente hiperbárico, com o objectivo de aumentar a sua pressão parcial. Se a administração destes fármacos não for inócua para a estrutura da mucosa nasal, então, numa avaliação histológica com microscopia óptica ou ultraestrutural com microscopia electrónica, encontrar-se-ão evidências desse efeito.

A mucosa nasal tem sido objecto de estudo para os efeitos da poluição atmosférica, particularmente do ozono e do tabaco. No entanto, as substâncias que seleccionámos, que são substâncias de uso clínico corrente, têm sido mais estudadas do ponto de vista farmacodinâmico do que farmacocinético. Sabemos que são úteis e eficazes no seu objectivo terapêutico, mas não sabemos se alteram algum parâmetro da microanatomia nasal. Na OHB, como o efeito terapêutico pretendido não é na mucosa nasal, tem importância avaliar se a passagem do oxigénio pelas fossas nasais é acompanhado por algum efeito identificável. Por ser uma modalidade terapêutica com mais estudos clínicos do que estudos em ciências básicas, a motivação para esta investigação é potenciada.

Considerando que a apresentação de substâncias estranhas ao nariz é uma “agressão”, justifica-se a realização um estudo prospectivo sobre os efeitos destes factores na estrutura da mucosa respiratória nasal.

## **7 – Objectivos**

Esta dissertação teve como objectivo a caracterização clínica e morfológica da resposta da mucosa nasal a várias terapias que utilizam a via respiratória, nomeadamente a OHB e a inalação de fármacos de absorção transnasal (como o FM, AZ ou a CS).

Como questões parcelares, que foram investigadas nesta tese, listamos as seguintes:

- 1 – O tratamento crónico por OHB altera a microanatomia da mucosa nasal humana?
- 2- O tratamento crónico por OHB altera nos humanos a sua função nasal, avaliada pelo “pico inspiratório nasal”?
- 3 – O tratamento, com fármacos de aplicação corrente intranasal, como o FM, AZ ou a CS, provoca alterações morfológicas a curto prazo na mucosa respiratória nasal humana?
- 4 – O tratamento experimental de roedores, com OHB aguda ou crónica, provoca alterações microanatómicas da sua mucosa nasal?



## **RESULTADOS**

- 1 - Aplicações actuais da oxigenoterapia hiperbárica em Otorrinolaringologia
- 2 - Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration
- 3 - Chronic hyperbaric oxygen therapy causes only minor ultrastructural changes in the human nasal epithelium
- 4 - Structure of the rat nasal mucosa after acute and chronic hyperbaric oxygen therapy
- 5 - Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin
- 6 - Hyperbaric oxygen improves nasal air flow

## **1 - Aplicações actuais da oxigenoterapia hiperbárica em Otorrinolaringologia**

# APLICAÇÕES ACTUAIS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA EM OTORRINOLARINGOLOGIA

Paulo Vera-Cruz<sup>1</sup>; Sara Baptista<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital da Marinha, Lisboa.

## Resumo

A oxigenoterapia hiperbárica é uma forma de tratamento de diversas patologias que tem vindo a ser cada vez mais utilizada. Porque o nível de conhecimentos nesta área tem aumentado rapidamente, temos como objectivo com este trabalho sumarizar as indicações actuais no foro otorrinolaringológico. Descrevem-se alguns passos históricos relevantes e enumeram-se os fundamentos teóricos desta técnica. Destaca-se o aumento significativo da quantidade de oxigénio dissolvido no plasma que assim se obtém.

As principais indicações surgem no tratamento das complicações da radioterapia: Osteoradiacionecrose da mandíbula e do maxilar superior, a Osteocondroradiacionecrose laríngea e a Condroradiacionecrose traqueal. Nas dificuldades pós-operatórias na vascularização de retalhos e enxertos, também se obtêm bons resultados. No tratamento da surdez neurosensorial súbita existe uma longa experiência com resultados positivos mesmo após falência de outros métodos terapêuticos.

Enunciam-se as principais contra-indicações ao tratamento por oxigenoterapia hiperbárica.

**Palavras chave:** Oxigénio hiperbárico, Câmara, Indicações, Contra-indicações.

## Abstract

Hyperbaric oxygen therapy is a form of treatment for various pathologies that has come to be used ever more frequently. Given the fact that the level of knowledge in this area has grown rapidly, this paper has the objective of summarizing its present indications in otorhinolaryngology. We discuss some relevant historic steps and name the theoretical fundamentals of this technique. Highlighting the significant increase of dissolved oxygen in plasma that is obtained.

The principal indications are revealed in the treatment of radiotherapy complications: Osteoradiation necrosis of the mandible and of the maxilla, laryngeal Osteocondroradiation necrosis and tracheal Condroradiation necrosis. Good results are also accomplished in post-operative difficulties with vascularization of surgical patches and grafts. In the treatment of sudden sensorineural deafness there is a long experience with positive results, even after the use of other non-effective therapeutic methods. The

main contraindications for hyperbaric oxygen therapy are discussed.

**Key-words:** Oxygen, Hyperbaric, Chamber, Indications, Contraindications.

## Introdução

### Perspectiva histórica

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) tem aplicações em diversas patologias e a sua utilização tem vindo a crescer nos países ocidentais nas últimas décadas. A história subjacente a este método de tratamento é rica em avanços e retrocessos relacionados ora com entusiasmos pelos bons resultados, ora pela falta de bases científicas sólidas.

Durante o século XVI, Leonardo da Vinci desenhou diversos vasos para mergulho mas nunca chegou a aplicar a sua invenção. Em 1620 o inventor holandês Cornelius Drebbel construiu o primeiro sino de mergulho, que podia ser pressurizado a 1 atmosfera, mas não tinha oxigénio suplementar. Em 1691, Edmund Halley (padrinho do cometa) desenvolveu um sistema de abastecimento de ar para os sinos de mergulho. A primeira aplicação clínica da câmara hiperbárica foi realizada em 1662, por Henshaw, para o tratamento de patologia pulmonar, numa câmara a que chamou *Domicilium*<sup>1</sup>. Durante o século XIX verificou-se um grande desenvolvimento do hiperbarismo em França, com os trabalhos de Junod<sup>2</sup> (1834), Pravaz e Tabarie<sup>3,4</sup> (1837) com a maior câmara hiperbárica da época e com Fontaine<sup>5</sup> (1877) que construiu a primeira câmara hiperbárica móvel. Para além do uso terapêutico, as câmaras hiperbáricas tiveram também uma utilização semelhante aos “spa” da actualidade e eram frequentadas pela alta sociedade europeia, por exemplo em Estocolmo, Londres, Copenhaga, Moscovo, Viena, Odessa, Munique, etc. A primeira câmara hiperbárica instalada na América do Norte foi em Oshawa – Canadá<sup>6</sup>. Em 1927 foi construída em Cleveland a maior câmara hiperbárica de sempre (“Steel Ball Hospital”) com 6 andares e 72 quartos. Ao fim de 10 anos foi desmantelada por falta de bases científicas, por ordem da American Medical Association. Neste combate ao charlatanismo associado ao hiperbarismo, teve grande importância Paul-Bert que em 1878 sistematizou as bases teóricas



Fig. 1 Símbolo do Hospital da Marinha.

físicas e fisiológicas do hiperbarismo<sup>7</sup>, estudou os efeitos tóxicos do oxigénio nas altas pressões sobre o sistema nervoso e recomendou a aplicação de oxigénio normobárico no tratamento da doença de descompressão. Na avaliação dos efeitos tóxicos do oxigénio destacaram-se também Lorraine e Smith<sup>8</sup> que em 1899 demonstraram a toxicidade pulmonar com a inalação de oxigénio a baixa pressão, por longos períodos.

A pressurização com oxigénio fez-se pela primeira vez em 1937 por Behnke e Shaw<sup>9</sup> para o tratamento do síndrome de descompressão depois de Haldane<sup>10</sup> ter preconizado a sua aplicação nas intoxicações por monóxido de carbono em 1895.

Em Portugal, a primeira câmara hiperbárica foi instalada em 1953, na Escola de Mergulhadores da Marinha e funcionava a ar. Só em 1968 se iniciou a OHB e só em 1989 foi instalada uma câmara no Hospital da Marinha com maior capacidade de realização de tratamentos.<sup>11</sup>

Apesar de corresponder a cerca de 21% do ar que respiramos, o oxigénio ( $O_2$ ) só foi descoberto em trabalhos separados pelo farmacêutico sueco Karl W. Scheele, em 1772, e pelo químico amador inglês Joseph Priestley<sup>12</sup> em 1774, através do aquecimento intenso de óxido de mercúrio. A primeira aplicação clínica do oxigénio remonta a 1783, por Caillens, num caso de tuberculose. Durante o século XIX e início do século XX foram descobertas múltiplas aplicações clínicas do oxigénio bem como as manifestações da sua toxicidade, já referidas.

A utilização do oxigénio em condições de alta pressão, permite que este chegue às células em maior quantidade evitando, desse modo, a sua apoptose e promovendo a reabilitação dos tecidos.

Na actualidade existem câmaras hiperbáricas para fins terapêuticos com capacidade de tratamento simultâ-



Fig. 2 Câmara hiperbárica para animais de pequeno porte.

neo de vários doentes (como aquela instalada no Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha) ou monolugar (que são embarcadas em navios com missões associadas ao mergulho).

A fundamentação científica para a utilização clínica da oxigenoterapia hiperbárica no século XXI já não pode assentar em simples verificações de efeitos benéficos mas carece de fortes bases de documentação científica dos seus benefícios e eventuais riscos e eventos adversos. A investigação clínica sistemática, o registo de dados, a tentativa de aplicação noutras patologias e a sedimentação dos protocolos aplicados, são fundamentais em Medicina. Mas ao queremos evoluir e credibilizar este tratamento, é fundamental sujeitar a oxigenoterapia hiperbárica ao mesmo rigor que aplicamos a qualquer intervenção médica, muito particularmente no que diz respeito aos medicamentos, uma vez que o oxigénio se encontra classificado como tal. Para o desenvolvimento de um medicamento, de uma técnica ou de um procedimento cirúrgico, começa-se pela investigação animal. Esse passo tem sido dado de forma gradual também com a colaboração do Serviço de Otorrinolaringologia (ORL) do Hospital da Marinha (Fig. 1). Para o efeito foi construída uma câmara hiperbárica para investigação, que pode ser pressurizada com ar ou com oxigénio, com capacidade para animais de pequeno porte. (Fig. 2)

## Fundamentos da OHB

Se ao nível do mar respirarmos ar com cerca de 21% de  $O_2$  então 100 ml de sangue transportam 19 ml de  $O_2$  associado à Hemoglobina (Hb) e 0,32 ml dissolvidos no plasma.

Se em vez de ar, respirarmos  $O_2$  a 100% os mesmos 100 ml de sangue transportam 20 ml de  $O_2$  associado à Hb e 2,09 ml dissolvidos no plasma. Quando se aumenta a pressão atmosférica para as 2,5 Atmosferas, ao respirarmos  $O_2$  a 100%, 100 ml de sangue transportam 20 ml de  $O_2$  associado à Hb e



**Fig. 3** Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha.



**Fig. 4** Diferentes formas de administração do oxigénio.

5,62 ml dissolvidos no plasma.<sup>11</sup> Deste modo, o O<sub>2</sub> dissolvido no plasma corresponde às necessidades dos tecidos sem a contribuição do O<sub>2</sub> associado à Hb. A elevação da pressão atmosférica para as 2, 5 Atmosferas tem que ser feita com toda a segurança e rigoroso critério de admissão em câmaras hiperbáricas. Em conclusão, nestas condições o oxigénio dissolvido no plasma passa de 0,32 para 5,62 ml, podendo ser imediatamente consumido pelos tecidos.

### Contra-indicações da OHB

As contra-indicações estabelecidas para o tratamento com OHB variam conforme os centros. No entanto, existe um certo consenso para a maioria das contra-indicações, com a necessária ponderação caso a caso, conforme o diagnóstico do doente. A determinação destas contra-indicações, atende ao risco das complicações da toxicidade do oxigénio, particularmente na patologia convulsiva.

Existem apenas duas contra-indicações absolutas para o tratamento com OHB que são a claustrofobia e o pneumotórax não tratado<sup>13</sup>. Consideram-se como contra-indicações absolutas adicionais o tratamento com doxorrubicina, cisplatina, disulfiram e com Acetato de Mafenida.

As contra-indicações relativas são:

- Infecção do trato respiratório superior e ouvido
- Febre alta
- Patologia convulsiva
- Enfisema com retenção de CO<sub>2</sub>
- Antecedentes pessoais de patologia oncológica
- Antecedentes pessoais de cirurgia torácica
- Gravidez
- Esferocitose congénita
- Anemia falciforme

São contra-indicações adicionais:

- Hipertensão arterial
- Asma aguda
- Diabetes descompensada
- Crianças com retinopatia da prematuridade, displasia bronco-pulmonar ou patologia cardíaca congénita.

### Objectivo

Pretende-se descrever a oxigenoterapia hiperbárica como um método de tratamento com aplicações clínicas crescentes, também no foro otorrinolaringológico, enunciando essas indicações e resumindo alguns resultados do Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha – Lisboa, no tratamento da surdez neurosensorial súbita.

### Material e Métodos

Revisão bibliográfica das aplicações da OHB em patologia do foro ORL em diversos centros. Consulta dos processos clínicos de doentes com patologia otorrinolaringológica, tratados no Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha – Lisboa, entre 2005 e 2007.

### Aplicações da OHB em ORL

O European Committee for Hyperbaric Medicine sistematiza as indicações da OHB em três tipos, conforme consensos estabelecidos segundo a medicina baseada na evidência:

Tipo 1 - Corresponde às situações em que o prognóstico vital é positivamente influenciado.

Tipo 2 - Aplica-se a situações em que a transferência para um Centro Hiperbárico é recomendável mas não vital.

Tipo 3 - A transferência para um Centro Hiperbárico é facultativa e encarada como medida de suporte à terapêutica principal.

A capacidade nacional para tratamentos hiperbáricos distribui-se por Lisboa (Hospital da Marinha – 26 lugares) (Fig. 3), Matosinhos (Hospital de Pedro Hispano – 16 lugares e Açores (Hospital da Horta – 4 lugares).

**TABELA 1: Distribuição de consultas e tratamentos por surdez súbita entre 2005 e 2007**

2005	2006	2007			
Consultados	Tratados	Consultados	Tratados	Consultados	Tratados
146	131	167	144	156	127

Para além destas câmaras instadas em unidades de saúde, existem ainda mais três câmaras (2 monolugar e uma com capacidade para quatro doentes) que a Marinha usa no apoio às actividades de mergulho e as das instituições privadas.

A administração do oxigénio pode ser feita por máscara nasal, por cânula de traqueotomia, por tubo oro ou nasoatraqueal ou ainda através de uma tenda cefálica, por exemplo em doentes com patologia da face. (Fig. 4)

Quanto às aplicações actuais da OHB no foro ORL são múltiplas e com resultados satisfatórios e promissores:

Sendo a radioterapia uma terapêutica oncológica que assenta na desnaturação proteica, isquémia e morte celular, entendemos a lesão das estruturas anexas aos tumores como um evento adverso da mesma. Entre os tecidos mais lesados estão aqueles que têm uma vascularização mais deficitária como o osso e a cartilagem. Clinicamente têm importância os focos de necrose com sobreinfecção em que predominam os anaeróbios, a instalação insidiosa e a evolução prolongada. Deste modo, na área anatómica da cabeça e pescoço as principais complicações da radioterapia que podem beneficiar da OHB são a -Osteoradionecrose da mandíbula e do maxilar superior, a Osteocondroradionecrose laríngea e a Condroradionecrose traqueal. Pretende-se pois que a cicatrização seja promovida e acelerada em tecidos que de outra forma não teriam viabilidade.<sup>14,15,16,17</sup>

Aquando das dificuldades de vascularização de retalhos e de enxertos cutâneos, a OHB pode ser uma preciosa ajuda, uma vez que promove a sobrevivência de células em sofrimento<sup>18,19</sup> e compensa a vascularização deficitária dos territórios isquémicos. A experiência é particularmente grande na área da cabeça e pescoço quer num contexto de patologia tumoral quer em patologia traumática, como por exemplo nas mordidelas de cães. Nestas situações tem também importância o efeito antiinflamatório da OHB no alívio das queixas dos doentes e na promoção da vascularização.

A surdez neurosensorial súbita (SNS), descrita inicialmente por De Kleyn em 1944<sup>20</sup>, é uma entidade clínica que uma vez identificada, carece da identificação de uma etiologia. Na maioria dos casos não é possível o estabelecimento de um diagnóstico preciso. Consideram-se como hipóteses fisiopatológicas possíveis a infecção viral, as afecções auto-imunes ou fenómenos vasculares oclusivos. Instala-se habitualmente em 12 horas a 3 dias, sendo frequentemente notada ao acordar.

**TABELA 2: Indicações ORL para tratamentos por OHB entre 2005 e 2007**

	2005	2006	2007
Surdez Neurosensorial Súbita	131	144	127
Acufenos	0	9	0
Osteoradionecrose da Mandíbula	1	2	1
Otite Externa Maligna	2	1	1

Nos Estados Unidos da América a incidência anual varia entre os 5 e os 20 casos por 100.000 habitantes. A extrapolação destes dados para Portugal, sugere uma incidência aproximada de 500 a 2000 casos por ano

Alguns factores são apontados como tendo influência no prognóstico, como por exemplo a idade, o limiar auditivo inicial aos 8000 Hz, a perda audiométrica inicial, o audiograma “descendente”, o tempo entre a instalação dos sintomas e o início do tratamento, a velocidade de sedimentação e a vertigem acompanhante. Vários trabalhos têm sugerido a vantagem da utilização da OHB nesta entidade, mesmo com a exclusão da percentagem de casos de eventual melhoria espontânea.<sup>21,22,23,24</sup>

## Resultados

Da experiência do Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha, verificamos que a maioria dos doentes com surdez neurosensorial súbita sem causa identificada, chega em média oito dias após o início dos sintomas, sendo que 75% chega nos dez primeiros dias. Destes doentes, cerca de 10 a 18% não reúne as condições necessárias, pelo que não são admitidos para tratamento. (Tabela 1) O número mínimo de sessões é de 10 e o máximo, de 30, com um número médio 15 sessões. A informação da melhoria dos sintomas ocorre perto da 10<sup>a</sup> sessão, tendo-se verificado que nos melhores casos ocorre à 3<sup>a</sup> sessão e nos mais complicados prolonga-se até à 20<sup>a</sup>. As análises de resultados que são regularmente efectuadas, indicam-nos uma taxa de sucesso de cerca de 73%. Nestes resultados incluem-se 32% de cura absoluta.<sup>25</sup>

A surdez neurosensorial súbita é a indicação mais frequente de entre as patologias otorrinolaringológicas, para tratamentos de OHB no Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha. (Tabela 2) Também o é, do ponto de vista absoluto, ultrapassando indicações como a cistite radica ou o pé diabético. O tratamento dos acufenos inseriu-se num protocolo experimental, no ano de 2006.

## Discussão

Qualquer análise de resultados de sucessos terapêuticos na surdez neurosensorial súbita, esbarra na multiplicidade de dados publicados de recuperações espontâneas, que variam aproximadamente entre os 30 e 60%.

Sabe-se, no entanto, que ao fim de 7 dias do início dos sintomas, é possível saber se essa recuperação espontânea vai ocorrer<sup>26</sup>. Na série aqui apresentada, o tempo médio ao fim do qual os doentes iniciaram a OHB foi de 8 dias, portanto fora do período no qual poderiam ter notado a recuperação espontânea. É claro que a dúvida sobre estes resultados deve manter-se, exigindo-nos maior cuidado na selecção dos doentes e no tratamento dos dados.

Em otologia, ainda sem fundamentação superior a um nível C de evidência, tem sido advogada a OHB no tratamento dos acufenos, do sonotraumatismo agudo e da Doença de Menière.

O interesse crescente por esta forma de tratamento, a redução dos custos e o aumento do conhecimento científico sobre os seus fundamentos e modo de ação fazem prever um alargamento de indicações e um cada vez maior recurso a esta arma terapêutica. Sabendo que o Oxigénio é um fármaco e é usado como tal, temos, por isso, que estar vigilantes para os eventos adversos que lhe estão associados e para outros que possamos vir a observar. Deve ser mantido um extremo rigor na selecção de casos elegíveis para o tratamento com OHB.

## Conclusão

A oxigenoterapia hiperbárica é um método de tratamento validado há longa data, que tem sido desenvolvido e ajustado aos novos conhecimentos científicos e que se posiciona como de primeira linha em várias patologias. No foro otorrinolaringológico é um tratamento complementar e suplementar porque não há, por enquanto, indicações de tipo 1. Atendendo ao acordo para receber doentes do Serviço Nacional de Saúde, o Centro de Medicina Hiperbárica do Hospital da Marinha está aberto à sociedade civil, correspondendo esta a 98% da sua actividade.

## Bibliografia

- 1 Henshaw N, A Register for the Air in Five Chapters. Dublin, 1664
- 2 Junod VT, Recherches Physiologiques et Therapeutiques Sur les Effects de la Compression et de la Rarefaction de l'air Tant Sur le Corps Que Sur les Membres Isolés, Rev Med Franc Etrang, 3: 350, 1834
- 3 Pravaz, Mémoire sur l'emploi du bain d'air comprimé associé à la gymnastique dans le traitement du rachitisme, des affections Strumeuses et des surdités catarrhales. L'Expérience, 5, 177, 1840
- 4 Tabarie, Sur l'action Therapeutique de l'Air Comprimé. C. R. Acad Sci. (Paris) II, 26, 1840
- 5 Fontaine JA, Emploi Chirurgical de l'air Comprime. Union Med 1879; 28: 445
- 6 Neumeister M, Cram A, Talavera F, Newsome RE, Slenkovich N, Downey SE, Hyperbaric oxygen therapy. Updated 2004 Nov. Available at: <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>. Accessed September 27, 2007
- 7 Bert P, La Pression Barométrique, Recherches de Physiologie Expérimentale, Masson, Paris, 1878
- 8 Smith LJ, The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. J Physiol, 24: 19-35, 1899
- 9 Louis A. Shaw, Albert R. Behnke, Anne C. Messer, The rôle of carbondioxide in producing the symptoms of oxygen poisoning, Am J Physiol -- Legacy Content, Vol. 108, Issue 3, 652-661, May 31, 1934
- 10 Haldane JS. The relation of carbonic oxide to oxygen tension. J Physiol (Lond); 18:201-7, 1895
- 11 Filipe Roque, Mundo Médico, Oxigénio hiperbárico: Fundamentos para uso terapêutico, 19, 22-29, 2001
- 12 Priestley J, Experiments and observations on different kinds of air. In: Priestley J, ed. The Discovery of Oxygen Part I. Vol 11. Edinburgh: 1923
- 13 Kindwall, Eric, Editor, Hyperbaric Medicine Practice, 1995, p. 46
- 14 D'Souza J, Gorri S, Brown J, Vaughan ED, Rogers SN, The influence of hyperbaric oxygen on the outcome of patients treated for osteoradionecrosis: 8 year study, Int J OralMaxillofac Surg, 2007 Sep;36(9):783-7. Epub 2007 Jul
- 15 Sandel HP 4th, Davison SP, Microsurgical reconstruction for radiation necrosis: an evolving disease, J Reconstr Microsurg,23(4):225-30, 2007
- 16 Narozny W, Sicko Z, Kot J, Stankiewicz CZ, Przewozny T, Kuczkowski K, Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of complications of irradiation in head and neck area. Undersea Hyperb Med, 32(2):103-10, 2005
- 17 London SD, Park SS, Gampper TJ, Hoard MA, Hyperbaric oxygen for the management of radionecrosis of bone and cartilage. Laryngoscope, 108(9):1291-6, 1998
- 18 McCrary BF, Hyperbaric oxygen (HBO<sub>2</sub>) treatment for a failing facial flap, Postgrad Med J, 83(975):e1, 2007
- 19 Ulkur E, Karagoz H, Ergun O, Celikoz B, Yildiz S, Yildirim S, The effect of hyperbaric oxygen therapy on the delay procedure. Plast Reconstr Surg, 119(1):86-94, 2007
- 20 De Kleyn. Sudden complete or partial loss of function of the octavus system in apparently normal persons. Acta Otolaryngol; (Stockh) Suppl 32: 407-29, 1944
- 21 Dundar K, Gumas T, Ay H, Yetiser S, Ertugrul E, Effectiveness of hyperbaric oxygen on sudden sensorineural hearing loss: prospective clinical research, J Otolaryngol, 36(1):32-7, 2007
- 22 Desloovere C, Knecht R, Germonpré P, Hyperbaric oxygen therapy after failure of conventional therapy for sudden deafness, B-ENT, 2(2):69-73, 2006
- 23 Racic G, Maslovara S, Roje Z, Dogas Z, Tafra R, Hyperbaric oxygen in the treatment of sudden hearing loss, ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 65(6):317-20, 2003
- 24 Topuz E, Yigit O, Cinar U, Seven H, Should hyperbaric oxygen be added to treatment in idiopathic sudden sensorineural hearing loss? Eur Arch Otorhinolaryngol, 2004 Aug;261(7):393-6. Epub 2003 Oct 29
- 25 Paulo Vera-Cruz, Artur Vasques de Carvalho, A vertigem é um factor de prognóstico da recuperação dum surdez súbita em doentes tratados com oxigenoterapia hiperbárica?, Revista da Sociedade Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-facial, 41, 365-368, 2003
- 26 Yamamoto, M., Kanzaki, J., Ogawa, K., Ogawa, S. and N. Tsuchihashi. Evaluation of hearing recovery in patients with sudden deafness. Acta Otolaryngol Suppl Stockh 1994; 514: 37-40

**2 - Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration**

# Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration\*

Paulo Vera-Cruz<sup>1</sup>, Marco Ferreira<sup>2</sup>, Carlos Zagalo<sup>3</sup>, José Martins dos Santos<sup>3</sup>, Artur P. Águas<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital da Marinha, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Serviço da Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal

<sup>4</sup> Instituto Superior de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, ICBAS and UMIB, Porto, Portugal

## SUMMARY

**Objective:** We aimed to identify potential morphologic changes induced in the nasal mucosa by hyperbaric oxygen (HBO) treatment.

