

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

ANGÉLICA SÍLVIA LAMBERT

**EFEITOS INDUZIDOS PELO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE
Escherichia coli NOS TECIDOS PULMONAR E DIAFRAGMÁTICO EM
ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

São José dos Campos, SP
2007

ANGÉLICA SÍLVIA LAMBERT

**“EFEITOS INDUZIDOS PELO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE
Escherichia coli NOS TECIDOS PULMONAR E DIAFRAGMÁTICO EM
ANIMAIS EXPERIMENTAIS”**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Josane Mittmann
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Aimbire de
Carvalho

São José dos Campos, SP
2007

L223e

Lambert, Angélica Sílvia

Efeitos induzidos pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* nos tecidos pulmonar e diafragmático em animais experimentais / Angélica Sílvia Lambert; Orientadora: Profa Dra Josane Mittmann, co-orientador Prof., Dr. Flavio Aimbire de Carvalho. São José dos Campos: Univap, 2007.

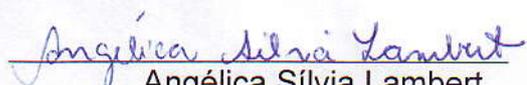
1 disco laser, color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. LPS 2. Histopatologia 3 Pulmão. 4. Diafragma I. Mittmann, Josane, Orientadora II. Carvalho, Flavio Aimbire, co-orient. III Título

CDU: 615.8

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.


Angélica Sílvia Lambert

20 de dezembro de 2007.

ANGÉLICA SILVIA LAMBERT

**“EFEITOS INDUZIDOS PELA LIPOPOLISSACARÍDEOS DE
ESCHERICHIA COLI NAS CÉLULAS PULMONARES E
DIAFRAGMÁTICAS DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO** (UNIVAP)

Prof.^a Dra. **JOSANE MITTMANN** (UNIVAP)

Prof.^a Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP)

Prof.^a Dra. **ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA** (USP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 20 de dezembro de 2007.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida e pela capacidade de sonhar.

A Ulysses por me fazer acreditar que sonhos são possíveis.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me presentear com tantas bênçãos.

A minha família, especialmente meus pais por tudo o que fizeram por mim, pelo todo apoio e consolo, a minha nova família em especial a Dorotéia, pela generosidade e carinho.

A Ulysses por toda a amizade, dedicação e amor diário, e incentivo mesmo nas dificuldades, esta conquista também é um mérito seu.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado. A todos os amigos da Univap, Aline, Alexandre, Alison, Davi e principalmente á Vinícius por todo o auxílio nos laboratórios, a toda turma do mestrado de Bioengenharia 2006, pelo carinho e amizade compartilhada, e á Juliana e Carolina Di Lorenzo, pela acolhida sincera .

A todos os professores da UNIVAP, em especial para Prof Dr Marco Antônio, Profª Drª Cristina Pacheco Soares e Prof Dr Newton Soares da Silva, pelo auxílio científico e disponibilização dos laboratórios, e as funcionárias Valéria, Rúbia e Ivone, que constante mantiveram atenção e disponibilidade.

A Dr. Jarbas de Brito, Profª Roseane Iruguesi, Prof Rodolfo, e Sanseray pelo auxílio nas técnicas histológicas, aos colegas do Centro Universitário de Itajubá (UNIVERSITAS), em especial a Ana Paula Cardoso e Sidney Benedito da Silva e a todos os quais direta ou indiretamente me ajudaram.

À Ana Paula Figueiredo pela ajuda estatística e principalmente pela sua amizade.

Aos amigos do CAS e da Prefeitura Municipal de Piranguinho, em especial à Rita, Carla, Cristiane e Daniela.

Ao Prof Dr Flávio Aimbire de Carvalho, pela ajuda metodológica e instrumental.

Agradeço principalmente e especialmente a minha orientadora Profª Drª Josane Mittmann, onde todos os sentimentos seriam poucos para descrever a gratidão por toda a atenção, apoio, compreensão, paciência e auxílio, tanto científico quanto pessoal, são em pessoas como você que realmente podemos chamar de mestres, muito obrigada!

O Senhor é meu pastor, nada me faltará
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
Restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva,
por amor do seu nome,
Ainda que eu atravessasse o vale escuro,
nada temerei, pois estais comigo.

(Salmo 23)22

LAMBERT, Angélica Sílvia. **Efeitos induzidos pela lipoproteína (LPS) de *Escherichia coli* nos tecidos pulmonar e diafragmático em animais experimentais.** 2007. 53 f. 1 cd-rom. Dissertação (mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

Sepse é a principal causa de mortalidade em pacientes de unidade de terapia intensiva, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano um dos fatores causais mais importantes. A interação do LPS com o hospedeiro está freqüentemente associada a complicações pulmonares e diafragmáticas, que interferem diretamente na mecânica ventilatória. A observação das alterações histológicas e contagem de células inflamatórias decorrentes desta interação possibilita a avaliação da integridade do tecido e correlação com índices de lesão pulmonar. O objetivo deste estudo foi analisar as alterações histológicas e a morfometria pulmonar e diafragmática induzidas pelo LPS ao longo do tempo. Ratos Wistar, foram divididos em seis grupos, sendo controle, 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Após a injeção intravenosa de LPS de *E. coli* (5 mg/kg), os animais foram sacrificados e realizada a análise histológica através da morfometria do tecido pulmonar e diafragmático. Em ambos tecidos verificou-se sinais de resposta inflamatória com o aumento do número de células mononucleares e polimorfonucleares comparado ao grupo controle, sendo mais significativo no tecido pulmonar. As alterações histológicas do parênquima pulmonar foram espessamento da parede alveolar, hiperemia dos vasos sanguíneos, já no diafragma foi visto a hiperemia dos vasos sanguíneos e edema entre as fibras musculares. As alterações histopatológicas em até 24 horas não foram tão pronunciadas, porém verificou-se um aumento crescente do número de células mononucleares e polimorfonucleares em comparação com o grupo controle, sendo mais pronunciado no tecido pulmonar do que no diafragmático. Os dados do perfil eletroforético dos tecidos estudados não evidenciam sinais claros de fragmentação do DNA, que possam indicar apoptose. São necessários novos estudos em tempos maiores de exposição ao LPS para determinar se a endotoxina é capaz de induzir lesões mais pronunciadas, que possam comprometer a função dos tecidos estudados.

Palavras-chave: LPS, histopatologia, diafragma, pulmão, rato.

LAMBERT, Angélica Silvia. **Effects induced by lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* in the lung and diaphragmatic tissues in experimental animals** 2007. 53 f. 1 cd-rom. Dissertação (mestrado) - curso de Bioengenharia, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

Sepsis is the main mortality cause in patients in the intensive care unit, being the bacterial lipopolysaccharide (LPS) one of most important causal factors. LPS interaction with the host is frequently associated to lung and diaphragmatic complications that directly interfere with the mechanics ventilation. Observation of the histological alterations and counting of inflammatory cells from this interaction makes possible evaluate the integrity of the tissue and correlate with lung lesion indexes. The aim of this study was to analysis the histological through morphometric alterations of the lung and diaphragmatic tissue induced by LPS along the time. Wistar rats were divided in six groups control, 1, 3, 6, 12 and 24 hours. After intravenous injection of *E. coli* LPS (5 mg/kg), it was sacrificed and accomplished the histological and morphometric analysis of the lung and diaphragmatic tissues. In both tissues was verified an increase in the number of mononuclear and polymorphonuclear cells compared to the control, more significations on lung tissue. The histological alterations of the lung parenchyma were a thickening of alveolar wall, hyperaemia of the blood vessel. In the diaphragm was observed hyperaemia of the blood vessel and edema between the muscle fibers. The histological alterations up to 24 hours were not so evident; however was verified increase of mononuclear and polymorphonuclear cell number in comparison with the control group, mainly in the lung. Analysis of DNA fragmentation by agarose gel eletrophoresis did not demonstrate DNA fragmentation, in the analyzed tissues. Future studies are necessary to determine the exhibition times to LPS endotoxin be able to induce more significative lesions that can affect the tissues function.

Keywords:LPS, histopathology, diaphragm, lung, rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Histologia do parênquima pulmonar	29
Figura 2: Histologia do parênquima pulmonar	30
Figura 3: Histologia do parênquima pulmonar	30
Figura 4: Histologia da musculatura do diafragma	31
Figura 5: Média das células mononucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.....	32
Figura 6: Média das células polimorfonucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.....	33
Figura 7: Média das células mononucleares e polimorfonucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.....	34
Figura 8: Percentual de total de células do parênquima pulmonar	35
Figura 9: Média das células mononucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS.....	36
Figura 10: Média das células mononucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS, com exceção do grupo 6 horas.....	36
Figura 11: Média das células polimorfonucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS.....	37
Figura 12: Percentual de total de células inflamatórias diafragmáticas.....	38
Figura 13: Percentual de total de células inflamatórias diafragmáticas.....	38
Figura 14: Perfil eletroforético do DNA extraído do tecido pulmonar.	39
Figura 15: Perfil eletroforético do DNA extraído do do tecido diafragmático.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem de células do parênquima pulmonar	32
Tabela 2: Contagem de células do músculo diafragma	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1.1 Infecção e Sepsis	16
2.1.2 Interação do LPS na circulação sistêmica	16
2.1.3 Efeitos do LPS no Sistema Respiratório.....	18
2.1.4 Papel das células inflamatórias	21
2.1.5 Morte celular.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Aspectos Éticos e Legais	25
3.2 Protocolo experimental.....	25
3.3 Análise histopatológica.....	26
3.4 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Análise histológica:	29
4.2 Contagem celular	31
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A – Testes ANOVA	52
ANEXO A – CEP	55

1 INTRODUÇÃO

As alterações ou patologias do sistema respiratório podem ocorrer pela ação de diversos fatores, tanto intrínsecos, por exemplo, devido a alterações genéticas e do sistema imune, quanto por alterações extrínsecas como o contato com poluição, tabagismo e o contato com microorganismos (HOFFMANN, 2003).