**Study Design:** Biopsies were obtained from two groups of 9 individuals: the first group had a diagnosis of tinnitus and was submitted to 15 sessions of 100 min-long HBO treatments, and the latter group consisted of healthy volunteers not submitted to HBO therapy.

**Methods:** Small biopsies of the anterior portion of the lower nasal turbinate were collected with the help of a Hartmann forceps under direct visual inspection. The samples were processed for light microscopy and morphometric analysis. Inflammatory infiltration (neutrophils and lymphocytes) was evaluated by a semiquantitative method. Unpaired *t* test and Bernoulli distribution were applied to evaluate statistical differences between data from the two groups of samples.

**Results:** Samples of the turbinate mucosa of the HBO-treated group showed a significant increase in the thickness of the epithelial basement membrane and a moderate enhancement in infiltrating neutrophils when compared with the samples from the control group.

**Conclusions:** Chronic HBO treatment causes only minor changes in the architecture of the nasal mucosa that may represent the response of the respiratory tract to the increase in pressure and in oxygen content induced by this type of therapy.

**Key words:** hyperbaric therapy, oxygen, nasal mucosa, basement membrane, neutrophils

## INTRODUCTION

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) consists of the delivery of 100% oxygen to patients at pressures that are 2-3 times higher than sea level atmospheric pressure<sup>(1)</sup>. The patients are kept inside a hyperbaric chamber and the increased pressure aims at enhancing the amount of oxygen dissolved in the plasma of the patients. The therapeutic action of HBO is related to the direct physical effects of oxygen on blood and tissues and also with a number of secondary physiological and biochemical benefits<sup>(2,3)</sup>. The Undersea and Hyperbaric Medical Society has approved the use of HBO in the treatment of the following situations: air or gas emboli, carbon monoxide poisoning, gas gangrene, acute traumatic ischemia, decompression sickness, prolonged failure of wound healing, exceptional blood loss, intracranial abscess, necrotizing soft tissue infections, osteomyelitis, osteoradionecrosis, compromised skin grafts or

flaps and thermal burns<sup>(4-10)</sup>. Other pathologies have also been successfully treated with HBO, like sudden hearing loss<sup>(11-14)</sup>.

It has been reported that the HBO treatment alters nasal mucociliary transport<sup>(1)</sup>, probably due to the high oxygenation of blood plasma and enhancement the metabolism of ciliated cells and to a decrease in substance P, seen in cluster headache patients<sup>(15)</sup>. In spite of this evidence, there are no papers on putative morphological changes of the nasal mucosa associated with HBO treatment. The current study aimed to evaluate the microanatomy of the mucosa of the lower nasal turbinate in patients submitted to HBO treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Hyperbaric Oxygen (HBO)

The HBO treatment took place in a multiplace Hyperbaric

Chamber (Haux - Starmed 2000) in the presence of a nurse. All HBO-treated patients concluded 15 sessions of HBO therapy at 2.5 ATA (1 atmosphere absolute - ATA) for 75 minutes per session. They made one session each day, at the same hour, for 15 days. The total length of patient's stay in the chamber for each session was 100 minutes because of the time needed for compression (10 minutes) and decompressing (15 minutes). The pressure was obtained by compressed air and the patients breathed 100 % humidified oxygen through tightly fitted (nose and mouth) masks, expiring through valves connected to the space outside the chamber.

#### *Patients*

Two groups of 9 individuals were chosen for this study. The first group of patients was submitted to chronic (15 sessions) HBO treatment because of the diagnosis of tinnitus. They were all male patients, with age ranging 28-68 years, with a mean of  $50.89 \pm 11.78$  years. The second group of 9 men (controls) comprised patients that were scheduled for ear surgery. They were not submitted to HBO treatment and presented with an age range of 25-47 years with a mean of  $36.89 \pm 8.95$ . This research project had obtained previous authorization from the Ethics Committee that oversees clinical investigation at the Portuguese Navy Hospital (Lisbon) where nasal biopsies were collected. Exclusion criteria to eliminate patients from the study were the following: all criteria that exclude patients from HBO therapy, upper airways anatomical abnormalities, history of asthma, rhinitis, upper airway infection (shorter than 6 weeks), previous trauma or nasal surgery, drug addiction, cigarette smoking or professional exposure to air pollutants.

#### *Nasal Biopsies and Light Microscopy*

Samples of the head of lower turbinate were obtained with a Hartmann forceps (Karl Storz® 634822) under direct visual inspection, without local anesthesia. Local haemorrhage occurred in every case; in 3 patients, compression of the wound was not enough and the haemorrhage had to be controlled with cauterization using silver nitrate. With regards to HBO-

Table 1. Quantitative comparison of epithelial and basement membrane thickness between samples of the lower nasal turbinate of HBO-treated and control patients.

Thickness in micra of the epithelium and basement membrane.			
	Control group	HBO exposed group	p-value
Epithelium	$77.5 \pm 27.7$	$65 \pm 11.2$	0.16
Basement membrane	$8.9 \pm 2.7$	$12.1 \pm 4.1$	< 0.05

treated patients, the biopsies were harvested immediately after the last HBO session. The samples were fixed in buffered 10% formaldehyde, decalcified with 10% nitric acid, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and then embedded in paraffin. Serial 3  $\mu$ mickron-thick sections were obtained from each tissue block; paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS) stain and Verhoeff stain (16). The epithelium and basement membrane thickness were evaluated using a calibrated eyepiece at original magnification x400. Standard morphometric methods were used to obtain light microscopy measurements (17). In each H&E slide, three points where the epithelium was perpendicularly cut were measured for epithelial and basement membrane thickness, in order to minimize tangential section artifacts. The mean values of each variable were used for all specimens.

The epithelium and the chorion were assessed for the presence of inflammatory cell infiltrate (lymphocytes and polymorphonuclear [PMN] leukocytes), and the presence of submucosal seromucinous glands was recorded. The inflammatory cell infiltrate (lymphocytic and PMN) was classified as mild (+ : scattered inflammatory cells in the epithelium or chorion, with less than 5 leukocytes / high power field [HPF] 400x), moderate (++ : inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 5-20 cells/ HPF) or intense (+++ : dense inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 21 or more cells / HPF). These three categories were used in order to simplify the statistical analysis and because in other organs where inflammatory infiltration and its consequences are best studied, such grouping is also employed (18).

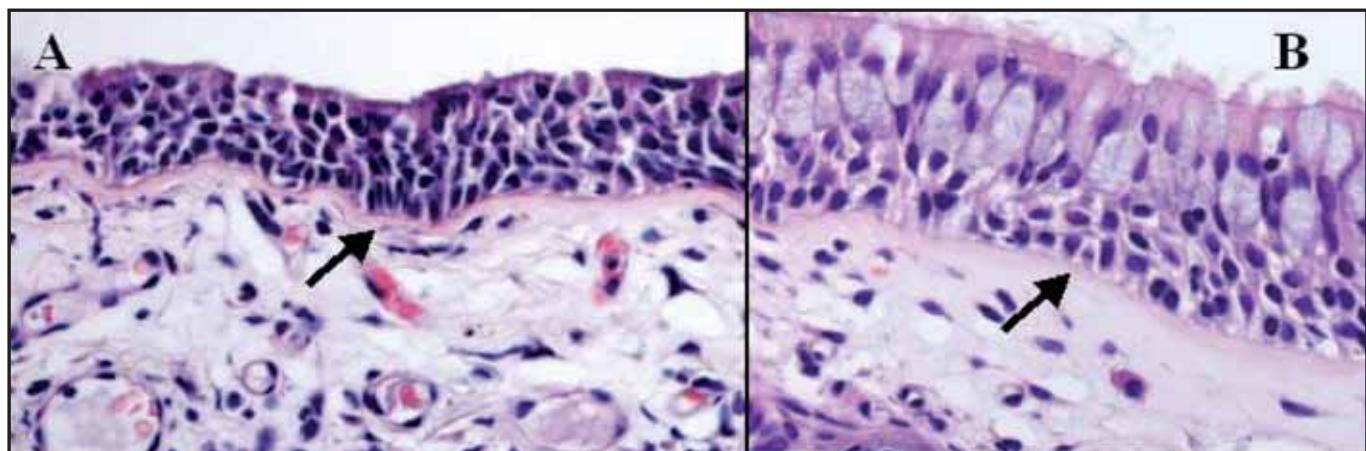


Figure 1. Light microscopy micrograph of paraffin section of human lower nasal turbinate mucosa showing the basement membrane (arrow) in the control group (A) and increased in a sample from HBO-treated group (B). H&E staining, x400.

Table 2. Semiquantitative scoring of inflammatory infiltrates by neutrophilic leukocytes of the epithelium and chorion of the lower nasal turbinate in HBO-treated and in control patients.

		Epithelial and chorion polymorphonuclear infiltration			
Epithelial infiltration				Chorion infiltration	
Control group	HBO exposed group	Control group		Control group	HBO exposed group
Control 1	0	Patient 1	0	Control 1	0
Control 2	0	Patient 2	+	Control 2	0
Control 3	0	Patient 3	0	Control 3	0
Control 4	0	Patient 4	+	Control 4	0
Control 5	0	Patient 5	0	Control 5	0
Control 6	0	Patient 6	+	Control 6	0
Control 7	0	Patient 7	++	Control 7	0
Control 8	0	Patient 8	0	Control 8	0
Control 9	0	Patient 9	0	Control 9	0

#### Statistical analysis

Statistical comparison between data from the two groups of samples (HBO-treated and control individuals) was performed using the Microsoft Excel® program. Histological and morphometric differences between control and HBO treated patients were tested with the unpaired t test. Measurements were expressed as mean  $\pm$  SD. A p-value of  $< 0.05$  was considered to indicate a significant statistical difference between the two groups. The Bernoulli distribution was used to evaluate the statistical significance of the presence of inflammation.

#### RESULTS

Comprehensive screening by light microscopy of nasal biopsy samples of HBO-treated and control individuals showed no dramatic changes in the architecture of the epithelium and mucosa of the lower turbinate. In the majority of the samples (70%), a squamous metaplastic epithelium was observed, as is expected from the anterior portion of the lower turbinate in a human adult population. There were no age-related differences in the control and HBO-treated individuals.

We also found that the HBO treatment did not increase the

frequency of squamous metaplastic epithelium in the nasal turbinate.

Two major differences were found between samples from HBO-treated and controls individuals: (i) the thickness of the epithelial basement membrane was increased in HBO-treated patients (Figure 1); and (ii) the epithelium and chorion of samples from HBO-treated patients, but not from controls, showed leukocyte infiltrates (Figure 2). Numerical data on the thickness of the turbinate epithelial basement membrane is presented in Table 1; the difference between the two groups was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) were the dominant leukocytes that were observed in the inflammatory infiltrates found in the epithelium and chorion of the lower nasal turbinate of HBO-treated patients (Figure 3). In contrast, inflammatory infiltrates were rare or absent in control samples. We have applied a semiquantitative scale (0 to  $+++$ ) to compare the two groups of samples with regards to PMN or lymphocyte infiltration. Comparison of these data revealed a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in PMN infiltration of

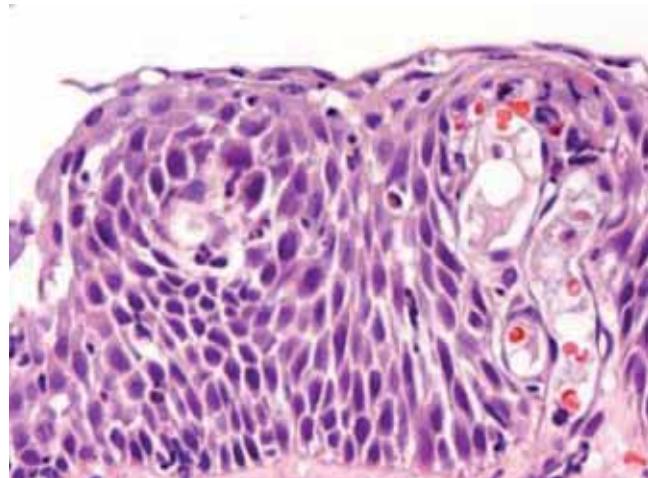


Figure 2. Light microscopy micrograph of paraffin section of human lower nasal turbinate mucosa showing neutrophils infiltrating the epithelium in a sample from the HBO-treated group of patients. H&E staining, x400.

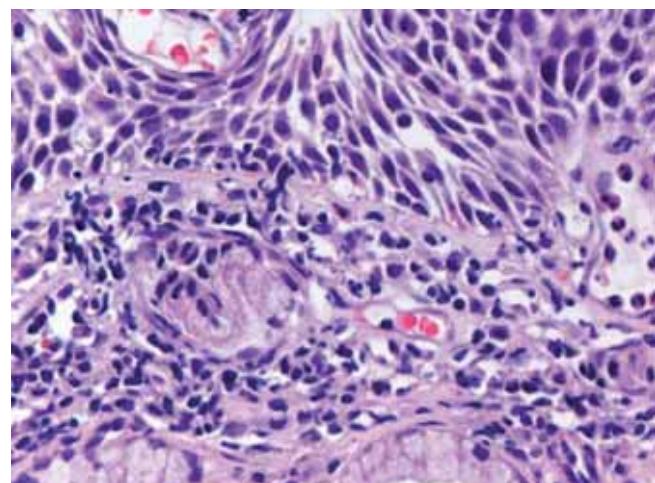


Figure 3. Light microscopy micrograph of paraffin section of human lower nasal turbinate mucosa showing infiltration by inflammatory cells (neutrophilic leukocytes) of the chorion of a patient from the HBO-treated group of patients. H&E staining, x400.

both epithelium and chorion between samples from HBO-treated and control individuals (Table 2). Regarding lymphocytes, comparison of the numerical data failed to reveal a significant difference ( $p = 0.27$ ) between the two groups of samples, although qualitative analysis of paraffin sections had suggested that, at least in the chorion, a moderate lymphocyte infiltration was present in the HBO-treated patients and absent in controls.

## DISCUSSION

The current investigation documents that chronic HBO therapy is associated with moderate inflammation of the nasal mucosa, expressed by its mild infiltration by neutrophilic leukocytes, and with enhanced thickness of the epithelial basement membrane. Our patients were submitted to fifteen treatments of HBO that was used at 100% O<sub>2</sub> and 2.5 ATA. This type of treatment consisted in submitting the patients to daily periods of 75 minutes of high pressure and high concentration of O<sub>2</sub>. A limitation of the design of our study is the lack of nasal biopsies before the HBO treatment was started, as well some time after its conclusion. Data from these additional biopsies would ascertain whether the herein described changes are permanent or reversible. However, we were not allowed by the Ethics Committee of our hospital to perform these two additional biopsies in the patients.

To understand the HBO-associated changes of the nasal mucosa, it is pertinent to recall the effects on the respiratory tract of the two major factors involved by HBO therapy: physical stimulation of the mucosa by enhanced atmospheric pressure and chemical stimulation of the tissues by 100% O<sub>2</sub>. Increase in atmospheric pressure is known to cause decrease in mucociliary transport time, namely under air oscillations of 16 Hz and pressure differences of 200 mmHg<sup>(19)</sup>. Ventilatory support with continuous positive airway pressure (nCPAP) is a common clinical situation that involves changes in the atmospheric pressure reaching the nose. Three months after nCPAP therapy, the architecture of the nasal mucosa appears to be restored<sup>(20)</sup> and after 6 months, the mucociliary clearance is normal<sup>(21)</sup>.

Enhancement in oxygen concentration is known to affect the whole lining of the respiratory tract, from the nose down to the alveoli. Most of these changes are related to a pro-inflammatory effect of O<sub>2</sub> on the mucosa. At normobaric conditions, O<sub>2</sub> applied to one nostril enhances nasal mucociliary transportation, and also increases the number of PMN and cylindric cells and of IL-6, IL-8 and ICAM-1 expression<sup>(22)</sup>. In vitro experiments have shown that increasing O<sub>2</sub> content will accelerate the nasal ciliary beat frequency. At high O<sub>2</sub> concentrations this effect is reversed, possibly due to oxygen toxicity<sup>(23)</sup>. Animals exposed to hyperoxia develop nasal epithelium cell replication, hypertrophy of non-ciliated cuboidal cells, and increased activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and of glutathione

peroxidase<sup>(24)</sup>. Hyperoxia is also known to induce lesions in lung endothelial cells and in type I pneumocytes<sup>(24)</sup>; additionally, DNA damage is also seen in type II pneumocytes<sup>(25)</sup> and increase in Fas/FasL gene expression promoting apoptosis of these cells<sup>(26)</sup>. Oxygen in the form of ozone (O<sub>3</sub>) has also been studied because of the current importance of respiratory lesions due to air pollution. Major abnormalities caused by ozone are related with inflammatory effects<sup>(27)</sup>, DNA damage<sup>(28)</sup>, release of neuropeptides<sup>(29)</sup>, cell death<sup>(30)</sup> and mucinous metaplasia<sup>(31,32)</sup>.

Taking into account the above described actions of increased atmospheric pressure and of enhanced concentration of O<sub>2</sub> on the nasal mucosa, it is plausible to consider that the inflammatory and basal membrane changes that we have found in patients submitted to chronic HBO therapy are more likely derived from the action of O<sub>2</sub> on the nasal mucosa, rather than from the increased atmospheric pressure. Since nasal mucosa shares many common responses with the lower airway of the respiratory tract<sup>(22)</sup>, it is pertinent to consider whether similar changes occur along the respiratory tract and in the lung tissue after chronic HBO therapy.

## CONCLUSION

Treatment of patients with hyperbaric oxygen in repeated 15 sessions of 100 minutes causes minor, but nevertheless significant, changes of the nasal turbinate mucosa, namely granulocyte infiltration and increased thickness of basal membrane. Whether these changes of the nasal mucosa extend to the whole respiratory tract is a question that deserves further investigation.

## REFERENCES

- Narozny W, Sicko Z, Stankiewicz CZ, Przewozny T, Pegiel-Sicko. The effect of hyperbaric oxygen on nasal mucociliary transport. Clin Otolaryngol Allied Sci 2002; 27: 140-146.
- Sahni T, Hukku S, Jain M, Prasad A, Prasad R, Singh K. Recent Advances in Hyperbaric Oxygen Therapy. Medecine update 2004; 14: 632-639.
- Neumeister M, Cram A, Talavera F, Newsome RE, Slenkovich N, Downey SE. Hyperbaric oxygen therapy. Updated 2004 Nov. Available at: <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>. Accessed September 27, 2007
- Kirby SD, Deschler DG. Hyperbaric oxygen therapy: application in diseases of the head and neck. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 1999; 7: 137-143.
- Jain KK. Textbook of Hyperbaric medicine, Hogrefe and Huber Publishers, Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, 3rd ed. 1999.
- Bartlett R. Carbon monoxide poisoning. In: Saunders WB, Haddad LM, Winchester JF, eds. Clinical management of poisoning and drug overdose, 3rd ed. 1997.
- Moon RE, Sheffield PJ. Guidelines for treatment of decompression illness. Aviation, Space, Environm Med 1997; 68: 234-243.
- McDermott JJ, Dutka AJ, Koller WA, et al. Effects of an increased P02 during recompression therapy for the treatment of experimental cerebral arterial gas embolism. Undersea Biomed Res 1992; 19: 403-413.
- Bouachour MD, Cronier P, Gouello JP, et al. Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. J Trauma 1996; 41: 333-339.

10. Neovius EB, Lind MG, Lind FG. Hyperbaric oxygen therapy for wound complications after surgery in the irradiated head and neck: a review of the literature and a report of 15 consecutive patients, Head Neck 1997; 19: 315-322.
11. Dundar K, Gumus T, Ay H, Yetiser S, Ertugrul E. Effectiveness of hyperbaric oxygen on sudden sensorineural hearing loss: prospective clinical research, J Otolaryngol 2007; 36: 32-37.
12. Desloovere C, Knecht R, Germonpré P. Hyperbaric oxygen therapy after failure of conventional therapy for sudden deafness, B-ENT 2006; 2: 69-73.
13. Racic G, Maslovara S, Roje Z, Dogas Z, Tafra R. Hyperbaric oxygen in the treatment of sudden hearing loss, ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 2003; 65: 317-320.
14. Topuz E, Yigit O, Cinar U, Seven H. Should hyperbaric oxygen be added to treatment in idiopathic sudden sensorineural hearing loss? Eur Arch Otorhinolaryngol 2004; 261: 393-396.
15. Di Sabato F, Giacovazzo M, Cristalli G, Rocco M, Fusco BM. Effect of hyperbaric oxygen on the immunoreactivity to substance P in the nasal mucosa of cluster headache patients. Headache 1996; 36: 221-223.
16. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone; 5th edn; 2002.
17. Collan Y. Stereology and morphometry in pathology: an introduction. In: Collan Y, ed. Stereology and morphology in pathology, Kuopio, Finland: Kuopio University Press; 1984: 5-11.
18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994, Am J Surg Pathol 1996; 20: 1161-1181.
19. Deitmer T, Muller S. Effect of low frequency air oscillations on nasal mucociliary transport. Acta Otolaryngol 1992; 112: 102-106.
20. Schrodter S, Biermann E, Halata Z. Histologic evaluation of nasal epithelium of the middle turbinate in untreated OSAS patients and during nCPAP therapy. Rhinology 2004; 42: 153-157.
21. Bossi R, Piatti G, Roma E, Ambrosetti U. Effects of long-term nasal continuous positive airway pressure therapy on morphology, function, and mucociliary clearance of nasal epithelium in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Laryngoscope 2004; 114: 1431-1434.
22. Capellier G, Zhang Z, Maheu MF et al. Nasal mucosa inflammation induced by oxygen administration in humans, Acta Anaesthesiol Scand 1997; 41: 1011-1016.
23. Stanek A, Brambrink AM, Latorre F, Bender B, Kleemann PP. Effects of normobaric oxygen on ciliary beat frequency of human respiratory epithelium, Br J Anaesth 1998; 80: 660-664.
24. Nikula KJ, Sabourin PJ, Frietag BC, Birdwhistell AJ, Hotchkiss JA, Harkema JR. Biochemical and morphologic responses of rat nasal epithelia to hyperoxia, Fundam Appl Toxicol 1991; 17: 675-683.
25. Roper JM, Mazzatti DJ, Watkins RH, Maniscalco WM, Keng PC, O'Reilly MA. In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286: L1045-1054.
26. De Paepe ME, Mao Q, Chao Y, Powell JL, Rubin LP, Sharma S. Hyperoxia-induced apoptosis and Fas/FasL expression in lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289: L647-659.
27. Nikasinovic L, Momas I, Seta N. Nasal epithelial and inflammatory response to ozone exposure: a review of laboratory-based studies published since 1985. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2003; 6: 521-568.
28. Pacini S, Giovannelli L, Gulisano M, et al. Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy, Environ Mol Mutagen 2003; 42: 127-135.
29. Schierhom K, Hanf G, Fischer A, Umland B, Olze H, Kunkel G. Ozone-induced release of neuropeptides from human nasal mucosa cells. Int Arch Allergy Immunol 2002; 129: 145-151.
30. Mantell LL, Horowitz S, Davis JM, Kazzaz JA. Hyperoxia-induced cell death in the lung - the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation. Ann N Y Acad Sci 1999; 887: 171-180.
31. Cho HY, Hotchkiss JA, Harkema JR. Inflammatory and epithelial responses during the development of ozone-induced mucous cell metaplasia in the nasal epithelium of rats, Toxicol Sci 1999; 51: 135-145.
32. Hotchkiss JA, Harkema JR. Endotoxin or cytokines attenuate ozone-induced DNA synthesis in rat nasal transitional epithelium, Toxicol Appl Pharmacol 1992; 114: 182-187.

Paulo Vera-Cruz, MD  
Rua Poeta Bocage 18, 3º Dto  
1600-581 Lisboa  
Portugal

Tel: +351-91-903 3932  
Fax: +351-21-726 7261  
E-mail: p\_vera\_cruz@netcabo.pt

**3 - Chronic hyperbaric oxygen therapy causes only minor ultrastructural changes in the human nasal epithelium**

**Article title:** Chronic hyperbaric oxygen therapy causes only minor ultrastructural changes in the human nasal epithelium.

**Authors:**

Paulo Vera-Cruz, MD; Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital da Marinha, Lisboa, Portugal.

Carlos Zagalo, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.

José Martins dos Santos, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.

Artur P. Águas, MD, PhD; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, ICBAS and UMIB, Universidade do Porto, Portugal.

**Address for Correspondence:**

Paulo Vera-Cruz, MD

Rua Poeta Bocage 18, 3º Dto, 1600-581 Lisboa, Portugal

Phone: (00351)919033932; Fax : (00351)217267261 ; Email: [p\\_vera\\_cruz@netcabo.pt](mailto:p_vera_cruz@netcabo.pt)

## SUMMARY

Hyperbaric oxygen (HBO) therapy is becoming increasingly popular in the treatment of several pathologies, namely in vascular diseases. It is generally considered to be innocuous, with few restrictions. Thus, patients subjected to HBO therapy breath saturated oxygen at an elevated pressure. Since the respiratory mucosa comes into contact with this altered inhaled air, we decided to use light and electron microscopy to investigate whether chronic HBO therapy causes significant changes in the nasal mucosa. For this, we obtained biopsies of the anterior portion of the lower nasal turbinate from two groups of 9 individuals under direct visual inspection. The first group had a diagnosis of tinnitus and was subjected to 15 sessions of 100 min-long HBO treatments, and the latter group comprised healthy volunteers not subjected to HBO therapy. The samples were processed for light and electron microscopy. We found that the turbinate mucosa of the HBO-treated group showed a moderate infiltration by leukocytes and an increase in the thickness of the epithelial basement membrane. By transmission electron microscopy (TEM), we observed that only a minority of the nasal epithelial cells presented alterations due to the HBO treatment; these alterations were focal and restricted to cilia. We conclude that chronic HBO treatment induces only minor alterations in the nasal mucosa and that these are likely to be reversible when the treatment is discontinued.

*Key words:* Hyperbaric Therapy; Oxygen; Nasal Mucosa; Basement Membrane; Neutrophils; Cilia

## INTRODUCTION

The spectrum of Hyperbaric oxygen (HBO) therapy in internal medicine has expanded during the last decade. HBO is performed inside a hyperbaric chamber and consists of the delivery of 100% oxygen to patients at pressures that are 2-3 times higher than at sea level (Narozny et al., 2002). The aim of the increased pressure is to enhance the amount of oxygen dissolved in the plasma of the patients. The therapeutic actions of HBO are related not only to the direct physical effects of oxygen on blood and tissues but also to vasoconstriction, angiogenesis, fibroblast proliferation, leukocyte oxidative killing, toxin inhibition and antibiotic synergy (Sahni et al., 2004; Neumeister et al., 2004). Currently, the indications for HBO are consensual and are determined by medical societies. The Undersea and Hyperbaric Medical Society has approved the use of HBO in the treatment of a number of pathologies, namely in air or gas emboli, carbon monoxide poisoning, gas gangrene, acute traumatic ischemia, decompression sickness, prolonged failure of wound healing, exceptional blood loss, intracranial abscesses, necrotizing soft tissue infections, osteomyelitis, osteoradionecrosis, compromised skin grafts or flaps, and heat burns (Wattel and Mathieu, 2006). Other pathologies have also been successfully treated with HBO, such as sudden hearing loss (Dundar et al., 2007).

Owing to the increased therapeutic uses of HBO in human medicine, we were prompted to investigate whether this type of treatment causes any alterations in the respiratory mucosa since this mucosa is in direct contact with the altered air breathed by patients subjected to HBO. To accomplish this, here we compared the morphology of the nasal epithelium and chorion of HBO-treated and control individuals.

## MATERIALS AND METHODS

In the present study, two groups of 9 individuals were formed. The first group of patients was subjected to chronic (15 sessions) HBO treatment for a diagnosis of tinnitus. They were all men, with an age range of 28-68 years, with a mean of  $50.89 \pm 11.78$  years. HBO treatment took place in a multiplace Hyperbaric Chamber (Haux® – Starmed 2200) in the presence of a nurse. All HBO-treated patients concluded 15 sessions of HBO therapy at 2.5 ATA (1 atmosphere absolute – ATA) at 75 minutes per session. They attended one session per day, at the same hour, for 15 days. The total length of time that the patients remained in the chamber for each session was 100 minutes owing to the time needed for compression (10 minutes) and decompression (15 minutes). The pressure was sustained by compressed air, and the patients breathed 100 % humidified oxygen through tightly fitting (nose and mouth) masks, expiring to the space outside the chamber. The

second group of 9 men (controls) comprised patients scheduled for ear surgery. They were not subjected to HBO treatment and had an age range of 25-47 years with a mean of  $36.89 \pm 8.95$ .

The exclusion criteria to eliminate patients from the study were as follows: all criteria that exclude patients from HBO therapy, anatomical abnormalities of the upper airways, a history of asthma, rhinitis, upper airway infection (less than 6 weeks), previous trauma or nasal surgery, drug addiction, a history of cigarette smoking or tobacco exposure, professional exposure to air pollutants and having indoor pets.

Previous authorization was obtained from the Ethics Committee that oversees clinical investigation at the Portuguese Navy Hospital (Lisbon) where the nasal biopsies were collected. All subjects gave written informed consent.

Two samples of the head of the lower turbinate were obtained with a Hartmann forceps (Karl Storz® 634822) under direct visual inspection, without local anesthesia. Local hemorrhage occurred in each case; in 3 patients, compression of the wound was insufficient and the hemorrhage had to be controlled by using silver nitrate. In the case of the HBO-treated patients, the biopsies were harvested immediately after the last HBO session.

One half of the sample was fixed in buffered 10% formaldehyde, decalcified with 10% nitric acid, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. Serial 3  $\mu\text{m}$ -thick sections were obtained from each tissue block; paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS) stain and Verhoeff stain. The other half of the sample from the inferior turbinate was fixed in an aldehyde mixture containing 4% formaldehyde, 1.25% glutaraldehyde and 10 nmol/L CaCl<sub>2</sub> in 0.05 mol/L cacodylate buffer, pH 7.2 (Silva et al., 1987). Postfixation was performed in ferricyanide-reduced osmium tetroxide made up in distilled water (Águas, 1982). The specimens were dehydrated in ethanol, embedded in epon, and thin-sectioned on a LKB (Sweden) ultramicrotome. The thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids containing sections were examined and photographed under a Jeol 100C transmission electron microscope.

Histopathologic analysis of 3  $\mu\text{m}$ -thick hematoxylin-eosin (H&E) stained sections included an evaluation of epithelial shedding, necrotic cells number, basement membrane thickness, goblet cell hyperplasia, squamous metaplasia, mononuclear and polymorphonuclear infiltration, wide intercellular spaces and shortened or absent cilia.

H&E samples and transmission electron micrographs were examined blindly by two of the authors. Series of electron micrographs were obtained from each sample from the two cohorts at

magnifications of 2800x to 16000x. Ciliar areas were examined at a final magnification was 16000x.

Electron micrographs of the nasal epithelium were assessed for the following criteria: (i) intracellular alterations, namely mitochondrial damage and changes in nuclei, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, (ii) the presence of squamous metaplastic cells, (iii) alterations in the distribution of ciliated and goblet cells and (iv) alterations in the ultrastructure of cilia.

## RESULTS

The microscopic morphology of the nasal mucosa was studied in humans subjected to chronic HBO therapy and in controls. Comprehensive light microscopy screening of mucosal biopsies of the lower nasal turbinate revealed that the individuals that had been subjected to chronic HBO therapy exhibited a moderate leukocyte infiltration of the chorion and epithelium, as well as an enhancement of the thickness of the basement membrane (Fig. 1). These alterations were absent in samples from the control group.

We also used transmission electron microscopy (TEM) to compare the fine structure of the nasal epithelial cells from the biopsy samples from HBO-treated and control individuals. We found no morphological differences between the two groups of samples as regards the ultrastructure of the intracellular components, namely nuclei, mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, or of intercellular junctional complexes. In a minority of nasal epithelial cells (less than 10%) from samples from HBO-treated patients there were scattered changes in the morphology of some cilia, and these alterations were not detected in control samples. The alterations of cilia consisted in membrane swelling or fusion between the membrane of adjacent cilia, and changes in microtubules (either a lack of central microtubules or additional microtubules) (Fig. 2).

## DISCUSSION

HBO is an established therapy with significant advantages in the treatment of several pathologies that are ameliorated when the availability of oxygen to body tissues is enhanced (Wattel and Mathieu, 2006). However, it must be kept in mind that increasing the oxygen concentration and air pressure may potentially harm the lining of the respiratory tract, from the nose down to the alveoli (Capellier et al., 1997). Most of such potential changes are related to a pro-inflammatory effect of O<sub>2</sub> on the mucosa (Fildissis et al., 2004). It was these putative harmful effects of HBO therapy that prompted us to perform the investigation described here.

We observed that chronic HBO therapy only caused minor inflammatory alterations of the mucosa and a few isolated changes in the ultrastructure of epithelial cilia. The latter changes in the ultrastructure of cilia due to HBO treatment are in keeping with data from previous studies. For example, albino guinea pigs subjected to middle ear barotrauma showed a minor loss of cilia and cell vacuolization (Sato et al., 1997). In the nasal cavity, HBO has been associated with increased mucociliary transportation (Narozny et al., 2002). The fact that increased air pressure is able to change the nasal mucosa has been demonstrated in patients treated with continuous positive airway pressure (CPAP). After a 3-10 months CPAP-therapy all patients showed alterations in the shape of epithelial cells and conglutination and clumping of the microvilli. Mucociliary clearance was distinctly prolonged in all of these cases (Constantinidis et al., 2000). The effects of oxygen in the nasal mucosa have been mostly established taking into account the effects of the ozone molecule. It has been reported that excess oxygen may also cause DNA damage of the epithelial cells of the nasal mucosa (Pacini et al., 2003).

In conclusion, the present investigation reinforces the current prevailing view that HBO is a relatively safe method for the treatment of human patients, with negligible side effects.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Mr Emanuel Monteiro (Department of Normal Anatomy; Instituto Superior de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, ICBAS and UMIB, Oporto University) for his technical support and collaboration.

## **REFERENCES**

- ÁGUAS AP (1982). The use of osmium tetroxide-potassium ferrocyanide as an extracellular marker in electron microscopy. *Stain Technology*, 57:69-73.
- CAPELLIER G, ZHANG Z, MAHEU MF, POINTET H, RACADOT E, KANTELIP B, REGNARD J and BARALE F (1997). Nasal mucosa inflammation induced by oxygen administration in humans. *Acta Anaesthesiol Scand*, 41(8):1011-6.
- CONSTANTINIDIS J, KNÖBBER D, STEINHART H, KUHN J and IRO H (2000). Fine-structural investigations of the effect of nCPAP-mask application on the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*, 120(3):432-7.

DUNDAR K, GUMUS T, AY H, YETISER S and ERTUGRUL E (2007). Effectiveness of hyperbaric oxygen on sudden sensorineural hearing loss: prospective clinical research. *J Otolaryngol*, 36(1):32-7.

FILDISSIS G, VENETSANOU K, KARATZAS S, ZIDIANAKIS V and BALTOPOULOS G (2004). Whole blood pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules post-lipopolysaccharides exposure in hyperbaric conditions. *Eur Cytokine Netw*. 15(3):217-21

NAROZNY W, SICKO Z, STANKIEWICZ CZ, PRZEWOZNY T and PEGIEL-SICKO (2002). The effect of hyperbaric oxygen on nasal mucociliary transport. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 27(3):140-6.

NEUMEISTER M, CRAM A, TALAVERA F, NEWSOME RE, SLENKOVICH N and DOWNEY SE (Updated 2004 Nov). Hyperbaric oxygen therapy. Available at: <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>. Accessed September 12, 2008.

PACINI S, GIOVANNELLI L, GULISANO M, PERUZZI B, POLLI G, BODDI V, RUGGIERO M, BOZZO C, STOMEO F, FENU G, PEZZATINI S, PITOZZI V and DOLARA P (2003). Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environ Mol Mutagen*, 42(3):127-35.

SAHNI T, HUKKU S, JAIN M, PRASAD A, PRASAD R and SINGH K (2004). Recent Advances in Hyperbaric Oxygen Therapy. *Medecine update*, 14: 632-639.

SATO S, YOKOI H, FUKUTA S and YANAGITA N (1997). Morphological studies on middle ear barotraumas in guinea pigs. *Nagoya J Med Sci*, 60(3-4):109-17

SILVA MT, APPLEBERG R, SILVA MNT and MACEDO PM (1987). In vivo killing and degradation of *Mycobacterium avium* within mouse peritoneal macrophages. *Infect Immunol*, 55: 2006-2016.

WATTEL F and MATHIEU D (2006). Methodology for assessing hyperbaric oxygen therapy in clinical practice, In: D. Mathieu (ed.) *Handbook on hyperbaric medicine*, Springer, Netherlands, 163-170

Figure 1. Respiratory epithelium with leukocyte infiltration (arrows) and increased basement membrane thickness. (H&E staining, 400x)

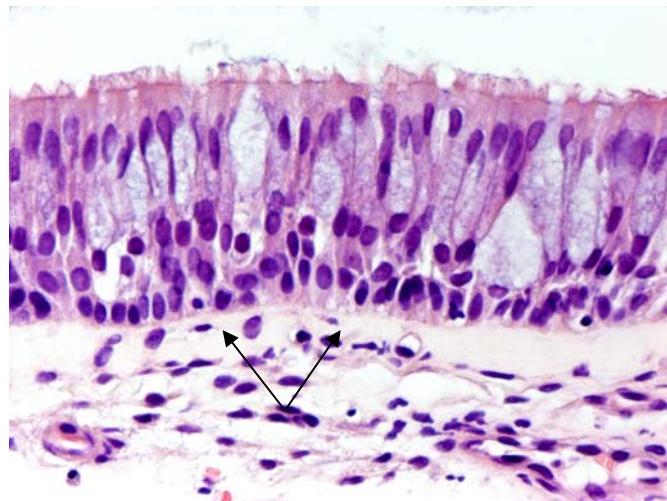
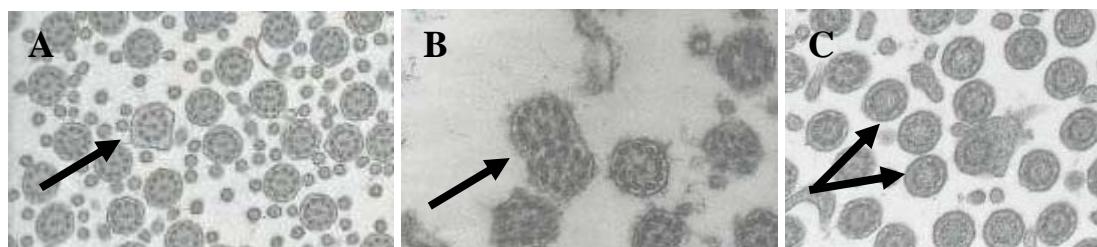


Figure 2. Transmission electron microscopy micrographs showing ciliar swelling (A, 5300x), compound cilia (B, 13000x) and absent central microtubules (C, 8000x)



**4 - Structure of the rat nasal mucosa after acute and chronic hyperbaric oxygen therapy**

**Article title:** Structure of the rat nasal mucosa after acute and chronic hyperbaric oxygen therapy

**Authors:**

Paulo Vera-Cruz, MD

Marco Ferreira, MD

Carlos Zagalo, MD, PhD

José Martins dos Santos, MD, PhD

Artur P. Águas, MD, PhD

**Institutions where the work was done:** Hospital da Marinha, Hospital de Fernando da Fonseca, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Instituto Superior de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal, European Union.

**Key words:** Hyperbaric Therapy; Oxygen; Nasal Mucosa; Epithelium; Leukocytes; Neutrophils; Lymphocytes; Oxydative Stress; Chronic Disease; Rodents.

**Address for Correspondence:**

Paulo Vera-Cruz, MD

Rua Poeta Bocage 18, 3º Dto, 1600-581 Lisboa, Portugal

Phone: (00351)919033932; Fax : (00351)217267261

Email: [p\\_vera\\_cruz@hotmail.com](mailto:p_vera_cruz@hotmail.com)

## **ABSTRACT**

*Objective:* We aimed at the identification of putative morphologic changes induced in the rat nasal mucosa by acute or chronic hyperbaric oxygen (HBO) treatment.

*Study Design:* Nasal samples were obtained from three groups of 8 adult Wistar rats. The first group was submitted to 30 sessions of 100 min-long HBO treatment, the second group to a single 485 min-long HBO session, and the third group was made of rats not submitted to any HBO therapy.

*Methods:* Samples of the lower nasal turbinates (*concha nasalis ventralis*) were collected after sacrifice and head dissection of the animals. The samples were processed for light and electron microscopy and for morphometric analysis. Inflammatory leukocyte infiltration was evaluated by a semiquantitative method. Unpaired *t* test and Bernoulli distribution were applied to evaluate statistical differences between data from the two groups of samples of HBO-treated rats and untreated rats.

*Results:* Samples of the turbinate mucosa of the rats submitted to chronic HBO treatment showed a significant increase in the thickness of the epithelium and a mild enhancement in the number of infiltrating leukocytes when compared with data from samples from untreated rats or from rats submitted to a single HBO treatment.

*Conclusions:* Chronic HBO treatment causes only minor changes in the architecture of the nasal mucosa of the rat; they reflect a mild inflammatory response of the respiratory tract to the increase in pressure and in oxygen content induced by HBO. No significant morphological changes were observed after a single HBO treatment.

## INTRODUCTION

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is an elective procedure in the treatment of emergency situations such as decompression illness or carbon monoxide poisoning<sup>1</sup>. In addition, HBO has been approved by The Undersea and Hyperbaric Medical Society for the treatment of a number of disorders such as gas gangrene, acute traumatic ischemia, prolonged failure of wound healing, air or gas emboli, severe blood loss, intracranial abscess, necrotizing soft tissue infections, osteomyelitis, osteoradionecrosis, skin grafts or flaps and thermal burns<sup>2-8</sup>. Other pathologies have also been successfully treated by HBO, like sudden hearing loss<sup>9-12</sup>. HBO consists in the delivery of 100% oxygen to patients at pressures that are 2-3 times higher than that of sea level atmospheric pressure, thus enhancing the amount of oxygen dissolved in the plasma of patients<sup>13</sup>. The therapeutic outcomes of HBO are related with the direct physical effects of oxygen on blood and tissues, and also with physiological and biochemical effects of cumulative hyperoxigenation<sup>14,15</sup>.

Most of the studies on HBO-induced changes in the respiratory tract report on lung alterations and these are considered to be triggered by the oxidative stress and the inflammatory effects of breathing 100% oxygen. For instance, thiobarbituric acid reactive substances and superoxide dismutase levels were found to increase in a time-dependent manner in both erythrocytes and lung tissue after HBO exposure of animals from 30 to 120 min, and these alterations exhibited a clear correlation with HBO-induced oxidative action and exposure time<sup>16</sup>. Intermittent exposure to atmospheric air is used as a protective strategy against HBO toxicity. In fact, it has been documented that continuous HBO exposure may lead to activation of inflammatory mediators, an increase in lung protein nitration and activation of inducible NOS (iNOS) mRNA, while inflammatory responses were not observed after intermittent exposures to the same cumulative oxygen time duration<sup>17</sup>.

Regarding the nasal mucosa, it has been reported that the HBO treatment alters mucociliary transport<sup>13</sup>, probably as a result of the high oxygenation of blood plasma and enhancement the metabolism of ciliated cells and of a decrease in substance P that is seen in cluster headache patients<sup>18</sup>. We have recently reported that chronic HBO treatment of humans is related with mild granulocyte infiltration and increase in the thickness of the basal membrane of the nasal mucosa<sup>19</sup>. Because human populations always bear a marked degree of heterogeneity, we have decided to revisit the effects of HBO on the nasal mucosa in a homogeneous population of rats. For that, we have studied the microanatomy of the nasal mucosa in Wistar rats submitted to acute or chronic HBO treatments.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals:** Twenty four male adult Wistar rats were purchased to Charles River (Barcelona, Spain); they were aged 6 weeks, weighed 150-175g, and were kept two per cage and cared for according to Portuguese law (DL 129/92, July 6 and norm 1005/92) and the European Union directive nº 86/609/CEE on the protection of animals used in experimentation. The rats were divided into 3 experimental groups of 8 animals that were submitted to single or chronic HBO treatments, or used as controls.

**Experimental procedure:** The HBO treatment took place in a small hyperbaric chamber that was designed for small animals with capacity for 4 cages, built in the Portuguese Navy central shipyard. The chamber was certified for air or oxygen pressurization up to 4 atmospheres. The group of rats submitted to chronic HBO underwent 30 sessions of HBO therapy at 2.5 ATA (1 atmosphere absolute – ATA) for 75 minutes per session. They made one session each day, at the same hour, for 30 days. The total period of time that each rat spent in the chamber in each HBO session was 100 minutes because of the time needed for compression (10 minutes) and decompression (15 minutes). The pressure was obtained by 100 % humidified oxygen. The rats that received a single HBO treatment were submitted to 485 min long session that follows the United States Navy decompression treatment protocol table 6 at 2,8 ATA maximum. This is one of the longest and most popular HBO protocol. We used its extended version with two extra periods of 20 minutes at 2,8 ATA and two extra periods of 60 minutes at 1,9 ATA. In this protocol, that in total is more than 8 hours long, there are periods when the animals breathed 100% oxygen or air at different pressures (Fig. 1). Pressurization lasts 2 to 4 minutes and should not exceed 25 feet/minute. The control group of rats was never exposed to hyperbaric or enhanced oxygen conditions.

The rats were sacrificed after being anesthetized with 40 mg/Kg sodium pentobarbital by intraperitoneal injection. The heads were bisected along the nasal septum to expose the nasal cavity<sup>20</sup> immediately after the last session for the first group, immediately after the single session for the second group and in the same day of the first group for the control group. The cartilaginous portion of the nasal septum was excised and the inferior turbinate nasal mucosa was carefully separated from the bone. This research project obtained the previous authorization of the Ethics Committee that oversees investigation at the Portuguese Navy Hospital (Lisbon).

**Light Microscopy.** The rat turbinal mucosa from the left side was fixed in buffered 10% formaldehyde, decalcified with 10% nitric acid, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and then embedded in paraffin. Serial 3 µm-thick sections were obtained from each tissue block; paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS)

stain and Verhoeff stain<sup>21</sup>. The epithelium and basement membrane thickness were evaluated using a calibrated eyepiece at original magnification x400. Standard morphometric methods were used to obtain light microscopy measurements<sup>22</sup>. In each H&E slide, three points where the epithelium was perpendicularly cut were measured for epithelial and basement membrane thickness, in order to minimize tangential section artifacts. The mean values of each variable were used for all specimens.

The epithelium and the chorion were assessed for the presence of inflammatory cell infiltrate (lymphocytes and polymorphonuclear [PMN] leukocytes), and the presence of submucosal seromucinous glands was recorded. The inflammatory cell infiltrate (lymphocytic and PMN) was classified as mild (+; scattered inflammatory cells in the epithelium or chorion, with less than 5 leukocytes/high power field [HPF] 400x), moderate (++; inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 5-20 cells/ HPF) or intense (+++; dense inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 21 or more cells/ HPF). These three categories were used in order to simplify the statistical analysis and because in other organs where inflammatory infiltration and its consequences have best studied, such grouping has also been successfully employed<sup>23</sup>.

**Electron Microscopy.** The rat turbinal mucosa from the right side was fixed in an aldehyde mixture containing 4% formaldehyde, 1,25% glutaraldehyde and 10 nmol/L CaCl<sub>2</sub> in 0,05 mol/L cacodylate buffer, pH 7,2<sup>24</sup>. Postfixation was performed in ferricyanide-reduced osmium tetroxide made in distilled water<sup>25</sup>. The specimens were dehydrated in ethanol, embedded in epon and thin-sectioned in a LKB (Sweden) ultramicrotome. The thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids containing sections were examined and photographed in a Jeol 100C transmission electron microscope. Transmission electron micrographs were blindly examined by two of the authors. Series of electron micrographs were obtained from each sample from the three cohorts at magnifications of 2800x to 16000x. This last one was used to evaluate areas with cilia. Electron micrographs of the nasal epithelium were assessed for the following criteria: (i) intracellular alterations, namely mitochondrial damage and changes in nuclei, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, (ii) presence of squamous metaplastic cells, (iii) alterations in the distribution of ciliated and goblet cells and (iv) alterations in the ultrastructure of cilia.

**Statistical Analysis.** Statistical comparison between data from the three groups of samples (30 HBO sessions, 1 HBO session and control animals) was performed using the Microsoft Excel® program. Histologic and morphometric differences between control and HBO treated rats were tested with the unpaired *t* test. Measurements were expressed as mean  $\pm$  SD. A *P* value of <0,05 was considered to indicate a significant statistical difference between groups. The Bernoulli distribution was used to evaluate the statistical significance of the presence of inflammation.

## RESULTS

We have performed a comprehensive scrutiny by light microscopy of paraffin sections of nasal biopsies of the rat lower turbinate, both in samples of HBO-treated and untreated rats. We found no striking morphological differences in the general architecture of the nasal mucosa between the 3 groups of rats. Epithelia of the respiratory type were observed on the rat turbinates, an expected histological feature of the nasal surface in young rodents. PAS and Veroeff staining revealed no significant changes in the number of mucous cells and in the integrity of elastic fibres between the 3 groups of rats. Quantitative comparison of the thickness of the epithelial layer and of the basement membrane revealed that there was a significant increase ( $p<0,05$ ) in epithelial thickness in the group of rats submitted to the chronic HBO treatment, whereas no significant differences occurred between the 3 groups with regards to the thickness of the epithelial basement membrane (Table 1 and Fig. 2).

The 3 groups of samples were also screened for the presence of infiltrating leukocytes in the epithelium and in the chorion of the turbinate nasal mucosa. This evaluation was done using a semiquantitative method that indicated that the rats submitted to chronic HBO presented significantly higher ( $p<0,05$ ) number of infiltrating leukocytes in the nasal chorion than the rats from the other 2 groups (Fig. 3). Both neutrophils and mononuclear cells contributed to the inflammatory infiltration detected in the nasal mucosa of the rats submitted to chronic HBO treatment. In contrast, data regarding epithelial infiltration was not significantly different between any of the 3 groups of animals. The numerical data regarding turbinate morphology from rats submitted to a single HBO treatment and that of untreated rats was undistinguishable from each other.

Qualitative comparison of the electron microscopy of nasal epithelial cells showed no clear changes between cells of the 3 groups of rats with regards to intracellular components, namely nuclei, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, secretory vesicles, intercellular junctions or cilia (Fig. 4).

## DISCUSSION

We have investigated here the effects of HBO treatment on the structure of the rat nasal mucosa by comparing the microscopic morphology samples of the lower turbinate of rats submitted to chronic, acute and no HBO treatments. We found that the use of a single HBO treatment, albeit one of the longest acute HBO treatment protocols designed for humans (the same that is recommended by the US Navy as decompression treatment), does not produce any structural changes on the rat nasal mucosa. In contrast, chronic HBO treatment (i.e. 30 sessions of 75 minutes, at 2,5 ATA breathing 100% oxygen) was found to cause mild inflammation of the nasal mucosa. This was expressed by moderate leukocyte infiltration of the chorion and by enhancement in the thickness of the nasal epithelial layer. Taking together, the data indicate the safeness for the nasal mucosa of single HBO treatments and adds a note of caution for the repeated, long-term use of HBO in the therapy of different human pathologies that are known to benefit from chronic HBO treatment.

There is previous evidence that the rationale for the potential inflammatory actions of chronic HBO treatment is to be found in the hyperoxia associated with breathing 100% oxygen at an increased pressure. In fact, it has been shown that chronic hyperoxia, by itself, is able to induce hypertrophy of the non-ciliated cuboidal epithelium of rat nasal mucosa and increase in cell replication in the respiratory epithelia<sup>26</sup>. These previously reported alterations of the nasal mucosa were associated with enhancement in the specific activity of several enzymes, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase and of glutathione peroxidase, and with the decrease of activity of cytochrome P450-dependent monooxygenase-catalyzed O-deethylation of 3-cyano-7-ethoxycoumarin<sup>26</sup>. In addition, exposure to ozone ( $O_3$ ) was also found to trigger mucous cell metaplasia, with 25 to 300 times more mucus being collected in nasal transitional epithelium than in control rats, and also to induce a mild to moderate inflammatory cell influx to the nasal mucosa of the proximal and middle nasal passages<sup>27</sup>.