A invasão de um tecido por um microorganismo promove uma lesão tecidual ou infecção que pode ocorrer por ação direta às células, pela liberação de toxinas que degradam os componentes teciduais ou pela indução de mecanismos imunes do hospedeiro, sendo esta uma resposta do organismo à agressão, podendo esta lesão ser local ou sistêmica. A sepse é uma resposta sistêmica a esta agressão, geralmente ocorre pela infecção de bactérias gram-negativas, pela liberação de suas endotoxinas ou lipotroteínas que são lipopolissacarídeos da parede celular, liberados quando estas são degradadas (KUMAR; ABBAS; FASTO, 2005)

A sepse é uma das principais causas de morbidades e mortalidade, sendo que as suas complicações como o choque séptico e falência de múltiplos órgãos são as causas mais frequentes de mortes nas unidades de terapia intensiva, mesmo em centros especializados (BOCZKOWSKI *et al*, 1996, GUO, 1998, OZÜDULGER *et al*, 2002).

Os principais pacientes alvos parecem ser os idosos, indivíduos imunodeprimidos, com doenças associadas, crianças pequenas, principalmente as recém nascidas, pois elas possuem uma predisposição a infecção devido a imaturidade ou depressão imunológica (BOCZKOWSKI *et al*, 1996, ORELLANA *et al*, 2006).

A infecção bacteriana pode ser disseminada pela corrente sanguínea, afetando vários órgãos e sistemas, alterando drasticamente a hemodinâmica do organismo, podendo gerar complicações sistêmicas e ser fatal, até mesmo em indivíduos sadios. As alterações hemodinâmicas e celulares provocadas pela sepse podem ser reproduzidas pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) em modelos

animais experimentais, com evidências que a correlacionam fortemente com a patogênese em humanos (LIN *et al*, 1998, AKAMINE *et al*, 1998).

A disfunção respiratória é uma das principais manifestações clínicas da sepse, a lesão do pulmão relaciona-se com a insuficiência respiratória e até mesmo com a síndrome do desconforto respiratório agudo, já o diafragma por ser o principal músculo da mecânica respiratória é também afetado pela ação da endotoxina. Portanto as alterações nestes dois tecidos podem predispor a uma falência respiratória e necessidade de suporte ventilatório, fato que pode agravar ainda mais o quadro dos pacientes, principalmente os que requerem tratamento intensivo (LIN *et al*, 1998, TAILLÉ *et al.*, 2001).

As alterações fisiopatológicas do sistema respiratório apresentam-se de várias formas, dependendo da intensidade da agressão e das respostas imunológicas do hospedeiro.

Quando o tecido pulmonar apresenta um processo inflamatório intenso ocorre lesão endotelial com aumento da permeabilidade capilar e edema, desencadeando a oclusão capilar e isquemia do tecido (d'ACAMPORA *et al.*, 2004).

Já o diafragma apresenta também alterações funcionais quando em contato com o LPS, resultando na sua disfunção contrátil, oriundo de alterações nas proteínas musculares, na glicólise, na produção de ATP e também na formação de radicais de oxigênio (BARREIRO *et al.*, 2005)

A integridade do sistema respiratório é um fator primordial para a sobrevivência humana, as alterações das trocas gasosas ou da contractilidade muscular afetam diretamente o equilíbrio deste sistema. A identificação do tempo transcorrido e dos efeitos causados após injeção do LPS possibilita o desenvolvimento de medidas terapêuticas para auxiliar o suporte do organismo acometido. Sendo clara a íntima relação da necessidade da integridade dos tecidos pulmonar e diafragmático para o bom desempenho da mecânica respiratória torna-se necessária à averiguação da intensidade da ação do LPS nestes tecidos,

compreendendo as repercussões celulares desencadeadas pelo estímulo nocivo e o tempo transcorrido até o aparecimento das alterações celulares e/ou sinais de lesão.

Porém dados a respeito das alterações histológicas decorrentes do contato das células pulmonares e diafragmáticas com LPS e a relação destes fatores com o tempo transcorrido após invasão bacteriana ainda são escassos, sendo necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para a compreensão destes fatores e o desenvolvimento de estratégias de tratamento cada vez mais eficazes e precoces.

1.1 Objetivo Geral

- Analisar o comprometimento histológico pulmonar e diafragmático induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano em modelo experimental.

1.1.2 Objetivos específicos

- Observar a presença de alterações histopatológicas e no número de células mononucleares e polimorfonucleares no tecido pulmonar e diafragmático em diferentes tempos após a injeção com LPS.
- Observar o padrão eletroforético do DNA das células pulmonares e diafragmáticas nos diferentes tempos.
- Correlacionar os dados obtidos com a histologia e da eletroforese do DNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Repercussões do lipopolissacarídeo (LPS) no organismo

2.1.1 Infecção e Sepsis

As doenças infecciosas têm exercido grande influência na humanidade, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade, a infecção é definida como a multiplicação de microorganismos patogênicos no tecido hospedeiro, já a sepsis caracteriza-se por uma resposta inflamatória sistêmica à presença de um processo infeccioso comprovado, que ocorre pela presença de microorganismos e/ou liberação de toxinas que ativam mediadores da inflamação em tecidos previamente estéreis (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSIS, 2003).

A sepsis pode levar a alterações importantes no organismo como perfusão alterada, hipoxemia, alterações do nível de consciência, hipotensão arterial entre outras, atualmente é considerada como a causa mais importante de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva, vários fatores contribuem para o surgimento da sepsis como a crescente população idosa, emprego de técnicas invasivas, maior sobrevivência em doenças debilitantes e imunossupressivas e as infecções hospitalares (AKAMINE *et al*, 1998).

Dentre os microorganismos que podem infectar o organismo hospedeiro as bactérias gram-negativas se destacam por possuírem uma membrana externa adicional composta de lipídios e polissacarídeos, que age como uma camada rígida que protege a bactéria da ação de antibióticos, essa camada denominada de lipopolissacarídeo comumente é utilizada como sinônimo de endotoxina, estas toxinas podem ser liberadas durante a lise da bactéria, o que ocorre na sua morte ou durante a sua multiplicação, essas toxinas possuem a característica de agirem tanto localmente quanto à distância (AKAMINE *et al*, 1998, GUO *et al*, 1998).

A estrutura do LPS é composta de ácidos graxos de cadeia longa, ancorada (lipídeo A) a uma cadeia de açúcar central ambas as cadeias são muito similares em todas as bactérias Gram-negativas. Ligada ao açúcar central, existe uma cadeia

variável de carboidratos (antígeno O), esta é utilizada na sorotipagem e na discriminação entre as diferentes cepas de bactérias, existindo uma alta variedade, mesmo dentro de um mesmo gênero bacteriano. *Escherichia coli* (*E. coli*) é particularmente uma produtora de enterotoxinas, possui uma toxina termolábil imunogênica e uma termoestável não-imunogênica (PARSLOW *et al*, 2004, KUMAR; ABBAS; FASTO, 2005).

A administração de quantidades variáveis de LPS em animais experimentais é capaz de promover uma série de efeitos deletérios ao organismo, estas manifestações vão de simples calafrios até a morte, a ação da endotoxina ocorre de forma indireta mediada por células hematopoiéticas, sendo que por si só o LPS pouco tóxico, necessitando de mediadores endógenos para produzir os eventos da sepse (AKAMINE *et al*, 1998).

A resposta do hospedeiro ao LPS bacteriano pode ser benéfica ou prejudicial, benéfica quando ele ativa a imunidade protetora de várias formas, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas. Todavia, altos níveis de lipopolissacarídeos desempenham papel importante em patologias infecciosas principalmente através da produção de níveis excessivos de citocinas como no choque séptico, na coagulação disseminada, e na síndrome do desconforto respiratório no adulto (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE, 2003).

2.1.2 Interação do LPS na circulação sistêmica

O processo de interação se inicia com a ligação da proteína de ligação do LPS com o receptor de membrana do monócito/macrófago, denominado CD14. A ligação ao receptor ativa uma série de eventos intracelulares e conseqüente ativação de genes relacionados a produção de citocinas tais como fator de necrose tumoral (TNF), e interleucinas (ILs) principalmente a IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18, estes mediadores ativam outras citocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão que promovem migração de células inflamatórias como a migração neutrofílica e também promovem a ativação do processo de

apoptose. Estes mediadores são liberados durante os primeiros 30 a 90 minutos após exposição ao LPS (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE, 2003, KUMAR; ABBAS; FASTO, 2005, HOCKE *et al*, 2006).

Dentre os radicais de oxigênio liberados o óxido nítrico (NO) se destaca, este é produzido no endotélio pela óxido nítrico sintase (iNOS) estando diretamente relacionado com a alteração da permeabilidade alvéolo capilar (CARVALHO; BARBAS; AMATO, 2000). Já nas fibras musculares esqueléticas o NO previne o dano muscular, reduzindo a sua força muscular e evitando a fadiga (SAMBE *et al*, 1998, ANDERSON; WILLIAMS; HEAD, 2001), age também modulando a ação mitocondrial e limitando o consumo de oxigênio (GATH *et al*, 1996).

A resposta imunológica frente a certos membros das enterobactérias pode levar ao desenvolvimento de doença auto-imunológica em determinados hospedeiros. A imunidade contra estas é obtida no início da vida, após a colonização do intestino pela *E. coli* sendo então produzidos os anticorpos contra os antígenos K e O, antes do desenvolvimento destes anticorpos os recém nascidos são suscetíveis á infecção sistêmica, em particular a infecção do sistema nervoso central por *E. coli*, já na vida adulta estas bactérias são causadoras de infecções oportunistas e doenças entéricas (PARSLOW *et al*, 2004).

2.1.3 Efeitos do LPS no Sistema Respiratório

De acordo com o Consenso Brasileiro de Sepsis (2003) as infecções do trato respiratório são as causas mais comuns de sepsis em todo o mundo. Para d'Acampora *et al* (2004), o pulmão é aparentemente o primeiro órgão a ser atingido pela infecção.

O LPS pode modular o metabolismo da glicose e da insulina (ORELLANA, 2002, 2006) após a injeção deste em modelo experimental, alguns tecidos apresentaram captação aumentada de glicose, dentre eles o diafragma, baço, fígado, e pulmão. O aumento ocorreu mesmo às custas de uma redução do consumo de outros tecidos ou em condições de diminuição geral da oferta,

representando uma resposta benéfica de desvio de combustível limitado para tecidos com demanda aumentada (LANG *et al*, 1993).

As enterobactérias podem atingir o sistema respiratório desde a faringe até o pulmão, é uma das principais causas de pneumonia comunitária como das intra-hospitalares, com elevada mortalidade nestes pacientes, ocorrendo predominantemente em indivíduos com doenças graves onde a bactéria já está presente na flora orofaríngea. O quadro clínico-radiológico corresponde geralmente à broncopneumonia que ocasionalmente pode se complicar ocasionado o empiema (GOLDMAN; BENNETT, 1989, GARCÍA; BERMEJO, 1998).

Porém considera-se a pneumonia comunitária menos preocupante, visto que possui etiologia e o menor potencial de complicações, em contrapartida a pneumonia associada à ventilação mecânica apresenta uma série de alterações, cerca de um terço das mortes nestes pacientes é devido à infecção, além disso, 60% destas pneumonias são causadas por bactérias gram-negativas, sendo as enterobactérias agentes importantes (DAVID *et al*, 2000, NIEDERMAN *et al*, 2001)

Uma das formas mais graves e letais de lesão pulmonar aguda é a síndrome do desconforto respiratório agudo, nesta ocorre o comprometimento da função e da estrutura pulmonar, dentre os fatores predisponentes e desencadeadores desta síndrome encontra-se as infecções pulmonares e principalmente as septicemias (BUENO, 1999, CARVALHO; BARBAS; AMATO, 2000, MENEZES, 2002).

A lesão pulmonar desencadeada pelo LPS tem eventos e progressão variável, mas pode ser classificada em três fases, a exudativa, proliferativa e fibrótica (UDOBI *et al*, 2003). A interação entre o LPS e o tecido pulmonar produz um aumento das citocinas pró-inflamatórias assim como perturbações no equilíbrio nas citoxinas pró e anti-inflamatórias. Por sua vez as citocinas ativam neutrófilos que aderem ao endotélio capilar pulmonar e posteriormente migram para o espaço intersticial e alveolar, estes se tornam ativos produzindo citocinas como o TNF- α e ILs que podem lesar o endotélio capilar e alveolar, a ação neutrofílica gera também radicais de superóxidos e proteases que podem lesar o epitélio vascular e alveolar. Os metabólitos do ácido araquidônico causam alterações na auto-regulação e

permeabilidade vascular, a lesão do epitélio e do endotélio leva o aumento da permeabilidade e subsequente influxo de fluido rico em proteínas para dentro do espaço alveolar. Além disso, essas mudanças estruturais evidenciam uma piora na fibrinólise na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que leva a uma trombose capilar e microinfarto (CARVALHO; BARBAS; AMATO, 2000, MORTELLITI; MANNING, 2002).

Entendendo que o processo fibroproliferativo esteja limitado, alguns pacientes alcançam resolução completa de dano pulmonar, já outros progridem e desenvolvem fibrose diretamente, sendo que a extensão desta pode ser determinada pela severidade, continuidade ou repetição do dano, sendo agravado em pacientes críticos pelo efeito tóxico do oxigênio e /ou a lesão induzida pelo ventilador mecânico (MORTELLITI; MANNING, 2002).

As infecções parecem não afetar apenas o tecido pulmonar, para Boczkowski *et al* (1996), uma das principais manifestações que pode ocorrer na sepse e que contribui consideravelmente para a mortalidade nesta condição patológica é o prejuízo da função contrátil dos músculos respiratórios.

Vários autores afirmam que há relação entre a exposição ao LPS e a diminuição da capacidade de contractilidade do músculo respiratório, conseqüentemente a diminuição da sua força, esse fracasso muscular afeta principalmente o diafragma. Vários estudos em animais e também em humanos demonstraram essa relação, sendo que a lesão ocorre principalmente nos pacientes em situações críticas, nas patologias pulmonares crônicas ou em outras condições onde se verifica o prejuízo da função respiratória como no processo de retirada da assistência do suporte ventilatório, em indivíduos desnutridos ou com desordens neuromusculares (GUO *et al*, 1998, BOCZKOWSKI *et al*, 1999, ANDERSON; WILLIAMS; HEAD, 2001, COINTOIN, *et al*, 2001, SUPINSKI; CALLAHAN, 2006a).

A diminuição da contractilidade foi atribuída por diversos autores pela fadiga da musculatura, esta secundária a lesão do sarcolema, afetando as propriedades elásticas e conseqüentemente as contrações do músculo (LIU *et al*, 1997, COINTOIN, *et al*, 2001, ANDERSON; WILLIAMS; HEAD, 2001). Já Liu *et al* (2002)

verificou que a lesão do sarcolema ocorre pela alteração da função das miofibrinas e dos canais de cálcio afetando diretamente as características elétricas e contrácteis do diafragma.

A sepse está relacionada também com alterações mitocondriais importantes, Supinski e Callahan (2006b) verificaram em seu estudo a deficiência orgânica de mitocôndrias após indução do LPS no músculo diafragmático e cardíaco, porém esse evento também pode ser verificado em outros tecidos.

Desta forma as infecções causadas pelo LPS promovem tanto a lesão pulmonar como a fraqueza da musculatura esquelética respiratória, causando uma alteração da mecânica ventilatória normal levando a grande maioria dos pacientes acometidos a necessitarem do uso de algum suporte ventilatório. Porém sabe-se que a ventilação mecânica invasiva, utilizada por um período prolongado ou com altos níveis pressóricos pode também promover respectivamente a fraqueza da musculatura diafragmática e principalmente a lesão pulmonar (DUARTE, 2000, DAVID *et al*, 2000, IMANAKA *et al*, 2001).

2.1.4 Papel das células inflamatórias

Embora todos os tipos de leucócitos contribuam para a defesa do organismo do hospedeiro três tipos apresentam papéis predominantemente especiais, os macrófagos, linfócitos e neutrófilos, sendo que os macrófagos e neutrófilos atuam na fagocitose de bactérias, restos celulares e materiais particulados (GUYTON; HALL, 1996, PARSLOW, 2004).

Já os linfócitos possuem pouca ação fagocítica, mas realizam uma série de reações protetoras, sendo os principais agentes da imunidade adquirida, sua ação fagocitária ocorre em conjunto com as células da fagocitose, eles possuem a capacidade de reconhecer e matar diretamente muitos patógenos, sendo efetores celulares mais importantes da imunidade inata (AKAMINE *et al*, 1998, UCHÔA; CARNEIRO, 2004, PARSLOW, 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias difusamente espalhadas, são indistinguíveis em condições normais e se assemelham entre si na função e aspecto, porém em alguns tecidos diferem-se exibindo características morfológicas específicas. Quando os macrófagos se deparam com certos mediadores inflamatórios como o LPS ou com outros sinais de lesão estes são ativados, englobam então quaisquer partículas até alvos maiores, degradando o material fagocitado pela ação dos lisossomos. Os macrófagos estão envolvidos também na liberação de substâncias biologicamente ativas como a elastase e colagenase que auxiliam no processo de reparação, as citocinas como IL-6, prostaglandinas, quimiocinas e óxido nítrico que possui ação antimicrobiana e atua na liberação de mediadores vasoativos da inflamação, entre outras (PARSLOW, 2004, ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O macrófago interage com as citocinas dos linfócitos (TNF e IL-12) que controlam a proliferação, diferenciação e função efetora dos linfócitos, os macrófagos atuam também como células apresentadoras de antígeno, isso é elas processam e exibem substâncias estranhas numa forma que os linfócitos possam responder (PARSLOW, 2004, TEER, 2004).