The increased pressure that occurs in the HBO treatment is commonly interpreted as being a mechanical stimulus to the surface of the respiratory tract and alveoli. It was shown to decrease mucociliary transport time, namely under air oscillations of 16 Hz and pressure differences of 200 mmHg<sup>28</sup>. The chronic application of continuous positive airway pressure (CPAP) on the rat nose is able to induce a mild inflammatory reaction mediated by macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) that results in neutrophil extravasation<sup>29</sup>. This rodent chemokine is homologous to human interleukin 8 (IL-8) that is a potent neutrophil chemo-attractant. IL-8 is also increased when mechanical stress by vibration (60 Hz, +/- 0.3 mm) is applied to bronchial and alveolar epithelial cells<sup>30</sup>.

Taking into account these data, namely the recent evidence on CPAP actions on the nasal mucosa, it is pertinent to consider that the inflammatory effects detected in our study are likely to derive from the combined action of 100% O<sub>2</sub> and enhanced atmospheric pressure. It is pertinent to add that, since the microbicidal capacities of neutrophils and macrophages are improved when O<sub>2</sub> pressure is raised in infected areas<sup>31</sup>, HBO promotes the antimicrobial activity of some antibiotics and it also has a direct action on anaerobic bacteria<sup>32</sup>. Thus, our findings of a mild inflammatory reaction of the nasal mucosa after chronic HBO suggests that the decision of prescribing HBO therapy must result from balancing the potential benefits and disadvantages (namely, nasal inflammation) of the therapy for each individual patient.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Mr. Emanuel Monteiro (Department of Anatomy; ICBAS and UMIB, Porto University) for his technical support and collaboration.

## REFERENCES

1. Wattel F, Mathieu D, Methodology for assessing hyperbaric oxygen therapy in clinical practice, In: D. Mathieu (ed.) *Handbook on hyperbaric medicine*, 2006, Springer, Netherlands, 163-170
2. Kirby SD, Deschler DG, Hyperbaric oxygen therapy: application in diseases of the head and neck, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 7: 137-143
3. Jain KK, *Textbook of Hyperbaric medicine*, 3<sup>rd</sup> edn. Hogrefe and Huber Publishers, Seattle, Toronto, Bern, Göttingen
4. Bartlett R. Carbon monoxide poisoning. In: Saunders WB, Haddad LM, Winchester JF, eds. *Clinical management of poisoning and drug overdose*, 3<sup>rd</sup> edition, 1997
5. Moon RE, Sheffield PJ, Guidelines for treatment of decompression illness, *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 1997; 68(3):234-243
6. McDermott JJ, Dutka AJ, Koller WA, et al., Effects of an increased P0<sub>2</sub> during recompression therapy for the treatment of experimental cerebral arterial gas embolism, *Undersea Biomed Res* 1992; 19(6):403-413
7. Bouachour MD, Cronier P, Gouello JP, et al., Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 1996; 41(2): 333-339
8. Neovius EB, Lind MG, Lind FG, Hyperbaric oxygen therapy for wound complications after surgery in the irradiated head and neck: a review of the literature and a report of 15 consecutive patients, *Head & Neck* 1997; 19:315-322
9. Dundar K, Gumus T, Ay H, et al., Effectiveness of hyperbaric oxygen on sudden sensorineural hearing loss: prospective clinical research, *J Otolaryngol* 2007 Feb; 36(1):32-7
10. Desloovere C, Knecht R, Germonpré P, Hyperbaric oxygen therapy after failure of conventional therapy for sudden deafness, *B-ENT* 2006;2(2):69-73
11. Racic G, Maslovava S, Roje Z, et al., Hyperbaric oxygen in the treatment of sudden hearing loss, *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2003 Nov-Dec;65(6):317-20
12. Topuz E, Yigit O, Cinar U, et al., Should hyperbaric oxygen be added to treatment in idiopathic sudden sensorineural hearing loss? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004 Aug;261(7):393-6. Epub 2003 Oct 29

13. Narozny W, Sicko Z, Stankiewicz CZ, et al., The effect of hyperbaric oxygen on nasal mucociliary transport Clin Otolaryngol Allied Sci 2002; 27(3):140-6
14. Sahni T, Hukku S, Jain M, et al., Recent Advances in Hyperbaric Oxygen Therapy. Medecine update 2004; 14: 632-639
15. Neumeister M, Cram A, Talavera F, et al., Hyperbaric oxygen therapy. Updated 2004 Nov. Available at: <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>. Accessed November 12, 2008
16. Oter S, Topal T, Sadir S, et al., Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min, Aviat Space Environ Med. 2007 Dec;78(12):1108-13
17. Chavko M, Mahon RT, McCarron RM, Mechanisms of protection against pulmonary hyperbaric O<sub>(2)</sub> toxicity by intermittent air breaks, Eur J Appl Physiol. 2008 Mar;102(5):525-32. Epub 2007 Nov 22
18. Di Sabato F, Giacovazzo M, Cristalli G, et al., Effect of hyperbaric oxygen on the immunoreactivity to substance P in the nasal mucosa of cluster headache patients. Headache 1996; 36(4): 221-3
19. Vera-Cruz P, Ferreira M, Zagalo C, et al., Chronic hyperbaric oxygen therapy and the human nasal mucosa: increased thickness of epithelium basement membrane and moderate neutrophilic infiltration, Rhinology (in press)
20. Na DH, Youn YS, Park EJ, et al., Stability of PEGylated salmon calcitonin in nasal mucosa, J Pharm Sci, 93(2):256-61, 2004 Feb
21. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone; 5<sup>th</sup> edn; 2002
22. Collan Y, Stereology and morphometry in pathology: an introduction. In: Collan Y, ed. Stereology and morphology in pathology, Kuopio, Finland: Kuopio University Press; 1984:5-11
23. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al., Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994, Am J Surg Pathol 1996; 20(10):1161-81
24. Silva MT, Appleberg R, Silva MNT, et al., In vivo killing and degradation of *Mycobacterium avium* within mouse peritoneal macrophages, Infect Immunol 1987; 55: 2006-2016

25. Águas AP, The use of osmium tetroxide-potassium ferrocyanide as an extracellular marker in electron microscopy, *Stain Technology* 1982; 57:69-73
26. Nikula KJ, Sabourin PJ, Frietag BC, et al., Biochemical and morphologic responses of rat nasal epithelia to hyperoxia, *Fundam Appl Toxicol.* 1991 Nov;17(4):675-83
27. Harkema JR, Morgan KT, Gross EA, et al., Consequences of prolonged inhalation of ozone on F344/N rats: collaborative studies. Part VII: Effects on the nasal mucociliary apparatus. *Res Rep Health Eff Inst.* 1994 Nov;(65 Pt 7):3-26; discussion 27-34
28. Deitmer T, Muller S, Effect of low frequency air oscillations on nasal mucociliary transport, *Acta Otolaryngol* 1992; 112(1):102-6
29. Almendros I, Acerbi I, Vilaseca I, et al., Continuous positive airway pressure (CPAP) induces early nasal inflammation, *Sleep.* 2008 Jan 1;31(1):127-31
30. Puig F, Rico F, Almendros I, et al.. Vibration enhances interleukin-8 release in a cell model of snoring-induced airway inflammation. *Sleep.* 2005;28:1312–16.
31. Hohn, DC, MacKay RD, Halliday B, et al., The effect of oxygen tension on the microbicidal function of leukocytes in wounds and *in vitro*, *Surg Forum*, 1976, 27, 18-20
32. Mathieu D, Wattel F, Physiologic effects of hyperbaric oxygen on microorganisms and host defences against infection, In: D. Mathieu (ed.) *Handbook on hyperbaric medicine*, 2006, Springer, Netherlands, 163-170

Table 1 Quantitative comparison of epithelial and basement membrane thickness between samples of the *concha nasalis ventralis* of HBO-treated and control patients.

TABLE 1 Thickness in Micra of the Nasal Epithelium and Basement Membrane			
	HBO exposed group	<i>P</i> value	
Control group	1 Session		
Epithelium	$21,6 \pm 5,6$	$23,1 \pm 7,4$	0,33
Basement Membrane	$3,5 \pm 1,2$	$3,8 \pm 1,3$	0,37
	HBO exposed group	<i>P</i> value	
Control group	30 Sessions		
Epithelium	$21,6 \pm 5,6$	$43,4 \pm 9,4$	< 0,05
Basement Membrane	$3,5 \pm 1,2$	$3,8 \pm 1,3$	0,37

Table 2. Semiquantitative scoring of inflammatory infiltrates by leukocytes of the epithelium and chorion of the *concha nasalis ventralis* in HBO-treated and in control patients.

Table 2. Leukocyte Infiltration of the Nasal Epithelium and Chorion								
Mononuclear Epithelium Infiltration			Mononuclear Chorion Infiltration			Neutrophilic Chorion Infiltration		
Control	1 Session	30 Sessions	Control	1 Session	30 Sessions	Control	1 Session	30 Sessions
0	0	0	0	0	+	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	+
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	+	0	0	0
0	0	+	0	0	++	0	0	+
0	0	+	0	0	+	0	0	0
0	0	0	0	0	+	0	0	+
0	0	0	0	0	+	0	0	+

FIGURE 1 – United States Navy decompression treatment protocol table 6

FIGURE 2 – Light microscopy of the rat turbinal mucosa showing the increase in thickness of the epithelium that is seen in rats submitted to 30 HBO sessions (B) in comparison with that of untreated rats (A). H&E staining, x600.

FIGURE 3 – Light microscopy of the nasal mucosa showing leukocyte infiltration of the lower turbinate chorion of rats submitted to chronic HBO treatment. H&E staining, x400.

FIGURE 4 – Micrograph obtained by transmission electron microscopy of the epithelium of the lower turbinate of a rat submitted to chronic HBO treatment. No significant changes are observed in the ultrastructure of the epithelial cells. x2800

FIGURE 1

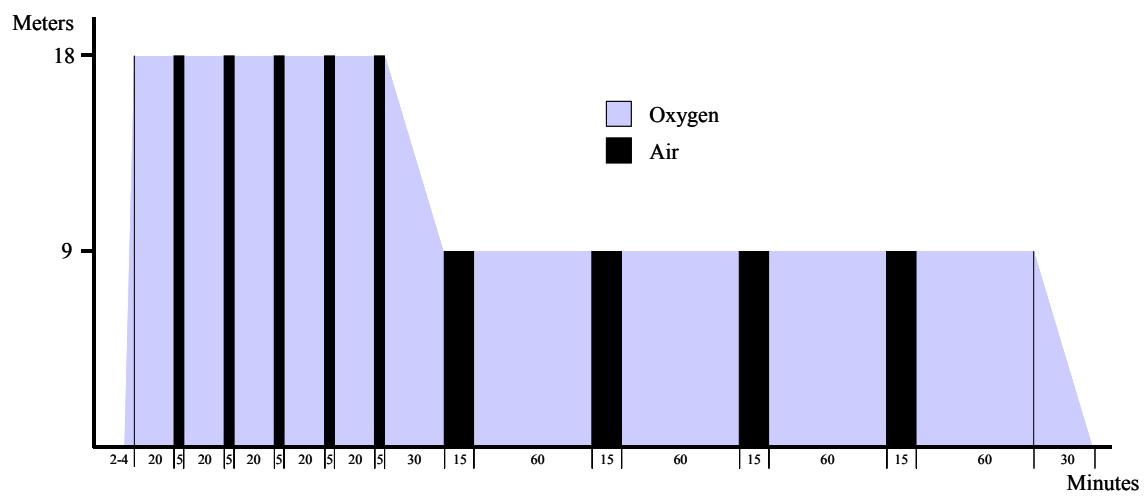


FIGURE 2

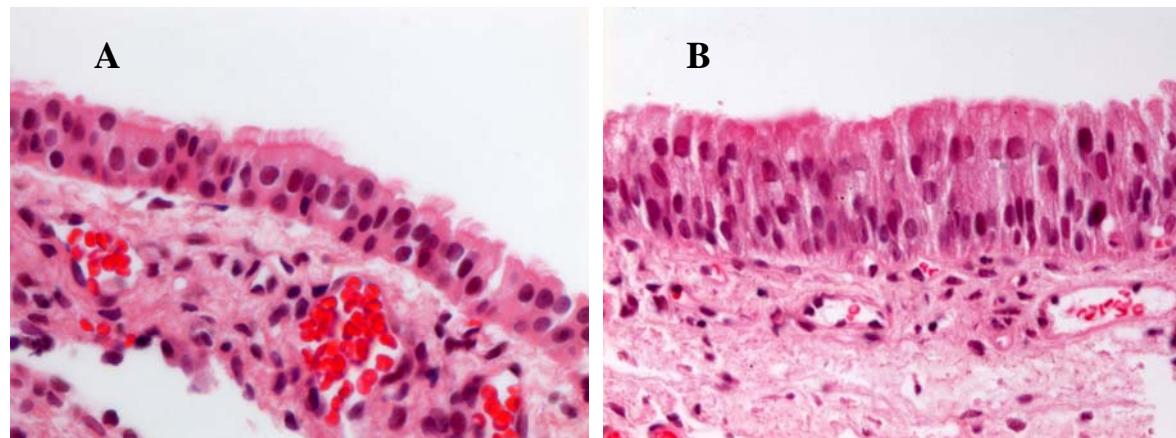


FIGURE 3

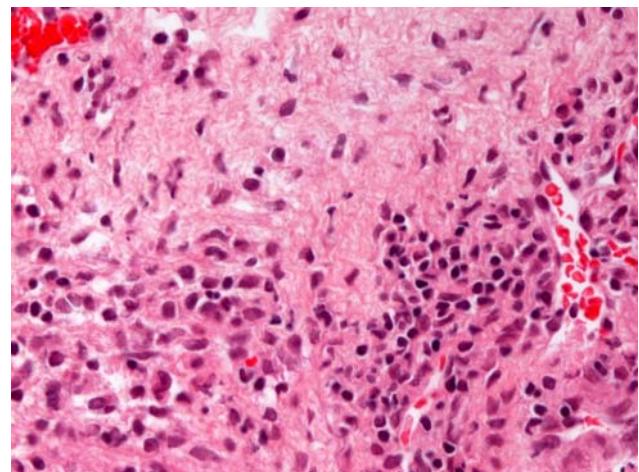
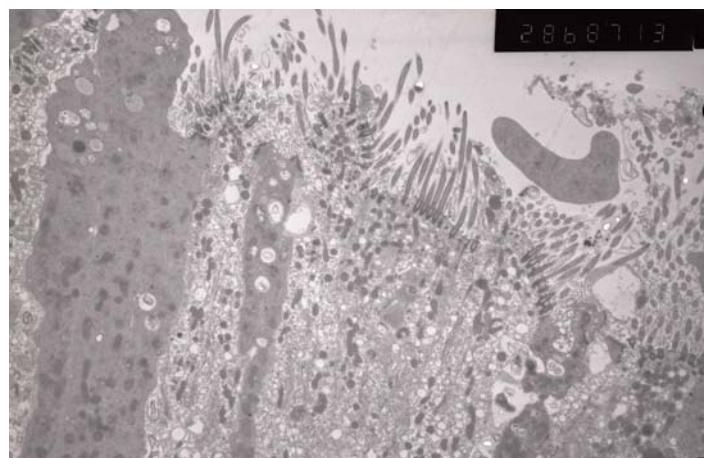


FIGURE 4



**5 - Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week  
Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin**

**Article title:** Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin

**Authors:**

- Paulo Vera-Cruz, MD; Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital da Marinha, Lisboa, Portugal.
- Marco Ferreira, MD; Serviço da Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa, Portugal.
- Carlos Zagalo, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.
- José Martins dos Santos, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.
- Artur P. Águas, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, ICBAS and UMIB, Porto, Portugal.

**Institutions where the work was done:** Hospital da Marinha, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Instituto Superior de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal, European Union.

**Address for Correspondence:**

Paulo Vera-Cruz, MD

Rua Poeta Bocage 18, 3º Dto, 1600-581 Lisboa, Portugal

Phone : (00351)919033932 ; Fax : (00351)217267261 ; Email : [p\\_vera\\_cruz@netcabo.pt](mailto:p_vera_cruz@netcabo.pt)

## **Moderate Leukocyte Infiltration in the Lower Turbinate Mucosa after a Two-Week Intranasal Administration of Mometasone Furoate, Azelastine or Salmon Calcitonin**

### **Summary**

*Objective:* We used light microscopy to search for local changes of the nasal mucosa associated with daily intranasal administration of mometasone furoate (MF), azelastine (AZ) or salmon calcitonin (SC).

*Study Design:* Biopsies of the lower nasal turbinate were obtained from four groups of 8 individuals after 14 days of daily administration of a saline solution (control group) or of MF, AZ and SC.

*Methods:* Small biopsies of the anterior portion of the lower nasal turbinate were collected with the help of a Hartmann forceps under direct visual inspection. The samples were processed for light microscopy and morphometric analysis. Inflammatory infiltration (neutrophils and lymphocytes) of the nasal mucosa was evaluated by a semiquantitative method. Unpaired *t* test and Bernoulli distribution were applied to evaluate statistical differences between data from the different groups of samples.

*Results:* Samples of the turbinate mucosa of all of the drug-treated groups showed a moderate enhancement in infiltrating neutrophils when compared with the samples from the control group. Infiltration of lymphocytes in the turbinate chorion was significantly different from controls only in the MF and AZ-treated groups.

*Conclusions:* Intranasal treatment with MF, AZ or SC does not cause significant changes in the general architecture of the nasal mucosa. A moderate inflammatory response of the turbinate mucosa, that was expressed by leukocyte infiltration of epithelium and chorion, was observed in all of the 3 drug-treated groups of patients after the 2-week course of intranasal deposition of MF, AZ or SC.

**Key-words:** Corticosteroid; Antihistaminic; Calcitonin; Nasal Mucosa; Basement Membrane; Neutrophil.

## **Infiltration modérée de leucocytes de la muqueuse du cornet inférieur après deux semaines d'administration de Furoate de Mométasone , Azélastine ou Calcitonine de Saumon**

### **Résumé**

*Objectif:* Nous utilisons la microscopie optique pour chercher des changements de la muqueuse nasale associés à l'utilisation quotidienne de furoate de mométasone (MF), azélastine (AZ) ou calcitonine de saumon (SC), administrés par voie intra-nasale.

*Plan d'étude:* On a obtenu des biopsies du cornet inférieur dans quatre groupes de 8 individus après 14 jours d'administration quotidienne d'une solution saline (groupe de contrôle) ou MF, AZ et SC.

*Méthode:* Avec une pince de Hartmann on a prélevé de petites biopsies de portion antérieure du cornet inférieur, sous visualisation directe. Les échantillons ont été traités par microscopie optique et analyse morphométrique. L'infiltration inflammatoire (neutrophiles et lymphocytes) de la muqueuse nasale a été évaluée par une méthode semi-quantitative. Un test de *t* et la distribution de Bernoulli ont été appliqués afin d'évaluer les différentes statistiques entre les données des différents groupes d'échantillons.

*Résultats:* Les échantillons de la muqueuse du cornet de tous les groupes soumis à un traitement avec les médicaments, ont montré une augmentation de l'infiltration de neutrophiles quand ils sont comparés avec les échantillons du groupe de contrôle. L'infiltration de lymphocytes dans le chorion du cornet est significativement différente entre les contrôles et, seulement les groupes soignés avec MF et AZ.

*Conclusions:* Le traitement intra-nasal avec MF, AZ ou SC ne provoque pas de changements significatifs dans l'architecture générale de la muqueuse nasale. On a observé une réponse inflammatoire modérée de la muqueuse du cornet dans les groupes de malades sur lesquels on a administré MF, AZ ou SC pendant deux semaines, par voie intra-nasale.

**Mots-clés:** Corticostéroïde; Antihistaminique; Calcitonine; Muqueuse Nasale; Membrane basale; Neutrophiles

## **INTRODUCTION**

The nasal mucosa is the potential target of chemical aggressions coming from the environment, namely those due to air pollution or to smoking. This mucosa is also exposed to chemicals that are employed in medical therapeutics aiming either at local treatment of the upper respiratory tract or that use the nasal route for the systemic delivery of drugs. A number of previous studies have indicated that the use of the intranasal route for drug delivery does not result in significant long-term changes of the upper respiratory tract. We have decided to revisit this issue by investigating the short-term effects on the nasal mucosa (i.e. after two weeks of daily treatment) of administration of three pharmacological agents that are currently prescribed for intranasal deposition.

For the current study, we have chosen pharmacological agents that belong to three of the most common families of drugs used for intranasal administration: a corticosteroid (mometasone furoate, MF), an antihistaminic drug (azelastine, AZ), and a hormone (salmon calcitonin, SC). We have found that after two weeks of daily intranasal administration of these pharmacological agents, albeit finding no change in the general structure of the epithelium and chorion of the lower turbinate, there was significant leukocyte infiltration of the nasal mucosa. Therefore, we conclude that a moderate local inflammatory response may be a general short-term effect of administration of drugs by the nasal route.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Drugs Chosen for Intranasal Administration**

We have chosen a corticosteroid, an antihistaminic and a hormone to investigate the local effects of short-term intranasal administration of pharmacological agents. We summarize now the major pharmacological features of the three drugs used in this study.

Mometasone furoate (MF,  $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$ ; molecular mass 539,45 g/mol) is a corticosteroid with local anti-inflammatory effect that is used to treat skin, nose and lung disorders (1). After absorption it binds to plasma proteins and is metabolized in the liver and in other organs (1, 2). MF is eliminated from the body mainly by biliar and renal excretion (1). Despite its lower bioavailability, MF is reported to have systemic effects when administrated orally (2, 3, 4). When administrated in the nose, the bioavailability of MF is negligible probably because of its lower aqueous solubility. Local effects include anti-edema activity (5), and decrease in neutrophilic and

eosinophilic infiltrates (6, 7), and in Ig E production because of impairing antigen-presentation of T-cell specific antigens (8, 9).

Azelastine hydrochloride (AZ, C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub>O; molecular mass of 381.898 g/mol) is an ocular and intranasal second generation phthalazinone with H<sub>1</sub> antihistaminic effect. It is available worldwide in spray presentation and is used for the treatment of seasonal allergic rhinitis and perennial allergic rhinitis. The bioavailability of AZ is 40% and the half-life is 22 hours. AZ improves nasal symptoms of rhinitis, including congestion and postnasal drip, and the drug has a rapid onset of action (10). It promotes a significant decrease in transepithelial resistance of electrolyte transport and acts on chemical mediators of inflammation including leukotrienes, kinins, and platelet activating factor, both *in vitro* and *in vivo* (11). AZ has been shown to downregulate intercellular adhesion molecule-1 expression and reduce inflammatory cell migration

in patients with rhinitis (10).

Salmon calcitonin (SC, C<sub>145</sub>H<sub>240</sub>N<sub>44</sub>O<sub>48</sub>S<sub>2</sub>, molecular mass of 3431.85 g/mol) is a synthetic polypeptide with 32 aminoacids, with a more durable effect than endogenous calcitonin. Calcitonin function is related with bone metabolism cooperating with parathyroid hormone in the calcium plasma homeostatic control. SC is prescribed mostly to women for post-menopause osteoporosis treatment. After nasal absorption plasma maximum concentration is achieved between 31 and 39 minutes (12). Bioavailability of SC is low (approximately 3% of the results obtained with an intramuscular administration with the same doses) probably because of nasal mucosa proteolytic enzyme action (13). SC half-life is 43 minutes. (12) Nasal application of SC allows a faster absorption of the hormone and avoids the first passage effect through the liver and through the gastrointestinal tract (13).

## **Patients**

Four groups of 8 individuals were chosen for this investigation. The control, MF and AZ-treated groups comprised 8 adult men that were scheduled for nasal septal functional surgery. The SC group comprised 8 women with the diagnosis of osteoporosis and indication for treatment with SC. All individuals received daily sprayings for 14 days. A small biopsy of the nasal lower turbinate was collected from all of the patients after the two-week treatment period.

In the control group, a saline solution (0.9% NaCl) was sprayed once daily in each nostril. This group presented an age range of 25-47 years with a mean of 36.89±8.95. The individuals of the MF-treated group were submitted to spraying of Nasomet® (50 µg) in a total daily dose of 100 µg in each nostril. This group presented an age range of 22-55 years with a mean of 37.13±10.09. Patients from AZ- treated group were submitted to two puffs in each nostril twice a day of

Allergodil® (0,14 mg). They presented a age range of 22-46 years with a mean of 34.67 $\pm$ 8.98. The women of the SC-treated group were submitted to one puff per day, alternating the nostril, of Miocalcin® (200 UI). They presented an age range of 64-74 years with a mean of 69.14 $\pm$ 3.90.

### **Ethics Committee Approval**

This research project obtained a previous authorization of the Ethics Committee that oversees clinical investigation at the Portuguese Navy Hospital (Lisbon) where nasal biopsies were collected and studied. Exclusion criteria to eliminate patients from this study were the following: upper airways anatomical abnormalities (with the exception of nasal septal deviation), medical history of asthma, rhinitis, upper airway infection (shorter than 6 weeks), previous trauma or nasal surgery, drug addiction, cigarette smoking or professional exposure to air pollutants.

### **Nasal Biopsies and Light Microscopy**

Samples of the head of the lower turbinate were obtained with a Hartmann forceps (Karl Storz® 634822) under direct visual inspection. Local haemorrhage occurred in every case; in 3 of the patients, compression of the wound was not enough and haemorrhage had to be controlled with cauterization using silver nitrate. The biopsy samples were fixed in buffered 10% formaldehyde, decalcified with 10% nitric acid, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and then embedded in paraffin. Serial 3  $\mu$ m-thick sections were obtained from each tissue block; paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS) stain and Verhoeff stain (14). The epithelium and basement membrane thickness were evaluated using a calibrated eyepiece at original magnification x400. Standard morphometric methods were used to obtain light microscopy measurements (15).

The epithelium and the chorion were assessed for the presence of inflammatory cell infiltrate (polymorphonuclear [PMN] leukocytes and lymphocytes), and the presence of submucosal seromucinous glands was recorded. The inflammatory cell infiltrate (PMN and lymphocytes) was classified as mild (+; scattered inflammatory cells in the epithelium or chorion, with less than 5 leukocytes/high power field [HPF] 400x), moderate (++; inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 5-20 cells/HPF) or intense (+++; dense inflammatory cell infiltrate in the epithelium or chorion, with 21 or more cells/HPF).