Vários mediadores inflamatórios são produzidos também pelos macrófagos alveolares, como verificado por exemplo nos casos de desenvolvimento de SDRA em pacientes de neutropênicos (MORTELLITI; MANNING, 2002).

Já os polimorfonucleares são as células mais numerosas na resposta aguda a sepse (d'ACAMPORA *et al*, 2004). Os neutrófilos exercem função vital e indispensável na defesa do organismo hospedeiro contra microorganismos invasores, a migração de neutrófilos através do endotélio vascular e da barreira epitelial ocorre sem haver alterações de permeabilidade epitelial, porém o seu acúmulo (quantidade) e principalmente o seu estado de ativação nos pacientes com lesão pulmonar, correlacionam-se com índices de gravidade da lesão pulmonar (MENEZES, 2002)

Segundo White *et al* (1993) o processo inflamatório é resolvido quando ocorre a remoção de neutrófilos e demais células inflamatórias pela indução da apoptose,

sendo que os neutrófilos humanos estão constantemente em apoptose pois apresentam-se nesta fase funcionalmente inativos.

2.1.5 Morte celular

A morte celular definida como perda irreversível da estrutura e função celular é um fenômeno vital para os organismos e compreende dois padrões morfológicos distintos. A mais comum, a necrose, manifesta-se por uma tumefação ou ruptura celular, desnaturação e coagulação de proteínas citoplasmáticas e degeneração de organelas, já a apoptose ou morte celular programada é caracterizado como um evento mais regulado, destinado á eliminação de populações indesejadas de células durante a embriogênese ou em processos fisiopatológicos que envolvem a involução de células individuais, é um processo ativo que requer energia e que apresenta pouco dano ao tecido vizinho (MENEZES, 2002)

A mitocôndria parece ter papel importante na lesão celular induzida pela sepse ou infecções bacterianas indicando que nestas manifestações ocorre diminuição da taxa de produção de ATP pela mitocôndria. A produção de ATP pode ser gerada por metabolismo anaeróbio, conduzindo a formação intracelular de lactato e acidose. Além disso, durante a sepse, porém podem ser produzidos radicais livres de oxigênio como superóxido e peróxido de hidrogênio, estes podem potencialmente reagir com múltiplos componentes celulares alterando a função das proteínas enzimáticas e de elementos estruturais, finalmente o dano mitocondrial pode ocorrer por liberação do citocromo c, que ativaria a formação e liberação de caspases e iniciaria a apoptose celular (SUPINSKI; CALLAHAN, 2005b).

A apoptose ou morte celular programada é uma via induzida por um programa intracelular altamente regulado no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana plasmática permanece intacta, mas a sua estrutura é alterada de forma a tornar a célula um alvo primário de fagocitose, desta forma a célula em apoptose é fagocitada sem que seu conteúdo extravase, desta forma a morte celular não desencadeia uma reação inflamatória no hospedeiro, diferindo assim da necrose que

apresenta perda da integridade das membranas, digestão enzimática e freqüente reação do hospedeiro (GREEN; REED, 1998, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

As modificações bioquímicas freqüentes neste evento são a degradação de proteínas pela ativação das caspases, estas são pré-enzimas inativas nas células normais que quando ativadas destroem a estrutura nuclear e o citoesqueleto, além de ativar DNases que degradam o DNA nuclear. Outro evento é a decomposição do DNA em pequenos fragmentos com conseqüente clivagem internucleossomal do DNA, uma maneira de identificá-los é visualizando os fragmentos pela eletroforese em gel de agarose com a formação de bandas de padrão característico. Entretanto a clivagem internucleossomal do DNA não é específica, necessariamente para apoptose, o padrão “manchado” de fragmentação do DNA é considerado indicativo de necrose, mas pode ser um fenômeno autolítico tardio e as bandas típicas de DNA também podem ser vistas em células necróticas (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos e Legais

O estudo foi desenvolvido em modelo animal, realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da (CEP) da Universidade do Vale do Paraíba, tendo sido aprovado sob o número A032/CEP/2006.

3.2 Protocolo experimental

Os animais foram tratados de acordo com as normas de Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA/ junho de 1991, sendo utilizados 18 ratos Wistar, machos, peso corporal entre 200 e 250 gramas, fornecidos pelo biotério da Universidade do Vale do Paraíba UNIVAP – São José dos Campos (SP).

Os animais foram randomizados através de um sistema de envelopes idênticos e divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, controle, 1, 3, 6, 12 e 24 horas, os animais foram mantidos em ambiente limpo e seco, com luz natural, respeitando o ciclo claro/escuro de 12h e oferta diária de ração e água *ad libitum*.

Os animais foram pré-anestesiados e submetidos à administração intravenosa de 5mg/kg de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) via peniana, com exceção do grupo controle.

O tempo analisado após a administração do LPS foi de 1, 3, 6, 12 e 24 horas, após esse período os animais foram pré-anestesiados com zoletil endovenosa 50mg/kg (cloridrato de zolazepam, 25mg/ml; 0.1 ml/kg e cloridrato de tiletamina 25mg/ml) e colocados em decúbito dorsal, foi então realizada a abertura abdominal e o sacrifício por exsanguinação da artéria aorta, foi realizada também a abertura torácica para a ressecção do diafragma e do pulmão.

Os animais foram divididos em grupo 1h (n=3), grupo 3h (n=3), grupo 6h (n=3), grupo 12h (n=3), grupo 24h (n=3) e grupo controle C (n=3).

As amostras do lóbulo pulmonar inferior direito e hemicúpula diafragmática direita foram retiradas e congeladas em nitrogênio líquido, preservado a -70° para extração do DNA, já o as amostras do lado esquerdo foram colocadas em imersão na substância fixadora de formol 10% por 48 horas e processado para estudo histológico.

3.3 Análise histopatológica

As amostras do pulmão foram submetidas ao processo de desidratação onde foram colocados em imersão em álcool 70% por 24 horas e em álcool 96% pelo mesmo período, o processo foi finalizado pela imersão em álcool absoluto (100%) por 8 horas.

Foram realizadas duas imersões de xilol por 2 horas, após isto as amostras foram impregnadas em parafina resinada Histosec® (Empresa Merck), por duas vezes, pelo período de 2 horas cada uma, antes de serem emblocados.

Já as amostras do diafragma foram lavadas em água corrente por um minuto, foi realizada a desidratação seqüencialmente em álcool 50, 70 e 100% por 1 hora e meia cada, após a etapa de desidratação foi realizada duas imersões de xilol por 2 horas cada e realizada a impregnação em dois banhos de parafina resinada Histosec® (Empresa Merck) durante 2 horas cada por duas vezes, logo após as amostras foram emblocadas.

O material foi processado manualmente quando estava no bloco de parafina em micrótomo Leica 818 (Leica Microsystems), em cortes axiais, com espessura de 3 μ m, desparafinados e submetidos a coloração com hematoxilina-eosina (HE) e examinados independentemente por um investigador de forma cega.

As amostras passaram por duas análises, a quantitativa com contagem das células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (macrófagos e linfócitos) onde foi usada a análise morfométrica pela técnica de contagem de pontos, com auxílio de grade ocular de contagem composta por 100 pontos e 50 linhas denominado retículo, com área de 10.000 μm^2 e observando por um aumento de aumento de 1000x. A contagem foi realizada em cinco campos não coincidentes e aleatórios. A análise qualitativa foi realizada pela observação da presença de alterações como edema, hemorragia e a própria integridade tecidual por meio de microscopia óptica.

Para a análise estatística os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, as diferenças das variáveis entre os grupos foi analisado utilizado o teste de variância one-way. Para identificarmos se é estatisticamente comprovado que diante dos dados coletados ocorreu um aumento do número de células, ao longo das 24 horas, comparado com o controle foi realizado o teste ANOVA, o nível de significância estabelecido foi de 5%.

3.4 Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose

Seguindo o protocolo de procedimentos publicado por Fliss e Gattinger (1996) as amostras do pulmão e do diafragma foram isoladas (200 a 500mg) com o mesmo volume de solução de homogeneização (10 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl, 25 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, com 100 $\mu\text{mol/L}$ NaCl, pH 8.0) a 0°C, foram homogeneizados no equipamento Dispergierantrieb T10, IKA® por 30 segundos a 10 000 rpm. Uma amostra de 100 μL do homogeneizado foi misturada a de 1,25 mL de solução tampão (10 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl, 25 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 100 $\mu\text{mol/L}$ NaCl, e 1.0% SDS, pH 8.0) onde a suspensão foi incubada por 15min a temperatura ambiente.

A suspensão foi então centrifugada a 13.000 xg por 15 min a temperatura ambiente e o sobrenadante enriquecido de fragmentos de DNA foram coletados com o cuidado de não perder o sedimento com característica viscosa contendo o DNA, a

este foi acrescido 100µg/mL de proteinase K por 30min a 50°C e deixado para precipitação em overnight a -20° C.

O DNA foi coletado após com a centrifugação da etapa anterior em 13.000 xg por 15min a 4°C, dissolvido em 500µL de solução tampão TE (10mmol/L Tris-HCl e 1 mmol/L EDTA, ph 8.0). A solução de DNA foi extraída com fenol clorofórmio saturado conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

A solução de DNA foi lavada e novamente extraída com clorofórmio e precipitada com 60% de etanol com 0,5 mol/L de NaCl a -20°C por uma hora. O DNA coletado foi centrifugado, dissolvido em 50µL solução de TE e tratados com RNase (100µg/mL) por 30 min a 37°C, e imediatamente submetido a eletroforese em gel de agarose (1.5%) com tampão de TAE (40mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L ácido acético e 2 mmol/L EDTA, pH 8.0). Os resultados foram visualizados em transluminador (Transluminador UV 302 nm – T26M, BioAgency).

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica

Na análise histológica do tecido pulmonar pôde-se observar a presença de alterações histológicas no decorrer ao tempo do tempo analisado, como o espessamento dos septos alveolares e a hiperemia dos vasos sanguíneos conforme demonstra a figura 1, para os grupos de 1 hora e 3 horas quando comparados ao grupo controle.

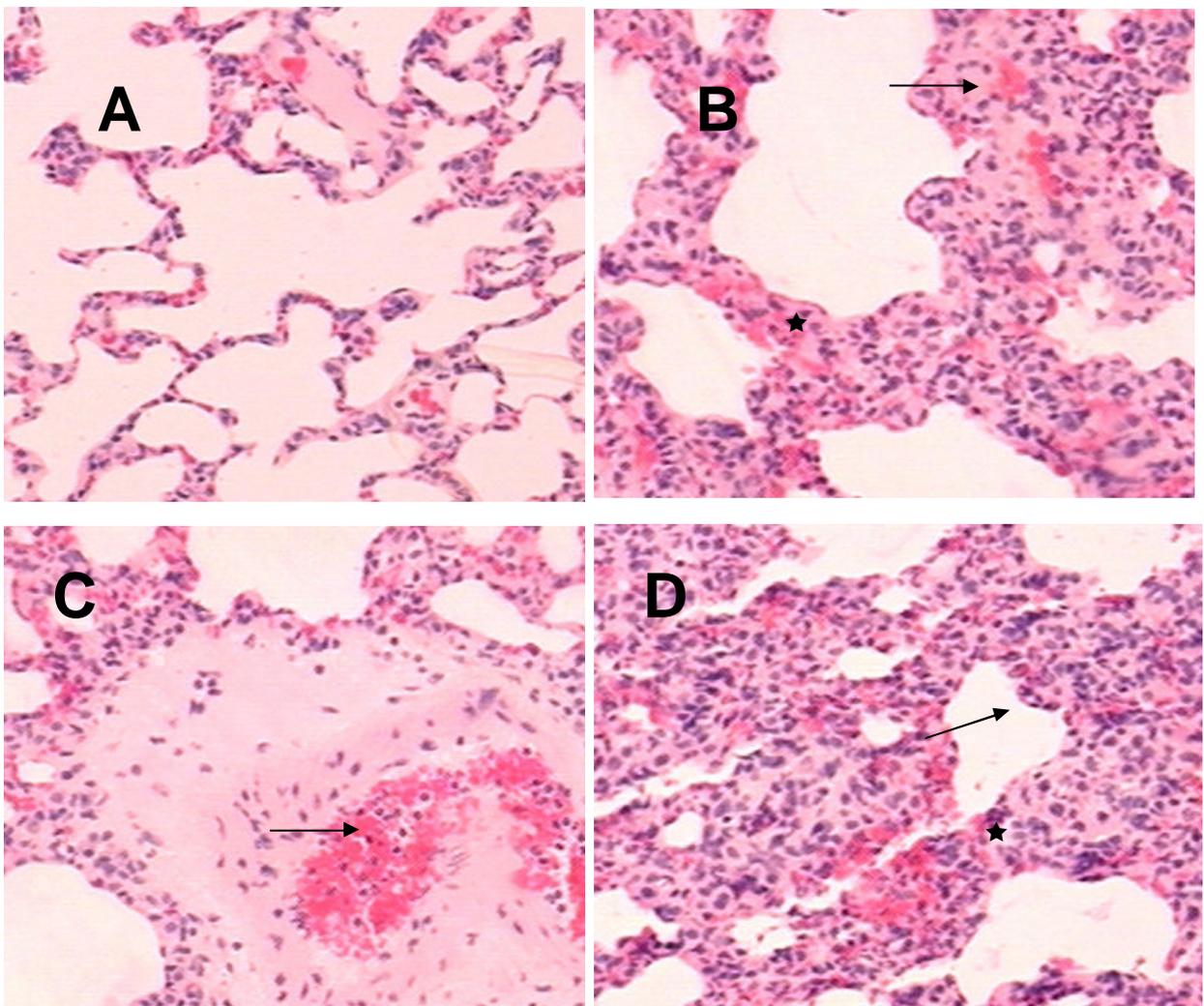


Figura 1:Histologia do parênquima pulmonar

(A) Grupo controle 100x (B) Grupo 1h (★) espessamento dos septos alveolares, (→) hiperemia dos vasos sanguíneos (→) 100x, (C) Grupo 1h mantém padrão descrito em (B) nota-se vasos hiperemiados com a presença de polimorfonucleares (→) 100x (D) Grupo 3h observa-se a presença do espessamento dos septos (★) e a presença de polimorfonucleares de permeio (→). 100x

A presença de células polimorfonucleares e mononucleares foi observada nos vasos hiperemiados após três horas de injeção do LPS, conforme destacado na

figura 2A. Após seis horas, os vasos mantêm o mesmo padrão de hiperemia com o aumento do número de células, representado principalmente por polimorfonucleares (Figura 2B).

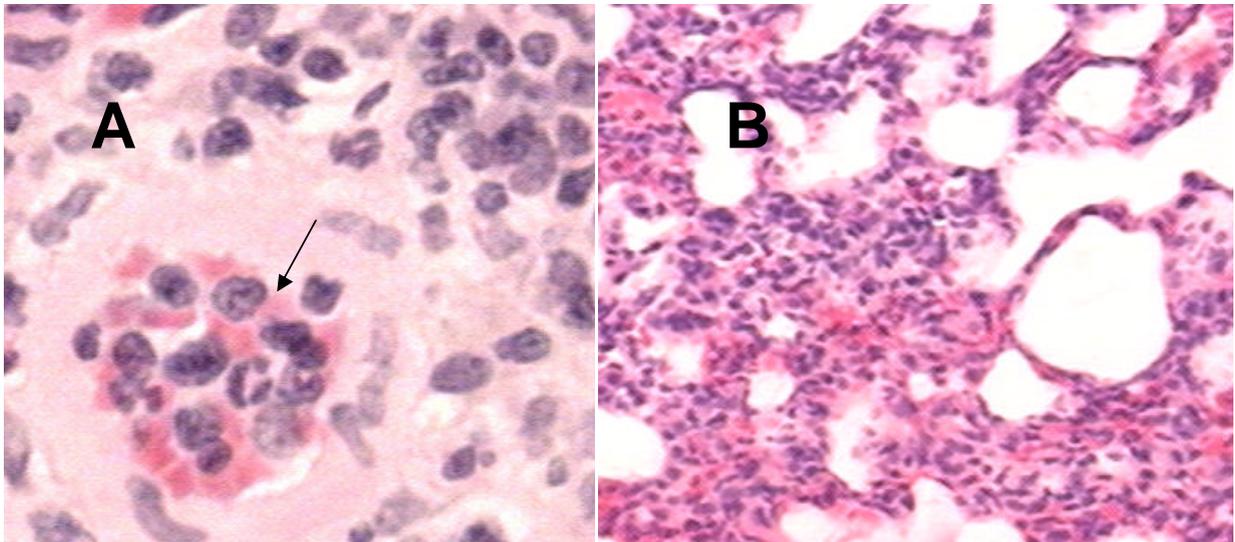


Figura 2: Histologia do parênquima pulmonar

(A) Grupo 3h vaso sanguíneo discretamente hiperemiado com a presença de mononucleares e polimorfonucleares (→) 400x, (B) Grupo 6h padrão de hiperemia com o aumento do número de células, representado principalmente por polimorfonucleares. 100x

O parênquima pulmonar nos grupos 12 e 24 horas após injeção do LPS ambos os cortes apresentam as alterações já observadas no grupo 6 h (Figura 3A e B).