### **Statistical Analysis**

Statistical comparison between data from the different groups of samples (treated and control individuals) was performed using the Microsoft Excel® program. Histologic and morphometric differences between control and treated patients were tested with the unpaired *t* test. Measurements

were expressed as mean  $\pm$  SD. A  $p$  value of  $<0.05$  was considered to indicate a significant statistical difference between the two groups. The Bernoulli distribution was used to evaluate the statistical significance of the presence of inflammation.

## RESULTS

Light microscopy analysis of nasal biopsies of the lower turbinate of treated and control individuals showed no significant changes in the general architecture of the nasal mucosa. In most samples, a squamous metaplastic epithelium was observed, as it was expected from the anterior portion of the lower turbinate in a human adult population. We also found that the treatment with the three pharmacological agents did not increase the area of squamous metaplastic epithelium on the nasal turbinate. No differences were found between treated and control groups of samples in what regards the thickness of the whole epithelial layer and of the basement membrane. Tissue sections stained with PAS showed no significant changes among the samples regarding the number of mucous cells. Veroeff staining showed integrity of elastic fibers in all of the samples.

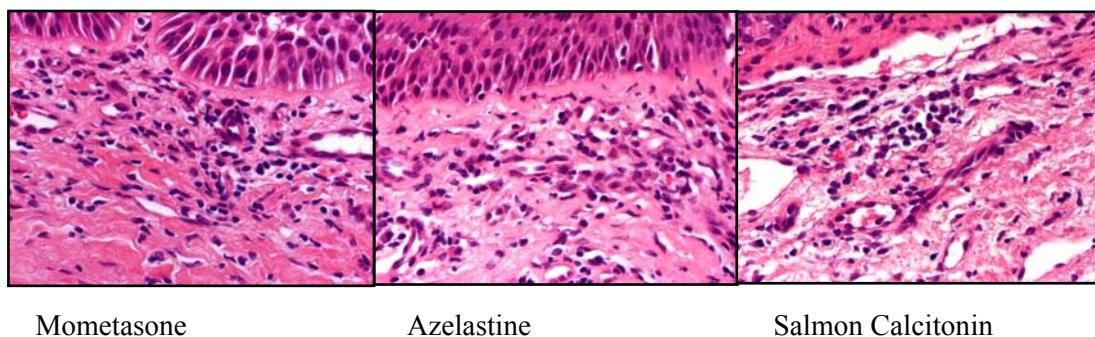
The major difference that was found between samples from treated individuals and controls was a moderate leukocyte infiltration of the lower turbinate mucosa that was seen in the treated individuals, regardless of the drug that was used. This change was absent in the samples from the control group. These infiltrates were seen both in the chorion and in the epithelium of the lower turbinate.

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) were the dominant leukocyte type that was observed both in the epithelium and chorion of the lower nasal turbinate of the treated patients. We have applied a semiquantitative scale (0 to +++) to compare the two major groups of samples (from drug-treated and control patients) with regards to PMN or lymphocyte infiltration. Comparison of these data revealed a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) in PMN infiltration in both epithelium and chorion between samples from drug-treated groups of patients (Figure 1.) and controls. Regarding lymphocyte infiltration of the chorion, comparison of the numerical data failed to reveal a significant difference ( $p=0.16$ ) between the control and SC group of samples. In the MF and AZ groups, however, there was a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) in lymphocytic infiltration with regards to controls. One individual from the MF-treated group, another from AZ-treated one and two from SC-treated group did not reveal any inflammatory infiltration (Table 1).

Table 1. PMN infiltration in the chorion

Control	MF	AZ	SC
0	0	+	0
0	+	++	+
0	++	0	++
0	+	+	+
0	+	+	+
0	+	+	0
0	++	+	+
0	++	+	++

Figure 1. PMN infiltration in the nasal mucosa (H&E 400x)



Mometasone

Azelastine

Salmon Calcitonin

## **DISCUSSION**

The herein investigation documents that short-course drug therapy by the nasal route is associated with a moderate local inflammatory response that is expressed by mild infiltration of the human nasal mucosa by leukocytes, both neutrophils and lymphocytes. We have chosen to study three paradigmatic drugs of intranasal therapeutics: mometasone furoate (MF, a corticosteroid), azelastine (AZ, an antihistaminic), and the hormone calcitonin (salmon calcitonin, SC).

Our data is in contrast with previous reports on the intranasal effects of MF, AZ and SC). In fact: (i) nasal biopsy samples of MF-treated patients showed decrease in focal metaplasia, in both chorion mastocytes and eosinophils, and no effects on epithelium thickness or atrophy (7, 16); (ii) AZ daily nasal administration for 26 weeks to rats causes no inhibition of ciliary beat activity, mucosal atrophy or inflammatory changes (17); and (iii) SC intranasal deposition results in no alterations of the nasal epithelium (18, 19). It must be added that, in agreement with our findings, a previous study has reported increase in neutrophils in the nasal submucosa after 6 weeks of intranasal administration of the corticoid Fluticasone (20).

Taken at face value, our findings suggest caution regarding the prescription of drugs to be delivered by the nasal route because, at least for some of the pharmacological agents commonly used by this route, since it may induced a non-specific initial inflammatory response of the nasal wall, albeit a mild one. Whether this is an early and transient side effect of the intranasal treatment, rather than a permanent change, requires further studies with patients submitted to longer periods of intranasal drug therapy. Therefore, we believe that it is pertinent to add a note of warning with regards the use of the nasal route for drug delivery, in particular in patients with a background that make them prone to inflammatory disorders.

## **CONCLUSION**

Treatment with Mometasone, Azelastine and Salmon Calcitonin causes minor, but nevertheless significant, early changes in the nasal turbinate mucosa, namely epithelial and chorion granulocyte infiltration. Whether these alterations of the nasal mucosa are permanent and may interfere with the therapeutic goals of the drugs is an issue that deserves further investigations.

## References

1. Nasomet monography, Martindale: The complete drug reference on medicines complete, 2007.
2. SAHASRANAMAN S; ISSAR M; HOCHHAUS G; Metabolism of mometasone furoate and biological activity of the metabolites, *Drug Metab Dispos.* 2006 Feb;34(2):225-33. Epub 2005 Oct 26.
3. FARDON TC; LEE DKC; HAGGART K; MCFARLANE LC; LIPWORTH BJ; Adrenal suppression with dry powder formulations of fluticasone propionate and mometasone furoate. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 960–966.
4. MELTZER EO; WENZEL S; The efficacy and safety of mometasone furoate delivered via a dry powder inhaler for the treatment of asthma, *J Asthma.* 2006 Dec; 43(10):765-72.
5. TAS A; YAGIZ R; YALCIN O; UZUN C; HUSEYINOVA G; ADALI MK; KARASALIHOGLU AR; Use of mometasone furoate aqueous nasal spray in the treatment of rhinitis medicamentosa: an experimental study, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Apr; 132(4):608-12.
6. CIPRANDI G; TOSCA MA; PASSALACQUA G; CANONICA GW; Intranasal mometasone furoate reduces late-phase inflammation after allergen challenge, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Apr; 86(4):433-8.
7. MINSHALL E; GHAFFAR O; CAMERON L; O'BRIEN F; QUINN H; ROWE-JONES J; DAVIES RJ; PRIOR A; LUND VJ; MACKAY IS; NOLOP K; LUTSKY B; DURHAM SR; HAMID O; Assessment by nasal biopsy of long-term use of mometasone furoate aqueous nasal spray (Nasonex) in the treatment of perennial rhinitis, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 May; 118(5):648-54.
8. TSUMURO T; OGAWA M ; MINAMI K ; TAKUBO M ; RAHMAN A ; FUGII Y; Effects of mometasone furoate on a rat allergic rhinitis model, *Eur J Pharmacol.* 2005 Nov; 7;524(1-3):155-8. Epub 2005 Oct 26.
9. SUGIMOTO Y; ISHIZAWA K; SAITOU K; SUZUKI G; TARUMI T; NAKAHARA H; KIRINO Y; KAMEI C, Effect of mometasone furoate by topical application on allergic rhinitis model in rats, *Pharmacology.* 2000 Aug; 61(2):91-5.
10. BERNSTEIN JA; Azelastine hydrochloride: a review of pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability, *Curr Med Res Opin* 2007 Oct ; 23(10):2441-52.

11. JEPSEN M; GRAHAM S; KARP PH; ZABNER J; Effect of topical nasal pharmaceuticals on sodium and chloride transport by human airway epithelia, *Am J Rhinol.* 2000 Nov-Dec; 14(6):405-409.
12. Miacalcin monography, Martindale: The complete drug reference on medicines complete, 2007
13. NA DH; YOUN YS; PARK EJ; LEE JM; CHO OR; LEE KR; YOO SD; DELUCA PP; LEE KC; Stability of PEGylated salmon calcitonin in nasal mucosa, *J Pharm Sci.* 2004 Feb; 93(2):256-61.
14. BANCROFT JD, GAMBLE M. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone; 5th edn; 2002
15. COLLAN Y, Stereology and morphometry in pathology: an introduction. In: Collan Y, ed. Stereology and morphology in pathology, Kuopio, Finland: Kuopio University Press; 1984:5-11
16. SALIB RJ, HOWARTH PH, Safety and tolerability profiles of intranasal antihistamines and intranasal corticosteroids in the treatment of allergic rhinitis, *Drug Saf.* 2003; 26(12):863-93.
17. ACHTERRATH-TUCKERMANN U; BERTHOLD K; ROUX J; PROCTER BG; McDONALD P; SZELENVI I; SOFIA RD; HERBST M; Experimental studies on acute and chronic action of azelastine on nasal mucosa in guinea pigs, rats and dogs, *Arzneimittelforschung.* 1997 Nov; 47(11):1230-2.
18. HONDA N; SAITO H; YAMADA T; NODA I; Basic study on the effect of nasally administered salmon calcitonin preparation on the nasal ciliary epithelium, *Auris Nasus Larynx.* 1992; 19(2):115-23.
19. GARIBOLDI LM; BOLLA I; BARONI MC; DELSIGNORE R; PASSERI M; BARBERIS F; Long-term local tolerability to intranasally administered salmon calcitonin in post-menopausal osteoporosis, *Minerva Med.* 1992 Dec 83(12):827-31.
20. RAK S; JACOBSON MR; SUDDERICK RM; MASUYAMA K; JULIUSSON S; KAY AB; HAMID Q; LÖWHAGEN O; DURHAM SR; Influence of prolonged treatment with topical corticosteroid (fluticasone propionate) on early and late phase nasal responses and cellular infiltration in the nasal mucosa after allergen challenge, *Clin Exp Allergy.* 1994 Oct 24(10):930-9.

## **6 - Hyperbaric oxygen improves nasal air flow**

**Article title:** Hyperbaric oxygen improves nasal air flow

**Authors:**

Paulo Vera-Cruz, MD; Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital da Marinha, Lisboa, Portugal.

José Croca, MD; Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital da Marinha, Lisboa, Portugal.

Carlos Zagalo, MD, PhD; Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal.

**Short running title:** HBO improves nasal air flow.

**Corresponding author:**

Paulo Vera-Cruz, MD

Rua Poeta Bocage 18, 3º Dto, 1600-581 Lisboa, Portugal

Phone: (00351)919033932; Fax : (00351)217267261 ; Email: [p\\_vera\\_cruz@netcabo.pt](mailto:p_vera_cruz@netcabo.pt)

## **ABSTRACT**

*Objective:* We have investigated whether hyperbaric oxygen (HBO) treatment is able to cause any changes in nasal peak inspiratory flow (NPIF) values of patients submitted to this therapy.

*Study Design:* NPIF was measured in a group of 13 patients that were submitted to at least 10 sessions of 75 minutes long HBO treatments for a period of 20 days. HBO was prescribed to the patients to treat hearing loss, diabetic ulcers or chronic inflammatory disease. Three timings were chosen to perform the NPIF measurements: during HBO, 5 minutes before and 5 minutes after the treatment.

*Methods:* For NPIF evaluation, the highest inspiratory flow of three inspirations was recorded. To search for statistical differences between NPIF measurements at the three different timings of the HBO treatment, we have analysed the data using the repeated measures ANOVA test with the Epsilon lower bound correction for the F ratio.

*Results:* NPIF values were significantly higher when the patients were inside the HBO chamber when compared with NPIF measurements obtained in the same individuals 5 min before starting or 5 min after ending the treatment. A small, but significant, increase in NPIF values was detected in patients 5 min after stopping the HBO treatment, in comparison with values obtained 5 min before initiating the therapy. NPIF values remained stable along the 10 HBO sessions, i.e. with repetition of the HBO treatments, NPIF values were not further enhanced.

*Conclusions:* Exposure to HBO causes significant improvement in nasal air flow. This increase is restricted mostly to the period that the patients are inside the hyperbaric chamber. Further investigations are needed to determine the relative contributions of enhancement in air pressure and in oxygen concentration (that characterize HBO) in the enhancement of nasal air flow. The herein finding may be helpful in future investigations on the treatment of nasal or sinus diseases.

*Hyperbaric Therapy; Oxygen; Nasal Peak Inspiratory Flow.*

## INTRODUCTION

Nasal mucociliary function is known to increase both in hyperbaric and in pure oxygen breathing (1). Reversely, under hypobaric hypoxia conditions, for instance when breathing at high altitude, there is decrease in nasal flow (2). The controlled environmental conditions inside a hypobaric chamber have refuted the hypothesis that nasal blockage at altitude is due to the inhalation of cold and dry air (3). It is pertinent to recall that normal nasal function is of great importance to prevent diving accidents involving the middle ear and the nasal sinuses (4).

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) consists in the delivery of 100% oxygen to patients at pressures that are 2-3 times higher than those at sea level (1). The patients are kept inside a hyperbaric chamber and the increased pressure aims at enhancing the amount of oxygen dissolved in the plasma. The therapeutic actions of HBO are related with direct physical effects of oxygen on blood and tissues and also with a number of secondary physiological and biochemical benefits (5,6). The Undersea and Hyperbaric Medical Society has approved the use of HBO in the treatment of several clinical conditions that are ameliorated by increase in the availability of oxygen to tissues.

Since it has been generally considered that hypobaric hypoxia decreases nasal flow, we have decided to test the hypothesis that HBO may have the opposite effect, i. e. that this treatment, contrary to general expectations, will improve nasal air flow. For that, we have evaluated nasal function before, during and after HBO treatment of patients by determining the nasal peak inspiratory flow (NPIF) values. The question is relevant for patients with nasal obstruction related with rhinitis, when these patients are submitted to HBO with the goal of treating pathologies that are not located in the airways. If the oral breathing, that is common in patients with nasal obstruction, will be replaced by physiological nose breathing, then the HBO session can be more comfortable and, in addition, middle ear and the sinus symptoms are expected also to decrease. Finally, it is pertinent to recall that the subjective sensation of nasal obstruction modulates the values for nasal airflow (7), such as the NPIF that we have measured in the herein investigation.

## MATERIALS AND METHODS

**Hyperbaric Oxygen (HBO).** The HBO treatment took place in a multiplace Hyperbaric Chamber (Haux® – Starmed 2200) in the presence of a nurse. All HBO-treated patients finished 10 sessions of HBO therapy at 2.5 ATA (1 atmosphere absolute – ATA) for 75 minutes per session and during a total period of 20 days. They made one session each day and at the same hour. The total length of patient stay in the chamber for each session was 100 minutes because of the time

needed for compression (10 minutes) and decompressing (15 minutes). The pressure was obtained by compressed air and the patients breathed 100 % humidified oxygen through tightly fitted (nose and mouth) masks, expiring through large tubes connected with valves to the space outside the chamber.

**Patients.** A group of 13 patients were chosen for this study. HBO had been prescribed to these patients because of the diagnosis of sudden neurosensory hearing loss (8 patients), lower-extremity diabetic ulcers (3 patients) radiation-induced cystitis (1 patient) and Buerger disease (1 patient). The group was made up of 8 men and 5 women, with ages ranging 21-76 years, with a mean of  $51,9 \pm 18,3$  years. This research project was approved by the Ethics Committee of the Portuguese Navy Hospital (Lisbon), where the investigation was done. All subjects gave their written informed consent to participate in the study. Exclusion criteria to eliminate patients from the study were the following: all criteria that exclude patients from HBO therapy, upper airways anatomical abnormalities, history of asthma, rhinitis, upper airway infection (shorter than 6 weeks), previous trauma or nasal surgery, drug addiction, cigarette smoking or professional exposure to air pollutants. In order to investigate whether the NPIF values of the patients were different or not from those of a healthy population, we have also obtained spirometric data from a second group of individuals. This second group of healthy volunteers was made up of 4 men and 8 women. They presented an age range of 25-57 years with a means of  $43,5 \pm 11,7$ . Their body mass index (BMI) was not significantly different from that of the group of patients. Two NPIF measurements, separated by 100 min, were performed at normal oxygen and pressure conditions in this healthy population.

**Study Design:** This study took place over 20 days in the Portuguese Navy Hospital, Lisbon, Portugal. The hospital building is located 20 meters higher than sea level. The temperature inside the hyperbaric chamber was at 21°C. During the treatment, temperature decreased 0.5 °C under maximum pressure. The relative humidity in the air inside the chamber was 55%. All NPIF measurements were made using a In-check™ ATS97 inspiratory flow meter (Clement Clarke International, UK) fitted with a nose and mouth mask. The patients placed the spirometer against their faces, ensuring a close sealing, and then inhaled, as strongly as they were able to, through the nose from residual volume, with a closed mouth. The highest inspiratory flow of 3 inspirations was recorded. The HBO-treated group performed an NPIF evaluation 5 min before beginning the treatment, a second one when they reached the maximum pressure and a last one 5 min after the end of the treatment. The numerical data were compared using repeated measures ANOVA applied with the Epsilon lower bound correction for the F ratio. The SPSS™ 16.0 Version statistical software package was used. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

We have obtained values of the NPIF parameter before, during and after HBO treatment of a group of 13 patients. In order to compare NPIF values from these three timings, we have chosen repeated measures ANOVA as the statistical method, since multiple comparisons were sought at three different timings. The assumption of sphericity for repeat measures ANOVA, checked by using the Mauchly's test, was violated. Therefore, a multivariate test was applied and showed that the average NPIF of the subjects differs significantly between the times of measurement ( $p = 0,001$ ). In order to compare the mean values of NPIF at different times, post-hoc tests were applied.

We found that HBO treatment of patients (Table 1) caused a transient NPIF increase from  $149,4 \pm 12,0$  l/min (at sea level and before treatment) to  $176,4 \pm 16,0$  l/min (under increased pressure, 2,5 ATA, and enhanced oxygen concentration). This 18% increase was statistically significant ( $p = 0,001$ ). After the HBO treatment the NPIF of the patients was  $158,4 \pm 13$  l/min; this value was 6% higher than the value before treatment and was significant different from it ( $p = 0,007$ ). The difference between NPIF values during and after treatment is also statistically significant ( $p = 0,009$ ).

During the HBO treatment, NPIF had a linear rise of 3 l/min/day in all evaluations (before HBO, at 2,5 ATA and after HBO). Linear modelling is quite significant:  $p = 1,8 \pm 10^{-5}$  for the evaluation before HBO,  $p = 1,1 \pm 10^{-3}$  at 2,5 ATA evaluation,  $p = 2,1 \pm 10^{-4}$  for the evaluation after HBO. p values for r values were calculated using one tail T test (Figure 1). When comparing NPIF values obtained at each of the 10 HBO sessions of treatment of the same individual, we found no significant differences in homologous NPIF measurements.

We have also decided to investigate whether the values of NPIF of the patients that were submitted to HBO were different from those of a population of healthy volunteers (Table 2). For that we have obtained two NPIF measurements (separated by 100 minutes) in a population of healthy volunteers that were not submitted to HBO. In this group of individuals, the mean NPIF in  $t = 0$  min was  $141,6 \pm 48,3$  l/min and in  $t = 100$  min was  $144,4 \pm 45,7$  l/min. The difference between the measurements in  $t = 0$  min and  $t = 100$  min was not statistically significant ( $p = 0,21$  - using two tailed T test for paired samples). Linear modelling was used and showed no significant variation ( $p = 0,48$  for r value – using two tailed T test) (Figure 2). These data also showed that there was no significant difference between NPIF data obtained in our patients (when not under HBO therapy) and in healthy volunteers.

## **DISCUSSION**

This investigation reports that when patients are under HBO therapy, there is a significant increase in their values of nasal inspiratory peak flow (NPIF). We also document that this enhancement is not amplified by the repetition of the HBO treatment, and it is transient since it sharply decreased shortly after the patients stopped the HBO treatment. The increase in atmospheric pressure and the enhancement in blood oxygen that characterize the HBO treatment are likely to contribute to the herein reported increase in nasal peak flow values during HBO therapy. Since hyperoxic vasoconstriction in the microcirculation is a local vascular response to increase in PO<sub>2</sub> in the tissues, a certain threshold must be achieved to trigger this mechanism, i. e. under that PO<sub>2</sub> threshold, the vasoconstrictive effect does not occur (8). Considering a healthy nose submitted to HBO, the underlying mechanism to an increase in the peak nasal flow may be the hyperoxic vasoconstriction of nose metarterioles and capillaries.

Our data stand on values obtained by NPIF. This is a reliable method to evaluate nasal airway patency (9). NPIF has been used, for instance, in testing the effects of drugs and in nasal allergen challenge (10). NPIF is viewed as being as accurate as acoustic rhinometry and active anterior rhinomanometry (11,12). Clearly, the herein reported increase in NPIF values during exposure to HBO have to be first associated with oxygen saturation of blood and the hyperbaric environment that are induced by staying inside the HBO chamber. Conceivable, the treatment will also enhance nasal mucociliary transport since this is an effect that has been previously documented in individuals under HBO therapy (1). Patients with nasal obstruction, particularly those with rhinitis, may have a decrease in turbinate volume thus allowing nasal instead of oral breathing. Because nasal breathing results in decrease in patient complain of throat dryness and of middle ear or sinus discomfort, patients with nasal obstruction should be instructed to breath through the nose during the HBO sessions (4, 13).

Taking into account the Undersea and Hyperbaric Medical Society approved recommendations for HBO, it can be conclude that most individuals that are treated by HBO are either old or chronically ill patients that may suffer from alterations of the air pathways. For example, HBO is recommended for the treatment of diabetic polyneuropathy and this disorder is associated with respiratory muscle impairment (14). On one hand, the demonstration that HBO increases nasal patency indicates the therapeutic goal of HBO of achieving blood saturation with oxygen is facilitated by the herein described phenomenon that will also make breathing easier for patients when they are under the HBO chamber conditions. On the other hand, when patients have acute or chronic rhinosinusitis the goal of medical or surgical treatments is to increase ventilation and drainage. The herein investigation suggests that with HBO that goal can also be achieved.

## **CONCLUSION**

HBO improves nasal patency during the period of time that the patients are submitted to this type of therapy. Whether this advantage of HBO treatment will be of significance in the treatment of nasal or sinus disease is a question that deserves further investigations.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Prof. Artur Águas, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, for his support, helpful comments and critical review of the manuscript and to Dr. José Brito, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa for his precious contribution on the statistics.

## **REFERENCES**

1. Narozny W, Sicko Z, Stankiewicz CZ, Przewozny T, Pegiel-Sicko, The effect of hyperbaric oxygen on nasal mucociliary transport Clin Otolaryngol Allied Sci 2002; 27(3):140-6
2. Barry PW, Mason NP, O'Callaghan C, Nasal mucociliary transport is impaired in altitude. Eur Respir J 1997;10:35-37
3. Barry PW, Mason NP, Richalet JP, Nasal peak inspiratory flow at altitude. Eur Respir J 2002 Jan;19(1):16-9
4. Roydhouse N, 1001 disorders of the ear, nose and sinuses in scuba divers. Can J Appl Sport Sci 1985 Jun;10(2):99-103
5. Sahni T, Hukku S, Jain M, Prasad A, Prasad R, Singh K, Recent Advances in Hyperbaric Oxygen Therapy. *Medecine update* 2004; 14:632-639
6. Neumeister M, Cram A, Talavera F, Newsome RE, Slenkovich N, Downey SE, Hyperbaric oxygen therapy. Updated 2004 Nov. Available at: <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>. Accessed May 27, 2008
7. Kjaergaard T, Cvancarova M, Steinsvåg SK, Does nasal obstruction mean that the nose is obstructed? Laryngoscope. 2008 Aug; 118(8):1476-81
8. Mathieu D, Favory R, Collet F, Linke JC, Wattel F, Physiologic effects of hyperbaric oxygen on hemodynamics and microcirculation, In: D. Mathieu (ed.) Handbook on hyperbaric medicine, 2006, Springer, Netherlands, 75-101
9. Dufour X, Gohler C, Delagrande A, Fontanel JP, Klossek JM, Peak Nasal Inspiratory Flow: learning curve for the measurement method and reproducibility, Ann Otolaryngol Chir Cervicofac 2007 Jul;124(3):115-9
10. Starling-Schwanz R, Peake HL, Salome CM et al, Repeatability of peak nasal inspiratory flow measurements and utility for assessing the severity of rhinitis, Allergy 2005 Jun;60(6):795-800
11. Bermüller C, Kirsche H, Rettinger G, Riechelmann H, Diagnostic Accuracy of Peak Nasal Inspiratory Flow and Rhinomanometry in Functional Rhinosurgery, Laryngoscope 2008 Apr;118(4):605-10

12. Wilson AM, Sims EJ, Robb F, Cockburn W, Lipworth BJ, Peak inspiratory flow rate is more sensitive than acoustic rhinometry or rhinomanometry in detecting corticosteroid response with nasal histamine challenge, *Rhinology* 2003 Mar;41(1):16-20
13. Ruhle KH, Nilius G, Mouth breathing in obstructive sleep apnea prior to and during nasal continuous positive airway pressure, *Respiration*. 2008;76(1):40-5. Epub 2007 Nov 28
14. Kabitz HJ, Sonntag F, Walker D, Schwoerer A, Walterspacher S, Kaufmann S, Beuschlein F, Seufert J, Windisch W, Diabetic polyneuropathy is associated with respiratory muscle impairment in type 2 diabetes, *Diabetologia*. 2008 Jan;51(1):191-7. Epub 2007 Nov 22

## Tables and Figures

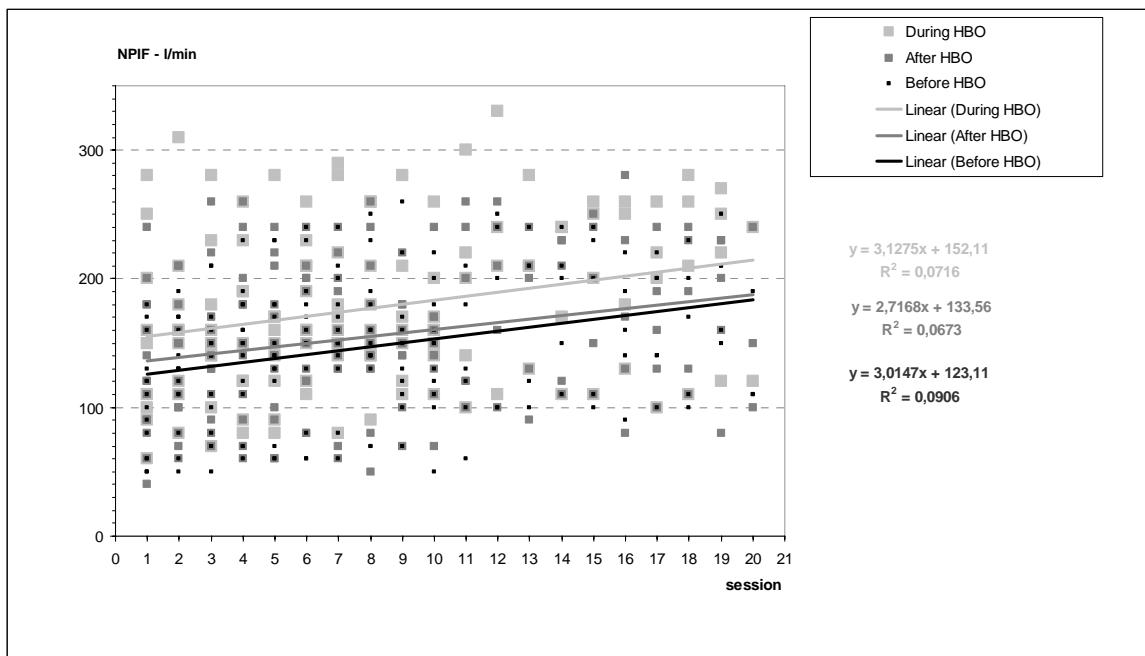
**Table 1.** Biometrics and spirometric data of patients submitted to HBO.