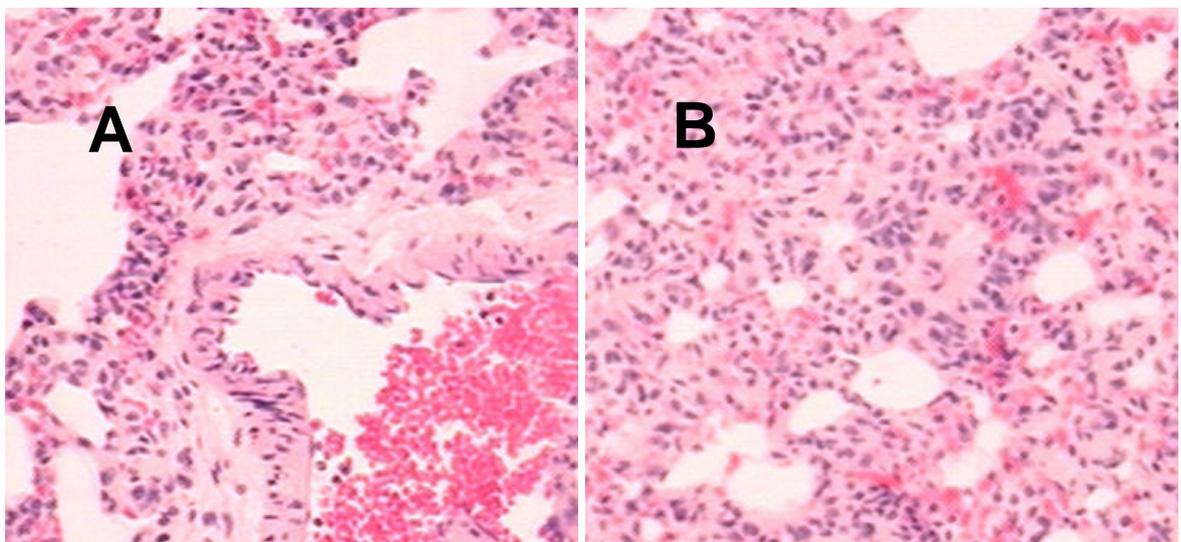


Figura 3: Histologia do parênquima pulmonar

(A) Grupo 12h (B) Grupo 24h, discreta hiperemia, escassos número de polimorfonucleares 100x.

Na figura 4 podemos verificar as alterações diafragmáticas, verificamos discreta hiperemia do vaso no grupo uma hora (Figura 4B, 4C), quando comparado ao controle. Sendo que após seis horas o mesmo padrão foi observado (dados não

mostrados). Destaca-se, entretanto, que a partir de 12 horas após injeção do LPS observa-se a presença de edema entre as fibras musculares (Figura 4 D, E e F).

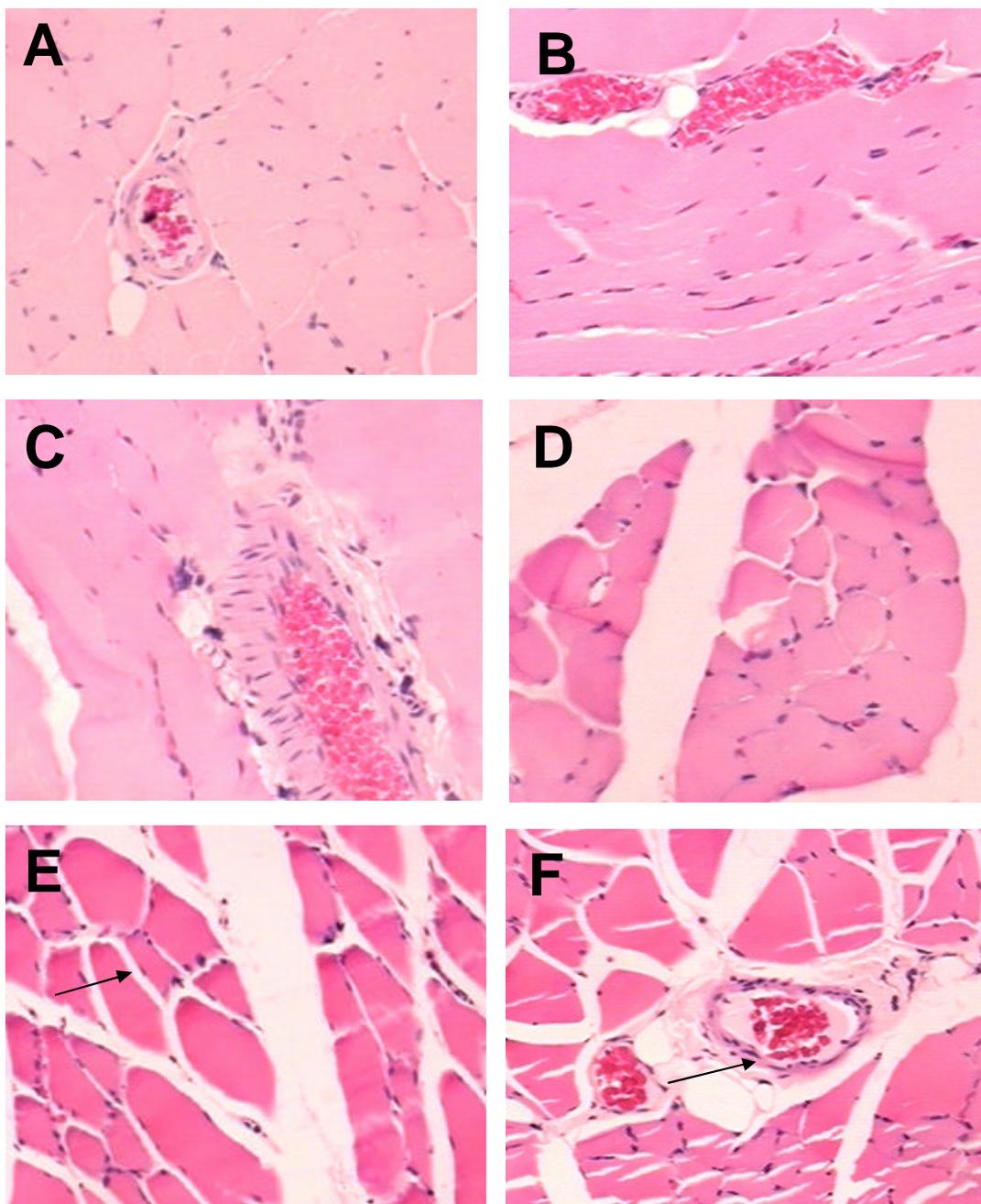


Figura 4: Histologia da musculatura do diafragma

(A) Grupo controle, 100x (B) grupo 1h verifica-se discreta hiperemia do vaso, 100x (C) Grupo 3 h mantém o padrão de discreta hiperemia do vaso, 100x (D) Grupo 12h verifica-se edema entre as fibras musculares, 100x (E e F) Grupo 24h além da presença de edema entre as fibras musculares (→), verificado em ambos os cortes (F) verifica-se a hiperemia do vaso 100x.

4.2 Contagem celular

As médias e desvio padrão da contagem de células totais, mononucleares e polimorfonucleares presentes no tecido pulmonar pode ser verificado na tabela 1.

Tabela 1: Contagem de células do parênquima pulmonar

Tempo	Celularidade total	Células Mononucleares	Células Polimorfonucleares
0	08,33 ± 1,34	06,33 ± 1,29	01,93 ± 0,70
1h	10,00 ± 1,69	07,73 ± 1,10	02,27 ± 1,03
3h	17,60 ± 2,02	08,47 ± 1,55	09,13 ± 2,00
6h	22,26 ± 0,96	08,00 ± 1,69	14,27 ± 1,83
12h	23,80 ± 1,01	07,60 ± 0,91	16,20 ± 0,86
24h	27,00 ± 1,50	10,47 ± 1,36	16,80 ± 1,32

Os dados obtidos demonstram uma evolução temporal do número de células pulmonares mononucleares, sendo que as barras verticais mostram uma flutuação estatística de amplitude igual a dois desvios padrão (Figura 5).

Pode-se observar uma evolução positiva deste número, porém com um comportamento não linear neste crescimento, que pode ser visto pelo aumento do número de células até 3 horas, em seguida um decréscimo para novamente um aumento mais expressivo entre 12 e 24 horas (Figura 5).

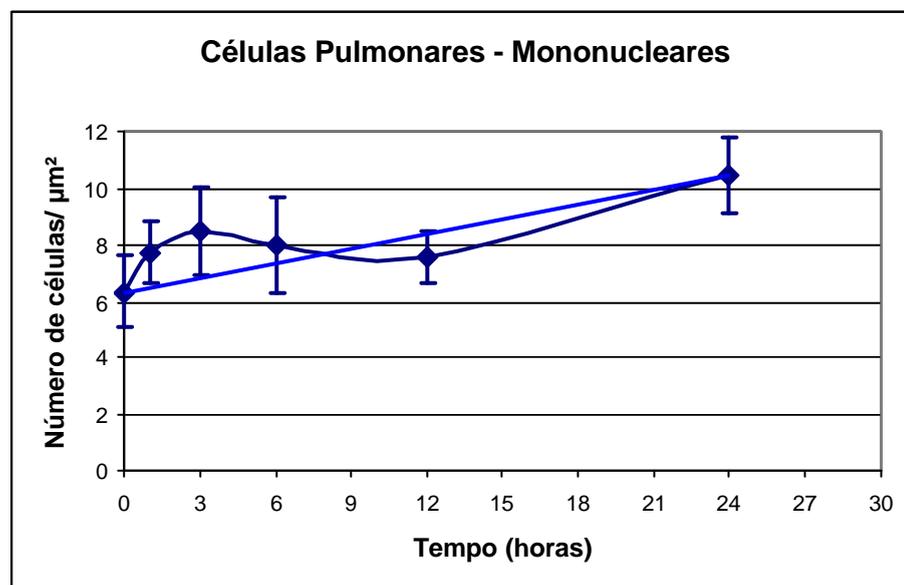


Figura 5: Média das células mononucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.

A linha de tendência linear mostra o aumento significativo do número de células. Para uma análise estatística mais elaborada podemos sugerir a hipótese de que há um crescimento positivo do número de células, ou seja, se é estatisticamente significativo. Os dados coletados e o resultado da Análise de Variância para a regressão sugerem que há um aumento significativo do número de células,

comparado com o controle, ao longo das 24 horas, com o nível de significância para o teste de regressão menor que 5% (Apêndice A, tabela 1).

Pode-se verificar também que um modelo linear explicaria em torno de 67% a variação do número de células, que pode ser visto pelo valor de R-Quadrado. Cabe salientar que um modelo matemático mais significativo para o crescimento do número de células deveria ter amostras maiores e mais sistemáticas, ou seja, com período de tempo regular e intervalos menores entre as amostras.

Já em relação à evolução temporal do número de células pulmonares mononucleares. As barras verticais mostram uma flutuação estatística de amplitude igual a dois desvios padrão. Podemos verificar que o comportamento de crescimento das células polimorfonucleares é diferente da anterior. Há um crescimento acentuado até por volta das 6 horas e posteriormente verifica-se uma estabilização no número de células (Figura 6).

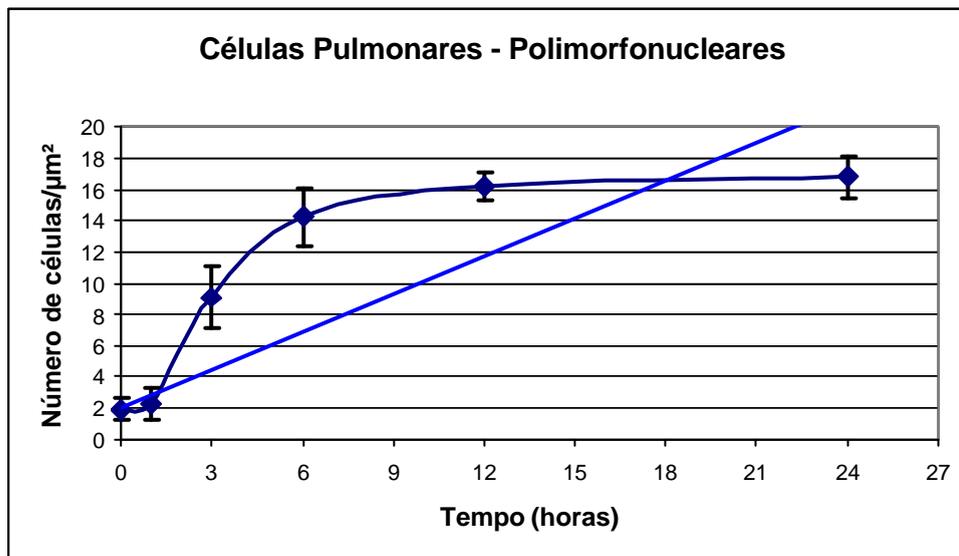


Figura 6: Média das células polimorfonucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.

O modelo linear, embora inadequado para explicar o comportamento complexo do crescimento do número de células mostra a tendência de crescimento e a ANOVA mostra que o nível de significação do teste é de 5,1%, ou seja, bastante significativo, o que justifica estatisticamente que de fato há um crescimento do número de células diante da inoculação de LPS (Apêndice A, Tabela 2).

Pode-se ver que o modelo linear, mesmo inadequado, explica 65% da variação do crescimento do número de células e o mesmo pode-se dizer de um modelo matemático mais elaborado. Isto é, para tal seria imprescindível ter amostras coletadas em tempos regulares.

Quando comparamos o número de células mononucleares com polimorfonucleares, observa-se um comportamento diferente entre os dois tipos celulares (Figura 7).

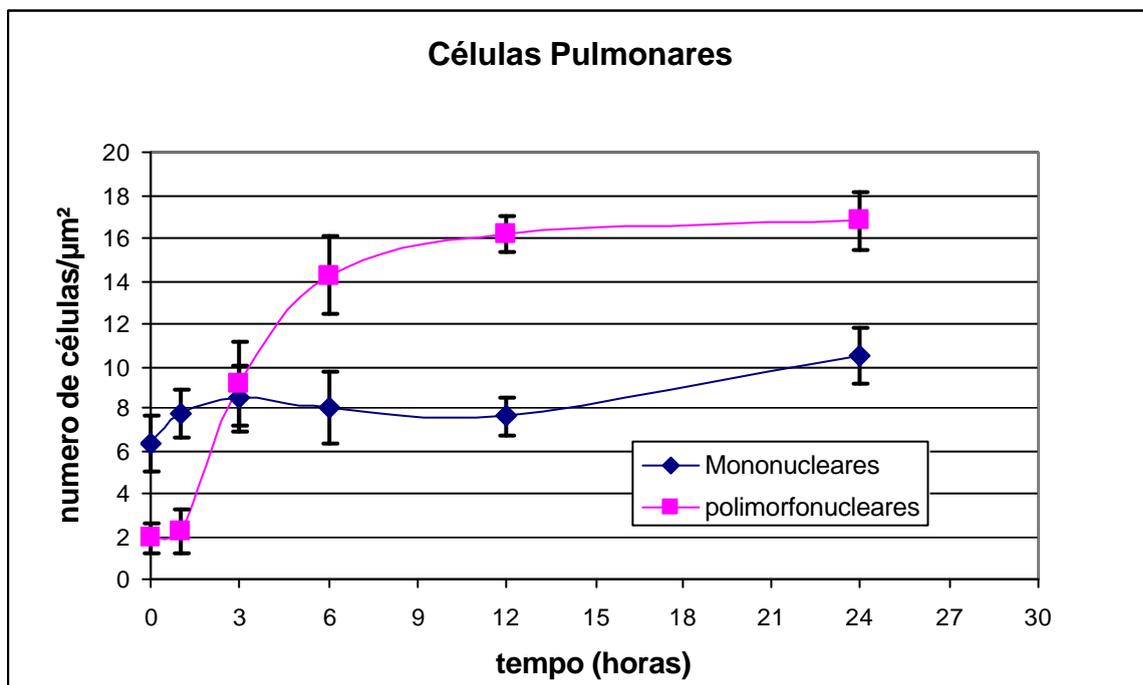


Figura 7: Média das células mononucleares e polimorfonucleares em parênquima pulmonar de ratos Wistar após aplicação do LPS.

Os percentuais entre as células mononucleares e polimorfonucleares expressas na figura 8, são estatisticamente diferentes. Com um nível de significância de 4,85% podemos dizer que o aumento do número de células dos dois tipos é diferente, mostrando um comportamento diferenciado entre estas células (Tabela 3 Apêndice A).

Este é um resultado bastante interessante, pois podemos sugerir que no diagnóstico da inflamação, pode-se utilizar um teste para avaliar o número de

células do tipo polimorfonucleares, pois seu aumento é considerável diante da inflamação.

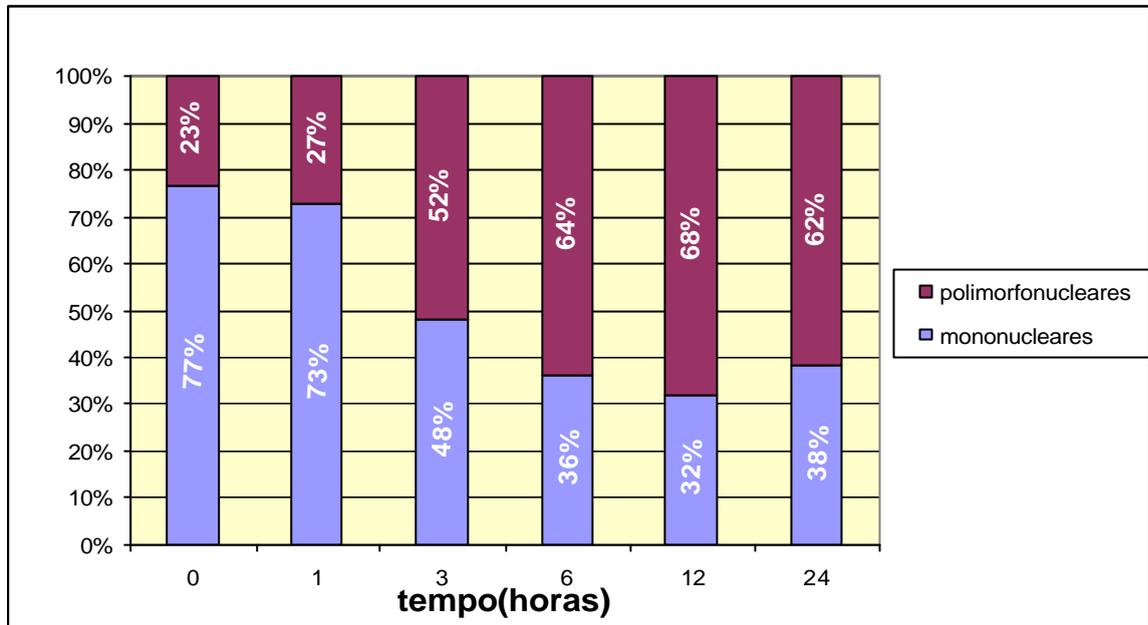


Figura 8: Percentual de total de células do parênquima pulmonar

Quanto à análise das células diafragmáticas, os dados em relação ao número de células inflamatórias no tecido diafragmático e seus respectivos desvios padrão são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Contagem de células do músculo diafragma.