	Age (years)	BMI	NPIF (mean) Sea level (before treatment)	NPIF (mean) 2.5 ATA	NPIF (mean) Sea level (after treatment)
Patient 1	31	25,4	213,2	268,6	228,4
Patient 2	56	32,5	196	231	203
Patient 3	61	33,3	145	163	161
Patient 4	49	31,2	129	154	139
Patient 5	64	25,9	154,7	197	160
Patient 6	64	29,4	185,5	242	195,5
Patient 7	76	27,9	80,5	114	83
Patient 8	72	25,1	99,5	97	107
Patient 9	53	25,7	138	137	131
Patient 10	43	22,8	93,6	110,9	110,9
Patient 11	21	23,4	132,9	144,3	132,9
Patient 12	33	24,5	206,3	253,6	232,5
Patient 13	28	18,9	167,5	181,25	175

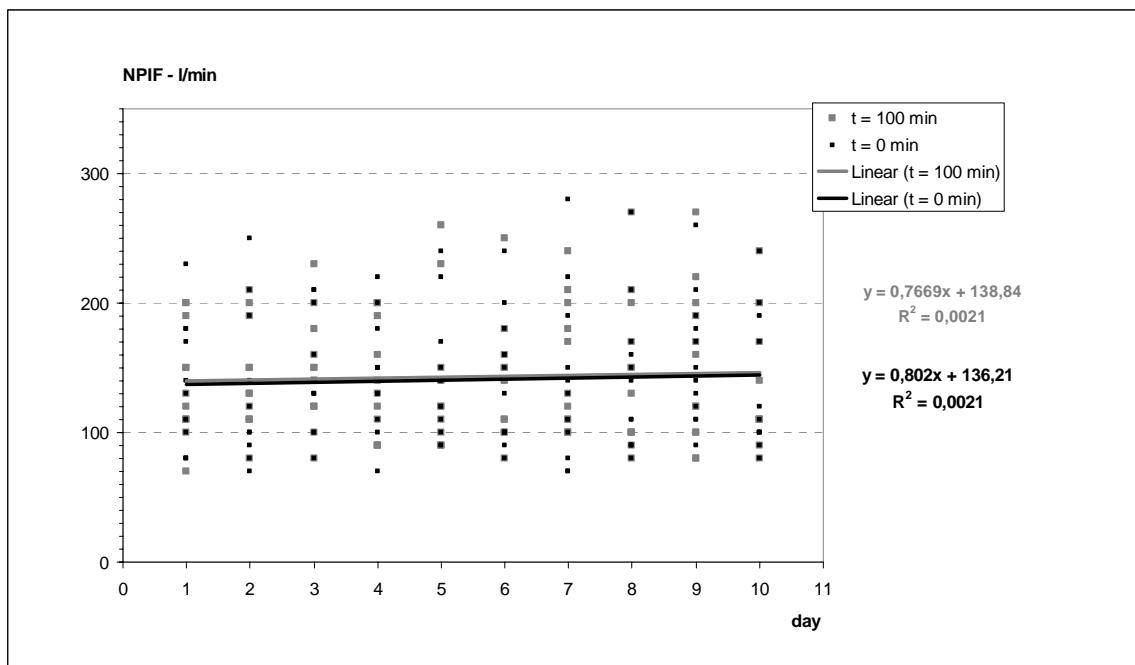
**Table 2.** Biometrics and spirometric data of the group of healthy volunteers (Vol.).

	Age (years)	BMI	NPIF T = 0 min (mean)	NPIF T = 100 min (mean)
Vol. 1	53	29,4	187	194
Vol. 2	36	25,8	91	85
Vol. 3	46	33,9	196	192
Vol. 4	52	27,4	118	117
Vol. 5	38	26,2	163	166
Vol. 6	25	22,9	156	165
Vol. 7	32	23,2	136	134
Vol. 8	26	23,6	102	115
Vol. 9	57	38,9	101	115
Vol. 10	57	24,7	110	113
Vol. 11	53	24,0	96	101
Vol. 12	47	24,6	244	236

**Figure 1.** Linear modelling of NPIF data of the HBO treated patients.



**Figure 2.** Linear modelling of NPIF values of the group of healthy volunteers not submitted to HBO.





## DISCUSSÃO

O presente capítulo final da dissertação pretende apresentar uma discussão de âmbito mais geral do que o que se limita estritamente a discutir os resultados do trabalho científico documentado nos capítulos anteriores. De facto, o formato que adoptámos para elaborar esta tese – incluindo na dissertação artigos científicos completos – já incorpora discussões individuais de cada um dos conjuntos de novos dados científicos que fomos obtendo. O nosso objectivo agora é integrar, com o estado actual de conhecimentos sobre a mucosa nasal, e seus aspectos clínicos, as lições que derivam da investigação que realizámos dentro deste programa de doutoramento.

A mucosa nasal é influenciada por múltiplos factores químicos e físicos. Clinicamente têm grande importância os eventos adversos associados à prescrição médica, nomeadamente de medicações sistémicas que podem resultar em obstrução nasal e xerose da sua mucosa. A obstrução nasal resulta habitualmente de edema da mucosa e pode ser reversível ou irreversível, sendo alguns exemplos atribuíveis à acção do ácido acetilsalicílico, anticoncepcionais orais, guanetidina, hidantoína, estrogénios, ácido paraaminosalicílico, fenotiazina, beta-bloqueantes, preparações de *rauwolfia* ou tetra-etil-amónio. A xerose da mucosa nasal está associada à administração de atropina, de preparações de *belladona* ou de corticosteróides, imidazolina ou derivados das catecolaminas (Becker et al., 1994).

Quanto à aplicação tópica nasal de fármacos, os seus principais eventos adversos devem-se aos descongestionantes e às preparações com mentol. O abuso de descongestionantes nasais, que é bastante frequente, está na base de uma entidade clínica denominada como “rinite medicamentosa”, a qual se caracteriza por atrofia da mucosa nasal devido a vasoconstrição induzida persistentemente. Numa fase inicial desta situação clínica, verifica-se edema da mucosa, seguido de falência da regulação vascular pelo sistema nervoso autónomo com lesão orgânica da mucosa e estabelecimento de mecanismo farmacológico de habituação (Becker et al., 1994). Em amostras da mucosa nasal de doentes com rinite medicamentosa, estudadas por microscopia electrónica de transmissão, foi observada a perda ou lesão das células ciliadas e a presença de roturas na membrana basal do endotélio dos vasos subepiteliais (Knipping et al., 2007). As preparações com mentol não promovem a descongestão nasal; o seu efeito, aparentemente descongestionante, resulta da estimulação dos receptores de frio das terminações do nervo trigémino. Farmacologicamente estas preparações estão associadas à estimulação da produção de mucina, diminuição do batimento ciliar e aumento da resistência nasal (Abanses et al., 2009).

Fora da categoria dos fármacos de prescrição, mas com grande importância clínica nos eventos adversos nasais, estão as substâncias psicotrópicas de abuso e as substâncias de inalação accidental ou laboral. Entre as substâncias de abuso destaca-se a cocaína pelo seu potente efeito vasoconstritor. As principais manifestações clínicas associadas à inalação de cocaína são a rinorreia persistente, anósmia, epistaxis, sensação de obstrução nasal e aumento da probabilidade de sinusite bacteriana. Segue-se a formação de crostas e o estabelecimento de uma inflamação crónica que se estende à cartilagem com fenómenos de condrite, aos quais se segue a perfuração septal (*Lepore, 2004*). A destruição pode estender-se a grande parte do septo com desenvolvimento de um “nariz em sela”, ou mesmo à cavidade oral com estabelecimento de fistulas oro-antrais (*Pelo et al., 2008*). A inalação dos produtos da combustão do tabaco está associada a diversos efeitos na mucosa nasal que vão desde a inflamação crónica, com perda de células ciliadas, diminuição de células caliciformes e áreas de metaplasia pavimentosa, até ao aumento da probabilidade do aparecimento de neoplasias malignas (*Lee et al., 2006*) (*Mauderly et al., 2004*).

No que se refere à exposição profissional, são múltiplas as substâncias que, quando aerossolizadas, são potencialmente lesivas para a mucosa nasal. Nos trabalhos de limpeza doméstica e industrial, a mistura de hipoclorito de sódio (encontrado na lixívia) com amónia (incluída nos limpavidros ou na urina estagnada nas sanitas) ou com ácidos, como o do vinagre ou dos desincrustantes, produzem gases tóxicos que promovem alterações na via aérea, com hiperplasia da sua musculatura lisa e fibrose (*Tuck et al., 2008*).

Solventes, como o benzeno ou o tolueno (metil-benzeno) podem ser inalados aquando do manuseamento de hidrocarbonetos combustíveis, tintas, vernizes ou diluentes. Desta inalação resulta uma resposta da mucosa nasal com inflamação eosinofílica (*Johnson et al., 2007*), e uma variação na espessura do epitélio olfativo associada inicialmente ao decréscimo do número de células e, com a manutenção do estímulo tóxico, um aumento desse número, sugerindo assim uma resposta de tipo inflamatório (*Jacquot et al., 2006*).

Na indústria dos plásticos utilizam-se epóxidos, como, por exemplo, o óxido de propileno, cuja inalação repetida está associada a sintomas nasais de rinite. A avaliação histopatológica da mucosa nasal de roedores, expostos a estas substâncias, revelou uma retenção acrescida com uma transição sol-gel, devido às suas propriedades bioadesivas e de solubilidade aquosa dependente da temperatura (*Bromberg, 2001*). Verificou-se também uma resposta inflamatória com proliferação de células caliciformes e hiperplasia

das células epiteliais e um efeito citotóxico com aumento da incidência de tumores nasais (*Ríos-Blanco et al., 2003*).

O níquel e o crómio empregam-se na indústria metalúrgica, num processo denominado electrodeposição, para dar um acabamento brilhante e altamente resistente à corrosão. O crómio e os seus óxidos também são utilizados na produção de amoníaco. O contacto destes elementos químicos com a pele, mucosa respiratória e sistemicamente, quando são deglutidos, está associado a uma resposta de tipo inflamatório e a uma maior probabilidade de patologia neoformativa maligna. A mucosa nasal é afectada por esta resposta com o desenvolvimento de rinite ou neoplasia nasosinusal (*Marraccini, 2008*) (*d'Errico, 2009*). O seu efeito tóxico sobre a mucosa nasal pode evoluir para atrofia, ulceração persistente, hipósma, anósma ou perfuração septal (*Sunderman Jr, 2001*).

Os taninos são polifenóis de origem vegetal que se encontram em alimentos, como o vinho, chás, bagas e diospiros e em árvores como o carvalho. São largamente empregues na indústria dos curtumes. São estes profissionais e os da indústria das madeiras que têm um maior risco de neoplasia nasosinusal, designadamente de adenocarcinoma, por exposição aos taninos (*Roux et al., 2002*). Há também uma relação etiológica entre esta exposição e a instalação de parósmaias (*Portier et al, 2000*).

Quando as substâncias, que entram em contacto com a mucosa nasal, produzem uma resposta mediada pela imunoglobulina E (Ig E), a inflamação consequente denomina-se “inite alérgica”. Nesta, temos que considerar uma fase imediata quando o alergeno se liga à Ig E, provocando a desgranulação dos mastócitos e a libertação de mediadores químicos pré-formados como a histamina, triptase, quimase, cininas e heparina. Verifica-se também a produção de novos mediadores, como os leucotrienos, citocinas e interleucinas que amplificam a resposta inflamatória. Esta caracteriza-se clinicamente por rinorreia mucosa, crises esternutatórias, irritação nasal, obstrução nasal e hipósma. A fase tardia caracteriza-se pela infiltração da mucosa nasal por basófilos, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares que amplificam e perpetuam a resposta alérgica. Nesta fase a sintomatologia é sobreponível, embora a obstrução e a produção de muco sejam mais acentuadas (*Loureiro, 2008*). A rinite alérgica pode classificar-se segundo diversos critérios. Actualmente aceita-se uma classificação baseada na duração e gravidade dos sintomas:

Intermitente se dura quatro ou menos dias por semana ou se tem uma duração igual ou inferior a quatro semanas. Persistente se dura mais de quatro dias por semana ou se se prolonga por mais de quatro semanas.

Quanto à gravidade classifica-se em ligeira (sono normal, sintomas ligeiros, sem interferência nas actividades diárias de desporto, lazer, trabalho ou escolares) ou moderada/severa (sono alterado, sintomas exuberantes, interferência nas actividades diárias de desporto, lazer, trabalho ou escolares) (*Bousquet et al., 2001*).

A rinite intrínseca, anteriormente denominada “vasomotora”, resulta de uma alteração neurovascular dos vasos sanguíneos da mucosa nasal, comumente atribuída ao sistema nervoso parassimpático. Devido a esta alteração, ainda mal caracterizada do ponto de vista fisiopatológico, os vasos da mucosa nasal tornam-se mais abundantes e sensíveis a estímulos externos. Os factores desencadeantes da agudização desta patologia são, por exemplo, as alterações da temperatura ou da humidade atmosférica, a exposição a fumos ou poeiras, a ingestão de álcool, a ansiedade ou a administração de beta-bloqueantes. Para além da acetilcolina, os receptores colinérgicos são também estimulados pelo péptido Intestinal vasoactivo, determinante na hipersecreção associada a esta entidade. Como os sintomas de obstrução nasal e de rinorreia mucosa são inespecíficos, é necessário aplicar um diagnóstico diferencial com várias entidades (*Becker et al., 1994*). Entre estas destaca-se a rinite infecciosa por vírus, bactérias, fungos ou parasitas e outras rinites não-infecciosas, como as metabólicas, as granulomatoses, como a Doença de Wegener ou a Sarcoidose, ou as patologias mucociliares, como a Mucoviscidose, a Disquinésia Ciliar Primária ou a Síndrome de Young. Entre os factores que determinam uma resposta inflamatória da mucosa nasal, temos que incluir a resposta aos corpos estranhos nasais, que são de suspeita obrigatória em crianças com rinorreia unilateral persistente (*Barros, 1998*).

Nesta enunciação de noxas da mucosa nasal fica clara a susceptibilidade desta estrutura e as formas como arquitecta respostas adaptativas. Nos factores que seleccionámos para estudo, já é conhecido o seu potencial terapêutico sistémico. No entanto, interessa também conhecer os efeitos histopatológicos locais sobre a mucosa nasal.

Após a fixação dos objectivos deste trabalho de investigação, mobilizaram-se os recursos imprescindíveis à sua execução, quer na vertente humana, quer na vertente animal, após apreciação e parecer favorável da Comissão de Ética do Hospital da Marinha.

As bases do trabalho careceram de uma revisão da literatura sobre os fundamentos da OHB, as suas indicações clínicas em Otorrinolaringologia e o estabelecimento da casuística do nosso centro.

Para o estudo morfológico da mucosa respiratória nasal em humanos, consideraram-se os tratamentos crónicos com OHB e com fármacos de aplicação tópica nasal, por serem

aqueles que mais se aproximam dos tratamentos efectuados nos doentes que recorrem ao nosso centro. Nas situações agudas, que carecem de tratamento por OHB, pelo seu carácter de urgência e algumas vezes de emergência, não é possível estabelecer um protocolo que inclua biopsias nasais no final do tratamento. Esse componente do estudo dos efeitos agudos da OHB ficou então para os estudos experimentais realizados com roedores em que, utilizando uma câmara hiperbárica para animais de pequeno porte, se procedeu à caracterização morfológica da mucosa respiratória nasal do rato. Outra linha de investigação incluiu animais submetidos a tratamento crónico prolongado com OHB.

O acompanhamento clínico dos doentes do foro otorrinolaringológico, submetidos a OHB, associado aos resultados preliminares dos estudos morfológicos, despertou curiosidade sobre os efeitos funcionais a nível respiratório nasal deste tipo de tratamento. Por esse motivo, desenvolvemos um protocolo de investigação clínica para avaliação do pico inspiratório nasal, em doentes tratados com OHB.

Para o estudo morfológico considerámos importante a avaliação por microscopia óptica (coloração com hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e Verhoeff), por imunohistoquímica utilizando a marcação para o colagénio tipo IV e também o estudo da ultraestrutura celular realizada por microscopia electrónica de transmissão. Quer no grupo controlo, quer nos grupos submetidos a tratamento, as preparações coradas com PAS não revelaram alterações no número de células mucosas e a coloração de Veroeff demonstrou a integridade das fibras elásticas. A imunomarcação do colagénio tipo IV revelou a integridade da membrana basal e facilitou a apreciação da sua espessura.

## **1 - Aspectos anatomo-clínicos da mucosa nasal humana**

### **1.1. - Após Oxigenoterapia Hiperbárica**

Baseados no conhecimento de que o transporte mucociliar nasal é afectado por factores físicos e químicos, Narozny et al. (2002) desenvolveram um estudo prospectivo, em que verificaram que com um tratamento padrão (aproximadamente 70 minutos), de OHB, havia uma aceleração do transporte mucociliar nasal. Não se registaram alterações no grupo de controlo que fez tratamento hiperbárico, mas respirando ar. Esta evidência, associada à sensibilidade clínica de que após a OHB os doentes “respiravam melhor”, levou-nos a investigar se havia uma correlação destes dados com alterações morfológicas.

Aquilo que comprovámos histologicamente é que, num tratamento crónico de OHB de 15 sessões, há um aumento significativo da espessura da membrana basal e um infiltrado inflamatório por PMN, de grau moderado, do epitélio e do córion da mucosa respiratória nasal. Nesta investigação optámos pela realização de biopsia da porção anterior do corneto inferior, sem anestesia, apesar dos riscos acrescidos de hemorragia nasal. Esta ocorreu em todos os doentes, tendo sido controlada por compressão ou por cauterização com nitrato de prata. A alternativa à biopsia seria um escovado das fossas nasais ou uma recolha de solução de lavagem. Estes métodos, que são úteis em estudos de avaliação do muco ou das células epiteliais, não permitiriam a observação das estruturas mais profundas da mucosa.

O aumento da espessura da membrana basal é observada na via aérea em situações de agressão a nível pulmonar, como no pós-transplante pulmonar (*Law et al., 2005*), na tosse crónica asmática e não-asmática (*Niimi et al., 2004*) ou após a inalação de alergenos (*Phipps et al., 2004*). Na mucosa nasal também se observa um aumento da espessura da membrana basal, em doentes com rinossinusite crónica ou em doentes alérgicos aos ácaros do pó da casa, se bem que menor do que o observado nas vias aéreas inferiores (*Chanez et al., 1999*) (*Rhel et al., 2007*). Este aumento da espessura da membrana basal nas vias aéreas é interpretado como uma resposta inflamatória que pode ser reversível (*Chanez et al., 1999*). No nosso grupo de estudo humano, o aumento de cerca de 36% da espessura da membrana basal da mucosa nasal, em relação ao grupo de controlo, remete-nos para a consideração de se tratar de um efeito inflamatório da OHB. Esta interpretação é apoiada também nos dados respeitantes à infiltração leucocitária do epitélio e do córion. As células predominantes a permear o epitélio e o córion eram PMN, com significado estatístico, se bem que se observou uma presença também de linfócitos no córion, no entanto, sem significado estatístico.

A sequência de eventos entre a mobilização de neutrófilos livres no plasma, passando pela adesão, migração e libertação de mediadores até à sua chegada ao epitélio nasal, é um processo coordenado. Por exemplo, na rinite alérgica observa-se a expressão de marcadores de activação de superfície, como o CD11b, CD63 e CD66b, traduzindo uma acção dos neutrófilos no processo inflamatório (*Kinhult et al., 2003*). Na exposição à molécula de ozono verifica-se uma resposta inflamatória da mucosa nasal, sendo a metaplasia das células mucosas dependente da acção dos neutrófilos e a proliferação celular e a regulação do gene da mucina, processos independentes dos neutrófilos (*Cho et al., 2000*).

**Como explicar então esta resposta inflamatória numa modalidade terapêutica que tem como uma das suas características o efeito anti-inflamatório, particularmente o efeito anti-edema?**

Partindo do princípio de que as populações de estudo não tinham patologia nasal prévia, pretendemos estudar efeitos da OHB em tecidos saudáveis. Os efeitos anti-inflamatórios da OHB são observados em tecidos doentes (com inflamação aguda ou crónica), devido à vasoconstrição imposta ao nível da microcirculação, em áreas em que o nível de oxigénio ultrapassou o normal. Nas áreas isquémicas, antes da OHB e em que o nível de oxigénio ficou perto do normal, não se observam fenómenos de vasoconstrição (*Mathieu et al., 2006*). Por outro lado a OHB, através da elevação das concentrações de oxigénio disponíveis nos tecidos, contraria a inflamação associada ao fenómeno da isquémia-reperfusão, tem um efeito directo nas bactérias patogénicas e melhora a resposta celular às infecções pelo aumento da geração de superóxido pelos PMN. Considerando ainda os órgãos extra-respiratórios, verifica-se nestas circunstâncias uma inibição na síntese de DNA nos linfócitos e uma diminuição da actividade fagocitária, em condições de hiperoxia (*Mathieu et al., 2006*). Sabe-se ainda que as variações da pressão atmosférica nas fossas nasais estão associadas isoladamente à exsudação plasmática (*Berg et al., 2003*).

Claramente, o efeito inflamatório, por nós descrito, não resulta da acção sistémica da OHB, mas de uma acção directa sobre a mucosa respiratória nasal, presumivelmente devido ao aumento da pressão atmosférica e do oxigénio respirado a 100%.

A nossa investigação demonstrou ainda que, do ponto de vista ultraestrutural, não existem alterações significativas nos organelos das células epiteliais designadamente nas mitocôndrias, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, complexos juncionais ou nos núcleos. Ao contrário do observado na população de controlo, numa pequena percentagem de células epiteliais (inferior a 10%), das amostras dos indivíduos submetidos a OHB, verificar-se alteração morfológica ciliar. Esta alteração consistia fundamentalmente em edema da membrana, fusão da membrana de cílios adjacentes e falta de pares de microtúbulos centrais ou periféricos.

Estas alterações, porque pequenas e limitadas, indicam a segurança clínica da utilização da OHB, no que diz respeito à preservação da via aérea superior. Sugerem também a pertinência de estudos para avaliação dos efeitos agudos e dos efeitos crónicos da OHB.

## **1.2. - Após aplicação tópica de outros fármacos**

As instruções prestadas pelos médicos, e as incluídas na literatura de medicamentos para administração em “sprays” nasais, referem a orientação de que o “spray” deve ser dirigido à parede externa das fossas nasais. É aí que se pretende que actuem, pelo que é aí também que temos que estudar os seus efeitos na mucosa nasal.

No nosso trabalho demonstrámos que a aplicação, durante duas semanas, de FM, AZ ou CS estava associada a uma infiltração do epitélio e do córion por leucócitos polimorfonucleares e uma infiltração estritamente do córion por linfócitos, ao contrário do que se observou na população de controlo. Estes resultados foram obtidos em cortes da mucosa nasal corados com hematoxilina e eosina. Nas colorações com PAS e Verhoeff não se observaram alterações nas células mucosas nem na integridade das fibras elásticas, respectivamente. As medições da espessura do epitélio e da membrana basal não revelaram diferenças significativas entre o grupo experimental e o grupo de controlo.

O FM é um anti-inflamatório corticóide tópico nasal. Como tal, é expectável que diminua a inflamação em indivíduos doentes. Isso está solidamente demonstrado em doentes alérgicos, quer no seu efeito agudo (*Ciprandi et al., 2001*) (cerca de seis horas após a administração do fármaco), quer a longo prazo (*Minshall et al., 1998*) (após um ano de administração contínua) pela observação de diminuição da infiltração de células inflamatórias, designadamente de eosinófilos. Também a AZ reduz a migração de células inflamatórias para a mucosa nasal, devido ao seu efeito sobre os mediadores da inflamação (*Bernstein, 2007*). A CS está associada à diminuição dos processos inflamatórios de artrite, edema pós-vacina da tosse convulsa, reacção cutânea da tuberculina, reacção de Arthus e do edema associado à nistatina (*Abdullahi et al., 1977*).

### **Como interpretar então esta infiltração leucocitária após 2 semanas da administração de fármacos com capacidade anti-inflamatória?**

Na administração de FM, AZ ou CS não seria previsível haver diminuição das células inflamatórias, uma vez que não havia inflamação prévia. No grupo de controlo, que foi submetido a aplicação de solução salina de NaCl a 0,9%, não se observavam quaisquer leucócitos no epitélio ou córion. No estudo que realizámos com indivíduos saudáveis, pretendia-se avaliar o efeito do fármaco sobre a mucosa e não a acção terapêutica do mesmo. O que há em comum, na administração de solução salina de NaCl a 0,9%, de FM, de AZ e de CS, é o estímulo mecânico sobre a mucosa nasal. Sabemos, particularmente com a experiência com os tamponamentos nasais pós-operatórios, que nestes procedimentos há uma agressão para mucosa por estímulo mecânico, que se

manifesta por uma resposta inflamatória (Mo et al., 2008) (Genç et al., 2004). A inalação de partículas provoca uma lesão ciliar e uma resposta inflamatória com infiltração da mucosa nasal de uma forma dependente da dose (Liu et al., 2008). Outro estímulo conhecido é a poluição atmosférica, numa mistura de ozono, partículas minerais e aldeídos, que conduzem em exposição crónica a uma resposta inflamatória da mucosa nasal. Esta manifesta-se por um aumento da espessura do epitélio e por infiltração de leucócitos mononucleares e PMN (Calderón-Garcidueñas et al., 2001). Este tipo de resposta também foi observado em animais expostos de forma aguda ao ozono, sem associação de estímulos paralelos (Cho et al., 1999). No entanto, o estímulo mecânico também existiu no grupo controlo e não se verificaram alterações. Interpretamos estes resultados como uma reacção inflamatória inespecífica e transitória associada à absorção dos fármacos pela mucosa respiratória nasal.

## **2 - Aspectos anatomo-clínicos da mucosa nasal do rato**

Com o objectivo de obviar alguns factores de enviesamento inerentes ao estudo em humanos, devido à heterogeneidade da população humana, desenvolveu-se um estudo experimental em animais, num modelo já previamente utilizado no estudo em medicina hiperbárica. Empregando ratos saudáveis, adultos jovens e criados em ambiente de biotério, obtivemos uma homogeneidade histológica no grupo de controlo, designadamente na obtenção constante de um epitélio de tipo respiratório, na ausência de infiltração leucocitária e nas dimensões do epitélio e da membrana basal. Do ponto de vista ultraestrutural, estudado em microscopia electrónica de transmissão, também se obteve uma amostra homogénea sem alterações dos organelos ou dos cílios.

Imitando o tratamento comumente estabelecido nos centros de medicina hiperbárica para patologias, como as úlceras dos membros inferiores, submetemos um grupo de animais a 30 sessões de OHB com uma duração de 100 minutos cada. Após a última sessão, os animais foram anestesiados e sacrificados, tendo-se procedido à dissecção da cabeça ao longo do septo nasal, com recolha da mucosa da *concha nasalis ventralis* (Bancroft et al., 2002). Foi também nesta ocasião que se procedeu à dissecção dos animais do grupo de controlo. O terceiro grupo de animais foi submetido a uma única sessão de OHB de 485 minutos, segundo o protocolo alargado da tabela 6 da marinha americana para o tratamento da síndrome de descompressão. Trata-se de um dos tratamentos mais longos, em que se respira ar alternadamente com oxigénio, a pressões de 1,9 ou 2,8 ATM. Por ser um tratamento longo, usámo-lo como modelo para averiguar

eventuais efeitos agudos da OHB. Os animais foram sacrificados e dissecados imediatamente após o final da sessão.

Neste estudo comprovámos histologicamente que a OHB não está associada a qualquer alteração da mucosa respiratória nasal quando aplicada de forma aguda, ainda que prolongada. Esta avaliação foi realizada com recurso a preparações histológicas para microscopia óptica, coradas com hematoxilina e eosina, PAS e Verhoeff e em preparações para estudo por microscopia electrónica de transmissão. Dos parâmetros avaliados na microscopia óptica destacamos a ausência de diferenças em relação ao grupo de controlo no que diz respeito à persistência de um epitélio pseudoestratificado ciliado, espessura do epitélio e membrana basal, número e disposição das células mucosas e das fibras elásticas e ausência de infiltrados leucocitários.

Não se registaram diferenças entre os dois grupos, quando a avaliação foi feita por microscopia electrónica de transmissão no que diz respeito ao núcleo, mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, presença de áreas de metaplasia pavimentosa, alterações na distribuição das células ciliadas ou mucosas ou alterações na ultraestrutura ciliar.

No tratamento crónico por OHB comprovámos que existiam alterações para o grupo de controlo que são estatisticamente significativas. Utilizando o teste de *t* de Student e a distribuição de Bernoulli para determinar o significado da infiltração leucocitária, verificámos que esta era relevante para um  $p<0,05$  e que a espessura do epitélio no grupo submetido a 30 sessões de OHB era significativamente maior. Não se verificaram diferenças na espessura da membrana basal. Na avaliação, por microscopia electrónica de transmissão, não se verificaram diferenças entre os três grupos de animais estudados.

A interpretação destes resultados remete-nos para os efeitos directos do aumento da pressão atmosférica e da hiperóxia, sendo, portanto, compatíveis com o demonstrado isoladamente para cada um destes estímulos. Destacamos o efeito pró-inflamatório associado ao tratamento por ventiloterapia com aplicação nasal de pressão positiva contínua (CPAP), verificado em ratos Sprague-Dawley (*Almendros et al., 2008*) e os efeitos pró-inflamatórios verificados do ponto de vista bioquímico e morfológico em ratos submetidos a diferentes condições de hiperóxia (*Nikula et al., 1991*).

### **3 – Diferenças entre o humano e o rato**

O estudo animal permitiu aplicar um protocolo de OHB crónico numa população homogénea e estudar efeitos agudos, em condições extremas, que não são ética e logicamente possíveis em humanos.

A população animal era constituída por 24 ratos Wistar, jovens adultos com 6 semanas de vida no início do estudo, machos, com peso compreendido entre as 150 e as 175 gramas. Foram mantidos aos pares em gaiolas com alimento e água permanentemente disponíveis, em ciclo de luminosidade/obscridade de 12 horas, a uma temperatura constante de 20 °C, segundo o DL 129/92, de 6 de Julho e a portaria 1005/92 da lei portuguesa e a directiva da União Europeia nº 86/609/CEE. Ao contrário do observado nestes animais, encontrámos no grupo de controlo humano a presença de uma maioria de amostras com epitélio pavimentoso e com áreas metaplásicas, e algumas amostras com leucócitos no córion. Sabendo que a população de controlo humana tinha uma média de idades de  $36.89 \pm 8.95$  anos, estavam em regime de ambulatório na comunidade, e que, apesar dos critérios de exclusão impostos para participar no estudo, tinham um passado de eventuais agressões nasais difíceis de enumerar, são aceitáveis e compreensíveis estes achados histológicos na porção anterior do corneto nasal inferior (Augusto *et al.*, 1999). Quando obviámos estas condições no estudo animal, chegámos a um resultado semelhante, ou seja, a OHB crónica está associada a uma resposta inflamatória ligeira ou moderada com infiltração de leucócitos na mucosa nasal e com um aumento da espessura da membrana basal ou do próprio epitélio.

A inexistência de alterações no grupo de animais que fez apenas uma sessão de 485 minutos, deve ser discutida com consideração ao facto de haver uma respiração intercalada de ar e de oxigénio a 100%, e de se verificar, a partir dos 125 minutos, uma diminuição da pressão atmosférica de 2,8 para 1,9 ATA.

**Questionamo-nos sobre se o resultado obtido se deve ao carácter agudo do tratamento ou à respiração intercalada de ar e de oxigénio?**

Sabe-se, há longa data, que os efeitos da hiperoxia aguda se verificam rapidamente no pulmão por efeito tóxico directo e secundariamente pela acumulação de mediadores da inflamação e que estes efeitos são reversíveis com a suspensão do estímulo (Pagano e Barazzone-Argiroffo, 2003). A respiração intermitente de ar é usada como método de prevenção da toxicidade do oxigénio em grupos de risco e está demonstrado que, ao contrário da exposição contínua à OHB, a respiração intermitente de ar não activa os mediadores químicos da inflamação (Chavko *et al.*, 2008). Como os períodos mais

extensos de respiração de oxigénio a 100% são de 60 minutos (excepção feita à despressurização do final do tratamento), logo seguidos por períodos de respiração de ar de 15 minutos, podemos aceitar que o oxigénio não desencadeou a resposta inflamatória típica da hiperoxia. Por outro lado, o efeito isolado do aumento da pressão atmosférica pode ter sido obviado pelo facto de os animais terem estado somente 125 minutos a 2,8 ATA, seguidos de 300 minutos a 1,9 ATA e com um período de 30 minutos entre eles e outros 30 para regressar a 1 ATA.

#### **4 – Oxigenoterapia Hiperbárica noutras órgãos; perspectiva futura**

Conforme já referido anteriormente, a OHB tem um efeito anti-inflamatório em tecidos doentes, devido à sua acção vascular, de elevação da pressão parcial de oxigénio nos tecidos e do seu efeito antimicrobiano. Por este motivo, a maioria dos estudos disponíveis abordam órgãos ou tecidos doentes, havendo pouca informação sobre os efeitos da OHB em territórios saudáveis. O efeito anti-inflamatório é aproveitado, por exemplo na pancreatite aguda (*Nikfarjam et al., 2007*), nas feridas de difícil cicatrização (*Zhang et al., 2008*) ou após a reparação de estruturas nervosas seccionadas (*Sanchez, 2007*).

Os novos desafios, que se colocam à OHB, estão relacionados com a melhor compreensão da farmacodinâmica do oxigénio em condições excepcionais de pressão parcial, obtida pela inspiração do gás a 100%, em pressões atmosféricas duas a três vezes superiores à verificada ao nível do mar. Por este motivo, há um aumento do número de estudos interessando a OHB ao nível molecular, envolvendo áreas como a genética, a imunologia e a farmacologia.

Sabendo-se, por exemplo, que a promoção da cicatrização de feridas em doentes diabéticos está associada à elevação do número de células estaminais em circulação, apurou-se que a OHB aumenta a expressão do factor de crescimento placentário nas células estaminais mesenquimatosas da medula óssea. Como este factor é um agente estimulante da revascularização em tecidos isquémicos, concluiu-se que estava envolvido na angiogéneses associada à OHB (*Shyu et al., 2008*).

Nas neurociências têm-se alargado as eventuais indicações futuras da OHB com base em investigação animal. Apurou-se, por exemplo, que após a oclusão aguda permanente da artéria cerebral média, a redução da área enfartada e a melhoria comportamental dos animais era superior nos que tinham feito tratamento precoce prolongado por OHB (*Xue et al., 2008*). Após isquémia induzida por laqueação da carótida esquerda, seguida de

exposição a condições de hipóxia em ratos recém-nascidos, verificou-se que a OHB promovia a proliferação de células estaminais neuronais e estava associada a uma melhoria dos resultados dos testes comportamentais (*Wang et al., 2008*). Este tipo de testes demonstrou uma melhoria associada à OHB, assim como na densidade vascular do hipocampo em ratos sujeitos a indução de lesão traumática cerebral (*Harch et al., 2007*). A OHB prévia a uma isquémia cerebral global transitória tem um efeito neuroprotector por reduzir a apoptose precoce e inibir a conversão desta na apoptose tardia, provavelmente devido ao aumento do nível de factor neurotrófico derivado do cérebro e a uma supressão da activação do p38 (*Ostrowski et al., 2007*). Num modelo semelhante de pré-condicionamento com OHB, mas em que foi induzida uma hemorragia cerebral, obteve-se uma diminuição do edema cerebral, provavelmente por activação da via das kinases p44/42 mitogenicamente activadas (*Qin et al., 2008*). Esta amostra de resultados de estudos recentes coloca a OHB como uma modalidade de tratamento actual, com necessidade de aprofundamento de conhecimentos básicos e clínicos e com potencialidades que seguramente ainda são desconhecidas.

## **5 – Avaliação clínica da Oxigenoterapia Hiperbárica na fisiologia nasal**

Como referido no início desta discussão, tínhamos a sensibilidade clínica, pelos relatos dos doentes, de que a respiração do oxigénio a 100%, durante o tratamento dentro da câmara hiperbárica, era diferente da respiração do ar ao nível do mar. Com base neste dado anamnético estabelecemos um protocolo usando o pico inspiratório nasal, antes, durante e após as sessões de OHB. Estabelecemos também as medições a um grupo de indivíduos, que não fez tratamentos por OHB, para excluir a eventual interferência de factores ambientais durante o período do estudo, o que não aconteceu. O grupo estudado era constituído por 8 homens e 5 mulheres, com idades compreendidas entre os 21 e os 76 anos, com uma média de  $51,9 \pm 18,3$  anos, admitidos para tratamento por OHB, com diversos diagnósticos. Cada doente completou pelo menos 10 observações, em que se considerou o maior de três registos do pico inspiratório nasal. O valor médio, antes do tratamento e ao nível do mar, foi de  $149,4 \pm 12,0$  l/min, durante o tratamento foi de  $176,4 \pm 16,0$  l/min e, após o tratamento ao nível do mar, foi de  $158,4 \pm 13,0$  l/min. A diferença, entre o apurado antes e durante o tratamento, é estatisticamente significativo para um  $p < 0,05$ , utilizando o teste *t* de Student. Verificámos um aumento linear de 3 l/min/dia durante o tratamento.

O recurso ao pico inspiratório nasal deveu-se à facilidade e fiabilidade com que este teste é realizado. Dentro da câmara hiperbárica seria difícil manter uma medição de rinodebitomanometria fiável, não existindo na literatura qualquer protocolo com estes aparelhos. A medição com o In-check™ ATS97 Inspiratory Flow Meter (Clement Clarke International, UK), foi validada em diferentes condições, considerando-se ter uma exactidão semelhante à rinomanometria acústica ou rinomanometria activa anterior (*Bermüller et al., 2008*) (*Wilson et al., 2003*). Este tipo de dispositivo também foi utilizado em altitude (*Barry et al., 1997*) e numa câmara hipobárica em condições de hipóxia para demonstrar uma limitação significativa no débito nasal (*Barry et al., 2002*).

Este resultado de elevação do débito nasal durante a OHB, associado ao aumento do transporte mucociliar nasal (*Narozny et al., 2002*), tem uma grande importância quando recordamos que a maior parte dos doentes, submetidos a OHB, são idosos ou indivíduos cronicamente doentes que, pelas acções descritas, não necessitam de dispensar um esforço respiratório tão grande como aquele que fazem a respirar ar, ao nível do mar.

## 6 – Perspectiva médico-naval

A inexistência de alterações morfológicas, no tratamento agudo prolongado, assume particular importância do ponto de vista médico-naval, devido à segurança das missões dos mergulhadores que, em condições hiperbáricas, respiram diversos tipos de misturas gasosas.

As alterações verificadas, nos tratamentos crónicos por OHB, se têm importância para os doentes que frequentam a câmara hiperbárica, têm muito mais relevância para os enfermeiros e mergulhadores que acompanham os doentes durante os tratamentos de OHB, para as guarnições dos submarinos e dos navios pressurizados e para os mergulhadores.

Deste estudo, surgem necessidades de investigação complementar nestas populações, num contexto de “medicina ocupacional”, para prevenção e intervenção atempada, na saúde dos militares no activo de funções.

A construção de uma câmara hiperbárica para animais de pequeno porte, com a possibilidade de pressurização a ar e a oxigénio, dota a saúde naval de um instrumento de investigação precioso, numa área que é do seu apreço e interesse, e para a qual é necessário estimular os seus jovens médicos a desenvolver. Dispondo de médicos em

formação em diversas especialidades, são muitas as possíveis aferências para investigação em OHB.



## **CONCLUSÕES**

O nosso estudo propôs-se avaliar a mucosa nasal quando estimulada pelo oxigénio hiperbárico e por fármacos de aplicação tópica nasal, através da microscopia óptica, da microscopia electrónica de transmissão (MET) e também do ponto de vista funcional, pelo pico inspiratório nasal.

Verificámos que o tratamento agudo com oxigénio hiperbárico, ainda que prolongado, segundo um dos mais extensos protocolos estabelecidos, aplicado a ratos Wistar, não provoca alterações na mucosa nasal, identificáveis na microscopia óptica com as colorações de hematoxicilina e eosina, PAS, Verhoeff ou com marcação imunohistoquímica para o colagénio tipo IV. Também não se verificaram alterações na MET no que diz respeito ao núcleo, mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, presença de áreas de metaplasia pavimentosa, alterações na distribuição das células ciliadas ou mucosas ou alterações na ultraestrutura ciliar. Concluímos, pois, tratar-se de um tratamento seguro para a mucosa nasal quando aplicado de forma aguda.

Nos tratamentos crónicos de OHB (15 sessões no humano e 30 sessões no rato), usando a mesma metodologia acima descrita, verificámos, em relação aos grupos de controlo, haver um infiltrado inflamatório leucocitário da mucosa com predomínio de PMN, de grau moderado no humano e de predomínio linfocitário, de grau ligeiro no rato. Verificámos ainda um aumento da espessura da membrana basal do epitélio no humano e no rato. No estudo ultraestrutural encontrámos algumas alterações, como o edema da membrana dos cílios, fusão da membrana de cílios adjacentes e falta de pares de microtúbulos centrais ou periféricos que, no entanto, não são estatisticamente significativas. No estudo funcional efectuado em humanos, com pelo menos 10 sessões completas de OHB, verificámos que a OHB está associada a uma elevação do pico inspiratório nasal e com isso a uma elevação do débito inspiratório nasal. Podemos então concluir que o tratamento crónico com OHB está relacionado com alterações funcionais, com aumento do débito aéreo nasal e a alterações morfológicas por resposta inflamatória traduzida por infiltração leucocitária da mucosa, aumento de espessura da membrana basal ou do epitélio.

O estudo na mucosa nasal, após 14 dias de aplicação de FM, AZ ou a CS, demonstrou uma infiltração do epitélio e do córion por leucócitos polimorfonucleares e uma infiltração estritamente do córion por linfócitos, ao contrário do que se passava na população de controlo. Não foram encontradas outras alterações, pelo que concluímos que a absorção

destes fármacos, pela mucosa respiratória nasal, desencadeia uma resposta inflamatória precoce, inespecífica e transitória.

Concluímos, com este trabalho que a mucosa nasal é um alvo de várias agressões ambientais e iatrogénicas e que reage a essas agressões com uma resposta inflamatória ligeira a moderada, de carácter transitório.

## **RESUMOS**

### **RESUMO**

O nariz é o primeiro órgão respiratório a entrar em contacto com o ar e com as diferentes substâncias que este transporta e é também o primeiro órgão respiratório alvo de variações físicas da atmosfera.

Na Medicina naval tem particular importância o efeito das variações de pressão atmosférica, devido às missões que são desempenhadas em meio disbárico e às actividades dentro de câmaras hiperbáricas. A respiração de oxigénio a 100% em pressões atmosféricas de 2,5 ATA permite saturar a hemoglobina e aumentar em cerca de 17,5 vezes a quantidade de oxigénio dissolvido no plasma.

Para além da farmacodinâmica do oxigénio em condições hiperbáricas, considerámos importante apreciar a resposta da mucosa nasal saudável a fármacos de aplicação tópica nasal. Seleccionámos fármacos de diferentes grupos farmacológicos: Furoato de Mometasona (FM), a Azelastina (AZ) e a Calcitonina de Salmão (CS).

Tendo por base a hipótese de que a aplicação de fármacos na mucosa respiratória nasal não é inócua, este trabalho tem como objectivo a caracterização clínica e morfológica dos efeitos dos fármacos seleccionados, nos seguintes parâmetros: estudo microscópico e ultraestrutural, caracterização imunohistoquímica e avaliação fisiológica do débito nasal na oxigenoterapia hiperbárica (OHB).

Após apreciação e aprovação pela Comissão de Ética do Hospital da Marinha, desenhámos um estudo humano em que todos os intervenientes deram o seu consentimento informado e um estudo animal, para responder aos objectivos traçados:

No estudo humano, com fármacos aplicados em nebulização, seleccionámos 4 grupos de 8 indivíduos, aos quais foi realizada biopsia da porção anterior do corneto nasal inferior, após 14 dias de administração de solução salina (0,9% NaCl), FM, AZ ou CS.

No estudo morfológico humano, com oxigénio hiperbárico, escolhemos 2 grupos de 9 indivíduos. Um grupo realizou 15 sessões de OHB de 100 minutos e o outro constituiu o grupo de controlo, ao qual não foi administrado oxigénio, nem sofreu variações provocadas da pressão atmosférica. A biopsia da porção anterior do corneto inferior foi bilateral, para avaliação por microscopia óptica e electrónica de transmissão.

O estudo animal foi efectuado com 3 grupos de 8 ratos de linhagem Wistar. O grupo de controlo não foi submetido a exposição ao oxigénio ou a variações de pressão, um grupo completou uma única sessão de OHB, de 485 minutos, segundo a tabela 6 alargada da marinha de guerra americana para o tratamento da síndrome de descompressão e o último grupo cumpriu 30 sessões diárias de 100 minutos de OHB. Procedeu-se a colheita da *concha nasalis ventralis* que corresponde ao corneto inferior, bilateralmente.

A análise estatística dos resultados foi elaborada com recurso ao teste de *t*, considerando-se um valor de  $p < 0,05$  para indicar um significado estatístico. A distribuição de Bernoulli foi usada para avaliar o significado estatístico da presença de inflamação.

Para o estudo funcional do débito nasal em doentes submetidos a OHB, recorreu-se à avaliação, previamente validada, do pico inspiratório nasal, com o aparelho In-check™ ATS97 (Clement Clarke International, UK). Verificámos um aumento de  $149,4 \pm 12,0$  l/min ao nível do mar antes do início do tratamento, para  $176,4 \pm 16,0$  l/min na pressão máxima a respirar oxigénio a 100%. Este aumento de 18% é estatisticamente significativo ( $p = 0,001$ ). Após a sessão de OHB o pico inspiratório nasal era de  $158,4 \pm 13,0$  l/min; este aumento de 6% em relação ao valor antes da sessão também é estatisticamente significativo ( $p = 0,007$ ).

No estudo humano, com fármacos aplicados em nebulização, verificámos uma infiltração do epitélio e do córion por leucócitos polimorfonucleares (PMN) e uma infiltração estritamente do córion por linfócitos, ao contrário do que se passava nos controlos.

No estudo morfológico humano, com oxigénio hiperbárico, demonstrámos um aumento significativo da espessura da membrana basal de 36%, um infiltrado inflamatório por PMN, de grau moderado, do epitélio e do córion da mucosa respiratória nasal e uma pequena percentagem de células epiteliais (inferior a 10%), com edema da membrana ciliar, fusão da membrana de cílios adjacentes e falta de pares de microtúbulos centrais ou periféricos, em relação ao grupo de controlo.

No estudo em animais verificámos que, nos submetidos a tratamento crónico, a mucosa respiratória nasal apresentava, tal como nos humanos, um infiltrado leucocitário estatisticamente significativo. Este era de grau ligeiro, formado por PMN e linfócitos. Encontrámos ainda uma significativa elevação da espessura do epitélio neste grupo. Nos animais, submetidos a apenas uma sessão prolongada de OHB, não se encontraram quaisquer alterações morfológicas. Na avaliação ultraestrutural, não foram identificadas alterações em qualquer dos grupos estudados.

Deste conjunto de resultados concluímos que a aplicação de fármacos como o FM, AZ ou CS na mucosa respiratória nasal está associada a uma resposta inflamatória precoce, inespecífica e transitória. Esta verifica-se também nos tratamentos crónicos por OHB nos humanos e nos ratos, podendo-se atribuir à sinergia da elevação da pressão atmosférica e da respiração do oxigénio a 100%. Na OHB aplicada de forma aguda, seguindo um protocolo longo de tratamento da síndrome de descompressão, não se encontraram alterações na mucosa nasal, após estudo por microscopia óptica e electrónica de transmissão. Este resultado pode dever-se à respiração intercalar de ar e/ou ao desmame de pressão que se verifica ao longo do tratamento.

## SUMMARY

The nose is the first respiratory organ to enter in contact with the air and with different substances that it carries and it is also the first respiratory organ to be the target of physical variations of the atmosphere.

In naval Medicine the effect of the variations in atmospheric pressure is particularly important because of the missions that are performed in dysbaric environment and of the activities in hyperbaric chambers. The oxygen breathed at 100% in atmospheric pressures of 2,5 ATA allows the saturation of the hemoglobin and the increment in about 17,5 times the amount of oxygen dissolved in the plasma.

In addition to the pharmacodynamics of the oxygen in hyperbaric conditions, we considered of importance to appreciate the answer of the healthy nasal mucosa when stimulated with medicines of topical nasal application. We selected medicines of different pharmacological groups: Mometasone Furoate (MF), Azelastine (AZ) or Salmon Calcitonin (SC).

Starting from the hypothesis that the application of medicines in the respiratory nasal mucosa is not harmless, this investigation aims to characterize the clinical and morphological effects of the selected medicines in the following parameters: microscopic and ultrastructural study, immunohistochemical characterization and physiologic evaluation of the nasal debit in the hyperbaric oxygen therapy (HBO).

Following the appreciation and approval of the Ethics Committee of the Navy Hospital, we drew a human study in which all the subjects gave their informed consent and an animal study, to respond to the drawn objectives:

In the human study with medicines applied by spray, we selected 4 groups of 8 individuals to whom biopsy of the anterior portion of the nasal inferior turbinate was carried out after 14 days of administration of saline solution (0,9 % NaCl), MF, AZ or SC.

In the morphological human study with hyperbaric oxygen, we chose 2 groups of 9 individuals. One of the groups carried out 15 sessions of HBO of 100 minutes and the other constituted the control group to which oxygen was not administered and which did not suffer provoked variations of the atmospheric pressure. The biopsy of the anterior portion of the inferior turbinate was bilateral, for the purpose of optic and electron transmission microscopy analysis.

The animal study was performed with 3 groups of 8 rats, lineage Wistar. The control group was not subjected to the oxygen or to variations of pressure. One group completed a single session of HBO, of 485 minutes, according to the extended table 6 of the US navy for the treatment of the decompression syndrome and the last group carried out 30 daily sessions of 100 minutes of HBO. The concha nasalis ventralis, that corresponds to the inferior turbinate, was harvested bilaterally.

For the statistical analysis of the results we used the t test, considering a  $p < 0,05$  value to indicate a statistical significance. The Bernoulli distribution was used to determine statistical significance of the presence of inflammation.

For the functional study of the nasal flow in patients subjected to HBO, we resorted to the previously validated evaluation of the nasal peak inspiratory flow, with the device In-checkt<sup>m</sup> ATS97 (Clement Clarke International, UK). We verified that the nasal peak inspiratory flow increased from  $149,4 \pm 12,0$  l/min at the sea level before the beginning of the treatment to  $176,4 \pm 16,0$  l/min in the maximum pressure, breathing 100% oxygen. This increase of 18% is statistically significant ( $p = 0,001$ ). After the HBO session the nasal peak inspiratory flow was of  $158,4 \pm 13,0$  l/min; this increase of 6 % regarding the value before the session is also statistically significant ( $p = 0,007$ ).

In the human study with medicines applied by spray, we verified an infiltration of the epithelium and of the chorion for polymorphonuclear (PMN) leucocytes and an infiltration only of the chorion for lymphocytes. This was not observed on the control population.

In the morphological human study with hyperbaric oxygen we demonstrated: i) a significant increase of the thickness of the basement membrane of 36 %,; ii) an inflammatory infiltration for PMN, of moderate degree, of the epithelium and of the chorion of the respiratory nasal mucosa. A small percentage of epithelial cells (less than 10%), of the samples of the individuals subjected to the HBO, presented edema of the ciliar membrane, fusion of the membrane of adjacent cilia and lack of central or peripheral pairs of microtubules, when compared to the control group.

As for the the animals subjected to the chronic treatment, the respiratory nasal mucosa presented, a statistically significant leukocyte infiltration, such as in human. This infiltration was mild and formed by PMN and lymphocytes. We found a significant increase of the thickness of the epithelium in this group. In the animals subjected to a single prolonged HBO session no morphological alterations were observed. No alterations in any of the studied groups were identified in the ultrastructural analysis.

By way of this set of results we conclude that the application of medicines like MF, AZ or SC in the respiratory nasal mucosa is associated to an early, unspecified and transitory inflammatory answer. This is also verified in chronic HBO treatments in humans and in rats, and it is possibly attributed to the synergy of the elevation of the atmospheric pressure and of the 100% oxygen breathing. The acute HBO therapy, following a long protocol of treatment for the decompression syndrome, did not provoke alterations in the nasal mucosa, after optic and transmission electron microscopy analysis. This result can be justified by the intercalate breath of air and/or to weans of pressure that happened along the treatment.

## RÉSUMÉ

Le nez est le premier organe respiratoire à entrer en contact avec l'air et avec les différentes substances qu'il transporte. C'est aussi le premier organe respiratoire cible de variations physiques de l'atmosphère.

Dans la Médecine navale, l'effet des variations de pression atmosphérique a une importance particulière due aux missions qui se déroulent dans un milieu dysbarique et, aux activités à l'intérieur de chambres hyperbariques. La respiration d'oxygène à 100% dans des pressions atmosphériques de 2.5 ATA permet de saturer l'hémoglobine et d'augmenter environ 17,5 fois la quantité d'oxygène dissoute dans le plasma.

Au-delà de la pharmacodynamie de l'oxygène dans des conditions hyperbariques, nous avons considéré qu'il était important d'apprécier la réponse de la muqueuse nasale saine quand elle est stimulée par des médicaments d'application topique nasale. Nous avons sélectionné des médicaments de différents groupes pharmacologiques: mométhasone fluorate (MF), azélastine (AZ) et la calcitonine de saumon (CS).

En ayant pour base l'hypothèse dont l'application de médicaments dans la muqueuse respiratoire nasale n'est pas inoffensive, ce travail a pour objet la caractérisation clinique et morphologique des effets des médicaments sélectionnés, dans les paramètres suivants: étude microscopique et ultrastructurale, caractérisation immunohistochimique et évaluation physiologique du débit nasal dans l'oxygénothérapie hyperbarique (OHB).

Après l'appréciation et l'approbation par la Commission d'Éthique de l'Hôpital de la Marine, nous avons esquissé une étude humaine où tous les intervenants ont donné leur approbation informée et, une étude animale pour répondre aux objectifs tracés:

Dans l'étude humaine avec des médicaments appliqués par nébulisation, nous avons sélectionné 4 groupes de 8 personnes sur lesquelles a été réalisée une biopsie de la portion antérieure du cornet nasal inférieur, après 14 jours d'administration de solution saline (0,9% NaCl), MF, AZ ou CS.

Dans l'étude morphologique humaine avec oxygène hyperbarique, nous avons choisi 2 groupes de 9 personnes. Un groupe a réalisé 15 sessions d'oxygénothérapie hyperbarique de 100 minutes, et l'autre a constitué le groupe de contrôle auquel on n'a pas administré d'oxygène et qui n'a pas souffert de variations provoquées par la pression atmosphérique. La biopsie de la portion antérieure du cornet inférieur a été bilatérale, par évaluation avec microscopie optique et électronique de transmission.

L'étude animale a été effectuée avec 3 groupes de 8 souris d'ascendance Wistar. Le groupe de contrôle n'a pas été soumis à l'exposition à l'oxygène ou à des variations de pression ; un groupe a complété une seule session de OHB, de 485 minutes, selon le tableau 6 élargi de la marine de guerre américaine pour le traitement du syndrome de décompression et, le dernier groupe a accompli 30 sessions quotidiennes de 100 minutes de OHB. On a procédé à la récolte de la *concha nasalis ventralis* qui correspond au cornet inférieur, bilatéralement.

L'analyse statistique des résultats a été faite en utilisant le test t, avec une valeur  $p<0,05$  pour indiquer la signification statistique. La distribution de Bernoulli a été utilisée pour évaluer la signification statistique de la présence d'inflammation.

Pour l'étude fonctionnelle du débit nasal sur des malades soumis à l'OHB, on a fait appel à l'évaluation, préalablement validée, du débit inspiratoire nasal de pointe, avec l'appareil In-check™ ATS97 (Clement Clarke International, UK). Nous avons vérifié une augmentation de  $149,4 \pm 12,0$  l/min au niveau de la mer avant le début du traitement, pour  $176,4 \pm 16,0$  l/min à la pression maximum à respirer de l'oxygène à 100%. Cette augmentation de 18% est statistiquement significative ( $p = 0,001$ ). Après la session de OHB le débit inspiratoire nasal de pointe était de  $158,4 \pm 13,0$  l/min ; cette augmentation de 6% concernant la valeur avant la session est aussi statistiquement significative ( $p = 0,007$ ).

Dans l'étude humaine avec des médicaments utilisés en nébulisation, on a trouvé une infiltration de l'épithélium et du chorion par des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et une l'infiltration strictement du chorion par des lymphocytes, contrairement à ce qui se passait dans les contrôles.

Dans l'étude morphologique humaine avec oxygène hyperbarique nous avons démontré une augmentation significative de l'épaisseur de la membrane basale de 36% , un infiltré inflammatoire par PMN, de degré modéré, de l'épithélium et du chorion de la muqueuse respiratoire nasale et un petit pourcentage de cellules épithéliales (inférieur à 10%), avec oedème de la membrane ciliaire, fusion de la membrane de cils adjacents et un manque de paires de microtubules centrales ou périphériques, en comparaison avec le groupe de contrôle.

Dans l'étude sur les animaux soumis à un traitement chronique, la muqueuse respiratoire nasale présentait, comme chez les humains, un infiltré leucocitaire statistiquement significatif. Celui-ci était d'un léger degré, formé par PMN et de lymphocytes. Nous avons constaté également une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium dans ce

groupe. Chez les animaux soumis seulement à une longue session de OHB, on n'a trouvé aucun changement morphologique. Dans l'évaluation ultrastructurale, on n'a identifié aucune altération dans n'importe quels groupes étudiés.

De cet ensemble de résultats nous concluons que l'application de médicaments comme MF, AZ ou CS dans la muqueuse respiratoire nasale est associée à une réponse inflammatoire précoce, non spécifique et transitoire. Celle-ci se vérifie aussi dans les traitements chroniques par OHB sur les humains et sur les souris, ce qui peut être attribué à la synergie de l' élévation de la pression atmosphérique et de la respiration de l'oxygène à 100%. Dans la OHB appliquée d'une forme aiguë, en suivant un protocole long de traitement du syndrome de décompression, on n'a pas trouvé d'altérations dans la muqueuse nasale, après l'étude par microscopie optique et électronique de transmission. Ce résultat peut être dû à la respiration intercalaire d'air et/ou au sevrage de pression qui est constaté et vérifié tout au long du traitement.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abanses JC, Arima S, Rubin BK, Vicks VapoRub induces mucin secretion, decreases ciliary beat frequency, and increases tracheal mucus transport in the ferret trachea, *Chest*, 2009 Jan;135(1):143-8
- Abdullahi SE, Martelli EA, Bramm E, Franco , Velo GP, Effect of calcitonin on different inflammatory models, *Agents Actions*, 1977 Dec;7(5-6):533-8
- Almendros I, Acerbi I, Vilaseca I, Montserrat JM, Nacajas D, Farré R, Continuous positive airway pressure (CPAP) induces early nasal inflammation, *Sleep*, 2008 Jan 1;31(1):127-31
- Ambiru S, Furuyama N, Aono M, Otsuka H, Suzuki T, Miyazaki M, Analysis of risk factors associated with complications of hyperbaric oxygen therapy, *J Crit Care*, 2008 Sep;23(3):295-300. Epub 2007 Dec 11
- Augusto A, Bussolotti Filho I, Dolci J, König Júnior B, Estudo morofuncional estrutural e ultra-estrutural da mucosa das regiões anteriores do septo e da concha inferior, *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 1999; 65: 472-481
- Bancroft JD, Gamble M, Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone; 5th edn; 2002
- Barros E, Rinite não-alérgica, In: Ruah S, Ruah C (ed), Manual de Otorrinolaringologia, 1998, Roche Farmacêutica Química, Lda
- Barry PW, Mason NP, O'Callaghan C, Nasal mucociliary transport is impaired in altitude. *Eur Respir J*, 1997; 10 : 35-37
- Barry PW, Mason NP, Richalet JP, Nasal peak inspiratory flow at altitude. *Eur Respir J*, 2002 Jan;19(1):16-9
- Becker W, Naumann HH, Pfaltz CR, Ear, Nose and Throat Diseases, Buckingham RA (ed), 2nd edition, Thieme, 1994
- Berg S, Wollmer P, Andersson M, Persson CG, Greiff L, Effects of experimental changes in nasal airway pressure on mucosal output of plasma, *Clin Physiol Funct Imaging*, 2003 May;23(3):155-8

Bermüller C, Kirsche H, Rettinger G, Riechelmann H, Diagnostic Accuracy of Peak Nasal Inspiratory Flow and Rhinomanometry in Functional Rhinosurgery, *Laryngoscope*, 2008 Apr;118(4):605-10

Bernareggi M, Radice S, Rossono G, Oriani G, Chiesara E, Berti F, Hyperbaric oxygen increases plasma exudation in rat trachea: involvement of nitric oxide, *Br J Pharmacol*, 1999 Feb;126(3):794-800

Bernstein JA, Azelastine hydrochloride: a review of pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability, *Curr Med Res Opin*, 2007 Oct;23(10):2441-52

Bitterman N, Bitterman H, Oxygen toxicity, In: D. Mathieu (ed.) Handbook on hyperbaric medicine, 2006, Springer, Netherlands, 731-765

Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization, Allergic rhinitis and its impact on asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334

Bromberg LE, Enhanced nasal retention of hydrophobically modified polyelectrolytes, *J Pharm Pharmacol*, 2001 Jan;53(1):109-14

Calderón-Garcidueñas L, Valencia-Salazar G, Rodríguez-Alcaraz A, Gambling TM, García R, Osnaya N, Villarreal-Calderón A, Devlin RB, Carson JL, Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(2), 2001, 132-138

Chanez P, Vignola AM, Vic P, Guddo F, Bonsignore G, Godard P, Bousquet J, Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects, *Am J Respir Crit Care Med*, 1999 Feb;159(2):588-95

Chavko M, Mahon RT, McCarron RM, Mechanisms of protection against pulmonary hyperbaric O<sub>2</sub> toxicity by intermittent air breaks, *Eur J Appl Physiol*, 2008 Mar;102(5):525-32. Epub 2007 Nov 22

Cho HY, Hotchkiss JA, Bennet CB, Harkema JR, Neutrophil-dependent and neutrophil-independent alterations in the nasal epithelium of ozone-exposed rats, *Am J Respir Crit Care Med*, 2000 Aug;162(2 Pt 1):629-36

Cho HY, Hotchkiss JA, Harkena JR, Inflammatory and epithelial responses during the development of ozone-induced mucous cell metaplasia in the nasal epithelium of rats, *Toxicol Sci*, 1999 Sep;51(1):135-45

Ciprandi G, Tosca MA, Passalacqua G, Canonica GW, Intranasal mometasone furoate reduces late-phase inflammation after allergen challenge, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001 Apr; 86(4):433-8.

Clode J, História da Otorrinolaringologia, SPORL, 2003

Deitmer T, Muller S, Effect of low frequency air oscillations on nasal mucociliary transport, *Acta Otolaryngol* 1992; 112(1):102-6

Demchenko IT, Welty-Wolf KE, Allen BW, Piantadosi CA, Similar but not the same: Normobaric and hyperbaric pulmonary oxygen toxicity, the role of nitric oxide, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293: L229-L238, 2007

d'Errico A, Pasian S, Baratti A, Zanelli R, Alfonzo S, Gilardi L, Beatrice F, Bena A, Costa G, A Case-control Study on Occupational Risk Factors for Sino-nasal, *Cancer Occup Environ Med*, 2009

Genç E, Ergin NT, Bilezikçi B, Comparison of suture and nasal packing in rabbit noses, *Laryngoscope*, 2004 Apr;114(4):639-45

Harch PG, Kriedt C, Van Meter KW, Sutherland RJ, Hyperbaric oxygen therapy improves spatial learning and memory in a rat model of chronic traumatic brain injury, *Brain Res*, 2007 Oct 12;1174:120-9. Epub 2007 Aug 16

Haruta S, Hanafusa T, Fukase H, Miyajima H, Oki T. An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intranasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers, *Diabetes Technol Ther*, 2003;5(1):1-9.

Höfer D, Drenckhahn D, Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells, *Histochem Cell Biol*, 105: 405-412, 1996

Illum L, Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*, 2004 Jan;56(1):3-17

Jacquot L, Pourie G, Buron G, Monnin J, Brand G, Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment, *Toxicol Lett*, 2006 Aug 1;165(1):57-65. Epub 2006 Mar 29

Johnson VJ, Yucesoy B, Reynolds JS, Fluharty K, Wang W, Richardson D, Luster MI, Inhalation of toluene diisocyanate vapor induces allergic rhinitis in mice, *J Immunol*, 2007 Aug 1;179(3):1864-71

Kindwall E, Editor, Hyperbaric Medicine Practice, 1995, p. 46

Kinhult J, Egesten A, Benson M, Uddman R, Cardell LO, Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen, *Clin Exp Allergy*, 2003 Aug;33(8):1141-6

Knipping S, Holzhausen HJ, Goetze G, Riederer A, Bloching MB, Rhinitis medicamentosa: electron microscopic changes of human nasal mucosa, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007 Jan;136(1):57-61.

Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinasty A, Bitterman N, Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages, *Clin Exp Immunol*, 1995, 102(3), 655-9

Law L, Zheng L, Orsida B, Levvey B, Oto T, Kotsimbos AT, Snell GI, Williams TJ, Early changes in basement membrane thickness in airway walls post-lung transplantation, *J Heart Lung Transplant*, 2005 Oct;24(10):1571-6

Lee IW, Goh EK, Roh HJ, Lee CH, Chung BJ, Chon KM, Histologic changes in the eustachian tube mucosa of rats after short-term exposure to cigarette smoke, *Otol Neurotol*, 2006 Apr;27(3):433-40

Lepore ML, Nasal septal abnormalities, In: Jafek BW, Murrow BW, ENT Secrets, 2004, Hanley & Belfus Inc., Philadelphia

Liu X, Xing Z, Yu L, Dong J, Deng F, Acute injury of inhalable particle matters on nasal mucous membrane of rat, *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2008 Jan;22(2):84-7

Loureiro C, Rinite alérgica, In: João Paço (ed), Patologia naso-sinusal, 2008, Bialfar

Lund VJ, Anatomy of the nose and paranasal sinuses, In: Rerr AJ (Ed) Scott-Brown's Otolaryngology, 6 th edition, Butterworth-Heinemann, UK, 1997

Marraccini P, Cantone L, Previdi M, Patrini L, Costamagna P, Respiratory allergy to nickel. Description of an atypical clinical case, *G Ital Med Lav Ergon*, 2008 Apr-Jun;30(2):139-41

Mathieu D, Favery R, Collet F, Linke JC, Wattel F, Physiologic effects of hyperbaric oxygen on hemodynamics and microcirculation, In: D. Mathieu (ed.) Handbook on hyperbaric medicine, 2006, Springer, Netherlands, 75-101

Mathieu D, Wattel F, Physiologic effects of hyperbaric oxygen on microorganisms and host defenses against infection, In: D. Mathieu (ed.) Handbook on hyperbaric medicine, 2006, Springer, Netherlands, 103-119

Mauderly JL, Gigliotti AP, Barr EB, Bechtold WE, Belinsky SA, Hahn FF, Hobbs CA, March TH, Seilkop SK, Finch GL, Chronic inhalation exposure to mainstream cigarette smoke increases lung and nasal tumor incidence in rats, *Toxicol Sci*, 2004 Oct;81(2):280-92. Epub 2004 Jun 22

Minshall E, Ghaffar O, Cameron L, O'Brien F Quinn H, Rowe-Jones J, Davies RJ, Prior A, Lund VJ, Mackay IS, Nolop K, Lutski B, Durham SR, Hamid O, Assessment by nasal biopsy of long-term use of mometasone furoate aqueous nasal spray (Nasonex) in the treatment of perennial rhinitis, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998 May; 118(5):648-54

Mo JH, Han Dh, Shin HW; Cha W, Chang MY, Jin HR, No packing versus packing after endoscopic sinus surgery: pursuit of patients' comfort after surgery, *Am J Rhinol*, 2008 Sep-Oct;22(5):525-8

Narozny W, Sicko Z, Stankiewicz CZ, Przewozny T, Pegiel-Sicko, The effect of hyperbaric oxygen on nasal mucociliary transport *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2002; 027(3):140-6

Niimi A, Chung KF, Airway inflammation and remodelling changes in patients with chronic cough: do they tell us about the cause of cough?, *Pulm Pharmacol Ther*, 2004;17(6):441-6

Nikfarjam M, Cuthbertson CM, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Millar I, Christophi C, Hyperbaric oxygen therapy reduces severity and improves survival in severe acute pancreatitis, *J Gastrointest Surg*, 2007 Aug;11(8):1008-15

Nikula KJ, Sabourin PJ, Frietag BC, Birdwhistell AJ, Hotchkiss JA, Harkema JR, Biochemical and morphologic responses of rat nasal epithelia to hyperoxia, *Fundam Appl Toxicol*, 1991 Nov;17(4):675-83

Ostrowski RP, Graupner G, Tivota E, Zhang J, Chiu J, Dach N, Corleone D, Tang J, Zhang JH, The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia, *Neurobiol Dis*, 2008 Jan;29(1):1-13. Epub 2007 Jul 28

Owens DR, Zinman B, Bolli G. Alternative routes of insulin delivery. *Diabet Med*, 2003 Nov;20(11):886-98

Pagano A, Barazzone-Argiroffo C, Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury, *Ann N Y Acad Sci*, 2003 Dec;1010:405-16

Pelo S, Gasparini G, Di Petrillo A, Tassiello S, Longobardi G, Boniello R, Le Fort I osteotomy and the use of bilateral bichat bulla adipose flap: an effective new technique for reconstructing oronasal communications due to cocaine abuse, *Ann Plast Surg*, 2008 Jan;60(1):49-52

Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB, Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004 Dec;31(6):626-32. Epub 2004 Aug 27

Popesko P, Rajtová V, Horák J, A Colour Atlas od Anatomy of Small Laboratory Animals. Volume two: rat, mouse, hamster, 1992. Wolf Publishing Ltd., London, England

Portier F, Faulcon P, Lamblin B, Bonfils P, Signs and symptoms, etiologies and clinical course of parosmia + in a series of 84 patients, *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 2000 Feb;117(1):12-8

Priestley J, Experiments and observations on different kinds of air. In: Priestly J, ed. The Discovery of Oxygen Part I. Vol 11. Edinburgh: 1923

Proctor DF, Andersen IB, The nose, Elsevier Biomedical, ed, Amsterdam, 1982, 501

Qin Z, Song S, Xi G, Silbergbeit R, Keep RF, Hoff JT, Hua Y, Preconditioning with hyperbaric oxygen attenuates brain edema after experimental intracerebral hemorrhage, *Neurosurg Focus*, 2007 May 15;22(5):E13

Reznik GK, Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract, *Environ Health Perspect*, 1990 April; 85: 171–176

Rhel RM, Balla AA, Cabay RJ, Hearp ML, Pytynia KB, Joe SA, Mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis, *Am J Rhinol*, 2007 Nov-Dec;21(6):651-7

Ríos-Blanco MN, Yamaguchi S, Dhawan-Robl M, Kessler W, Schoonhoven R, Filser JG, Swenberg JA, Effects of propylene oxide exposure on rat nasal respiratory cell proliferation, *Toxicol Sci*, 2003 Oct;75(2):279-88. Epub 2003 Jul 11

Roque F, Mundo Médico, Oxigénio hiperbárico: Fundamentos para uso terapêutico, 19, 22-29, 2001

Rouviére H, Delmas A, Anatomie humaine, Tome I, 12<sup>e</sup> Édition, Masson, Paris, 1984

Roux FX, Behm E, Page P, Laccourreye O, Pages JC, Brasnu D, Adenocarcinomas of the ethmoid sinuses, Epidemiological data, *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 2002 Nov;119(5):271-80

Ruah S, Ruah C (Ed), Manual de otorrinolaringologia, Volume IV, Roche Farmacêutica Química, Lda, 1998

Sacchetti C, Artusi M, Santi P, Colombo P. Caffeine microparticles for nasal administration obtained by spray drying. *Int J Pharm*, 2002 Aug 21;242(1-2):335-9

Sanchez EC, Hyperbaric oxygenation in peripheral nerve repair and regeneration, *Neurology Res*, 2007 Mar;29(2):184-98

Schrodter S, Biermann E, Halata Z, Histologic evaluation of nasal epithelium of the middle turbinate in untreated OSAS patients and during nCPAP therapy, *Rhinology* 2004; 42(3):153-7

Simon C, Toussaint B, Coffinet L, Tumeurs malignes des cavités nasales et paranasales, Encyc Méd Chir (Elsevier, Paris), Oto-Rhino-Laryngologie, 20405 A<sup>10</sup>, 1997, 19p

Shyu KG, Hung HF, Wang BW, Chang H, Hyperbaric oxygen induces placental growth factor expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Life Sci*, 2008 Jul 4;83(1-2):65-73. Epub 2008 May 23

Standing S, Gray's Anatomy, the anatomical basis of clinical practice; 39th edition, Elsevier, 2005

Steinke JW, Woodard CR, Borish L, Role of hypoxia in inflammatory upper airway disease, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008 Feb;8(1):16-20

Sunderman FW Jr, Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals, *Ann Clin Lab Sci*, 2001 Jan;31(1):3-24

Tuck SA, Ramos-Barbón D, Campbell H, McGovern T, Karmouty-Quintana H, Martin JG. Time course of airway remodelling after an acute chlorine gas exposure in mice, *Respir Res*, 2008 Aug 14;9:61

Turker S, Onur E, Ozer Y. Nasal route and drug delivery systems, *Pharm World Sci*, 2004 Jun;26(3):137-42

Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, Xie M, Yu XH, Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats, *Brain Res*, 2008 Jul 30;1222:87-94. Epub 2008 May 18

Wattel F, Mathieu D, Methodology for assessing hyperbaric oxygen therapy in clinical practice, In: D. Mathieu (ed.) *Handbook on hyperbaric medicine*, 2006, Springer, Netherlands, 163-170

Wayoff M, Jankowski R, Haas F, Physiologie de la muqueuse respiratoire nasale et troubles fonctionnels – Editions techniques – Encyc Méd Chir (Paris, France), Oto-Rhino-Laryngologie, 20290 A<sup>10</sup>, 1991, 14p

Weslau W, Physiologic effects of increased barometric pressure, In: D. Mathieu (ed.) *Handbook on hyperbaric medicine*, 2006, Springer, Netherlands, 31-47

Wilson AM, Sims EJ, Robb F, Cockburn W, Lipworth BJ, Peak inspiratory flow rate is more sensitive than acoustic rhinometry or rhinomanometry in detecting corticosteroid response with nasal histamine challenge, *Rhinology*, 2003 Mar;41(1):16-20

Woutersen RA, Appelman LM, Feron VJ, Van der Heijden CA, Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months, *Toxicology*, 1984 May 14;31(2):123-33

Xu F, Fok TF, Yin J, Hyperoxia-induced lung injury in premature rat: description of a suitable model for the study of lung diseases in newborns, *Chin Med J (Engl)*. 1998 Jul;111(7):619-24

Xue L, Yu Q, Zhang H, Wang C, Wang Y, Effect of large dose hyperbaric oxygenation therapy on prognosis and oxidative stress of acute permanent cerebral ischemic stroke in rats, *Neurol Res*, 2008 May;30(4):389-93

Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ, Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model, *J Invest Dermatol*, 2008 Aug;128(8):2102-12. Epub 2008 Mar 13