Tempo	Celularidade total	Células Mononucleares	Células Polimorfonucleares
0	0,4 ± 0,91	2,13 ± 0,64	1,40 ± 0,67
1h	2,5 ± 1,57	2,27 ± 0,80	1,67 ± 0,82
3h	2,5 ± 1,35	2,27 ± 0,96	1,87 ± 0,52
6h	5,5 ± 0,92	2,93 ± 0,70	2,07 ± 0,46
12h	2,5 ± 1,30	2,53 ± 0,99	1,53 ± 0,64
24h	5,5 ± 0,75	2,80 ± 0,77	2,20 ± 0,68

Quando analisamos a evolução temporal do número de células pulmonares mononucleares diafragmáticas com seus respectivos desvios padrões podemos avaliar a flutuação estatística representada na figura 9.

Os dados apresentados no gráfico mostram que há um aumento do número de células, porém com 6 horas há um aumento, onde observamos uma alteração da linha de tendência, o modelo linear não explicaria bem o comportamento geral, isso é verificado na tabela 4 do (Apêndice A) com $p = 0,14$.

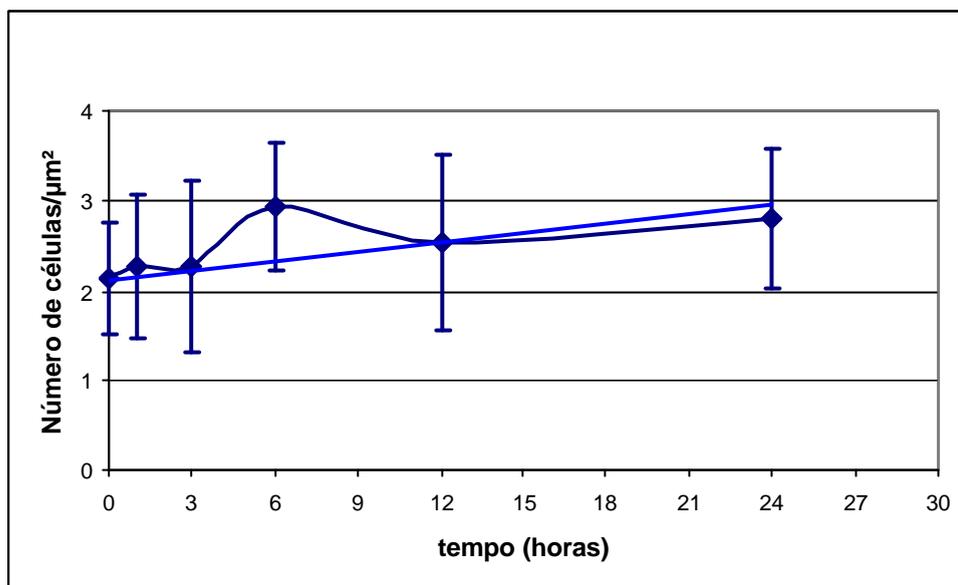


Figura 9: Média das células mononucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS.

Entretanto, quando retira-se o ponto 6 horas obtemos um modelo linear para tais dados como pode ser observado na figura 10.

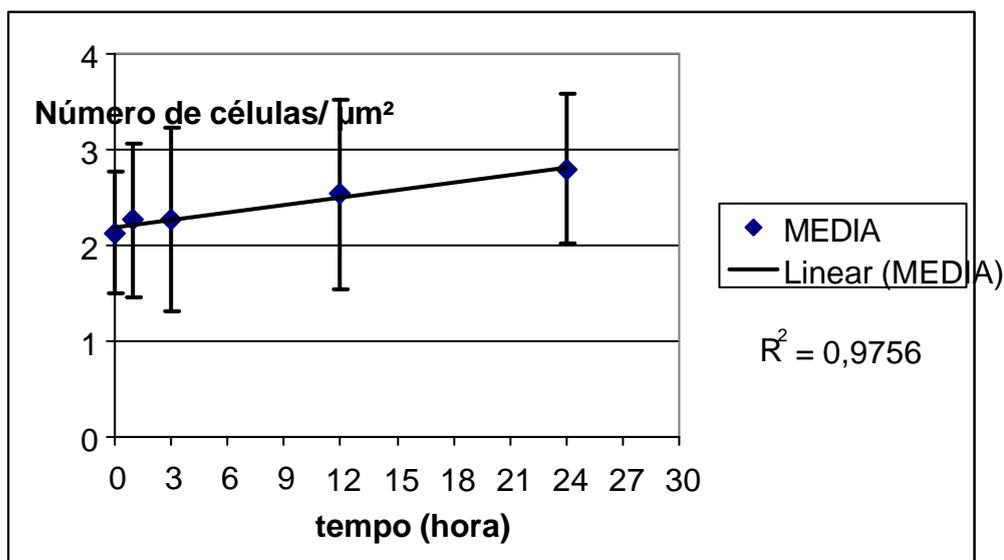


Figura 10: Média das células mononucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS, com exceção do grupo 6 horas.

O gráfico mostra que o modelo linear explica 97% do crescimento do número de células, e a tabela ANOVA mostra um nível de significação com $p= 0,0016$, ou seja, estatisticamente muito significativa, o que nos leva propor que o modelo linear pode explicar o crescimento, excluindo os dados da coleta com 6 horas (Tabela 5, Apêndice A).

Em relação às células polimorfonucleares na representação gráfica, podemos obter as seguintes médias com os desvios padrões na figura 11.

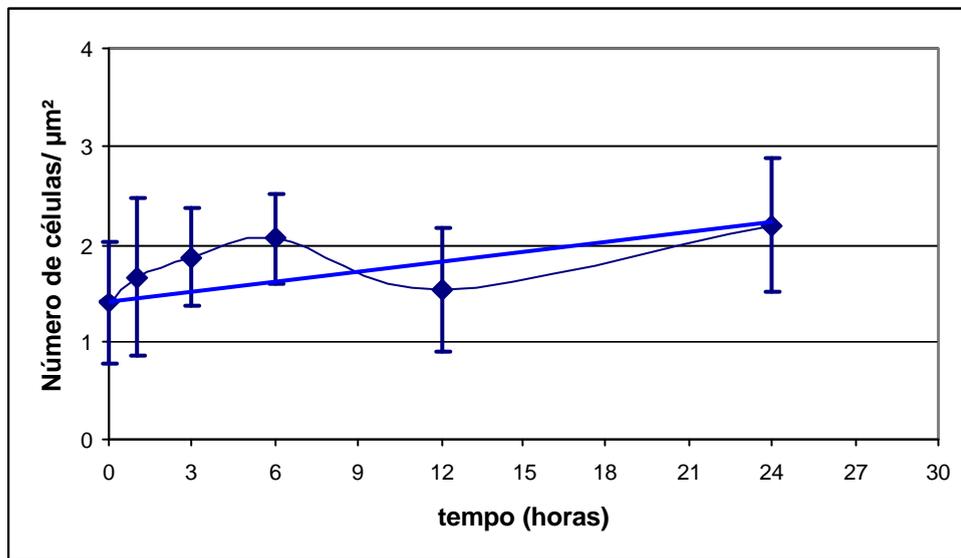


Figura 11: Média das células polimorfonucleares diafragmáticas de ratos Wistar após aplicação do LPS.

Com 12 horas, podemos verificar que há um decréscimo do aumento do número de células polimorfonucleares, com posterior aumento, quando verificamos a linha de tendência observamos que o modelo linear não explica estas taxas de crescimento, o que é comprovado quando utilizamos o teste ANOVA onde obtemos $p= 0,20$ (Tabela 6, Apêndice A).

Quando representamos graficamente o percentual das células mononucleares e polimorfonucleares no tecido muscular do diafragma obtemos a figura 12 e 13.

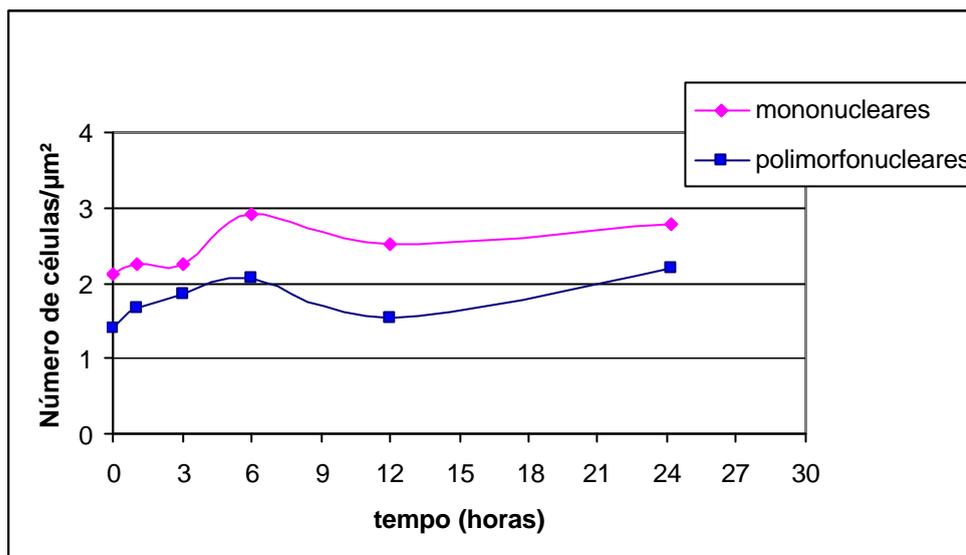


Figura 12: Percentual de total de células inflamatórias diafragmáticas.

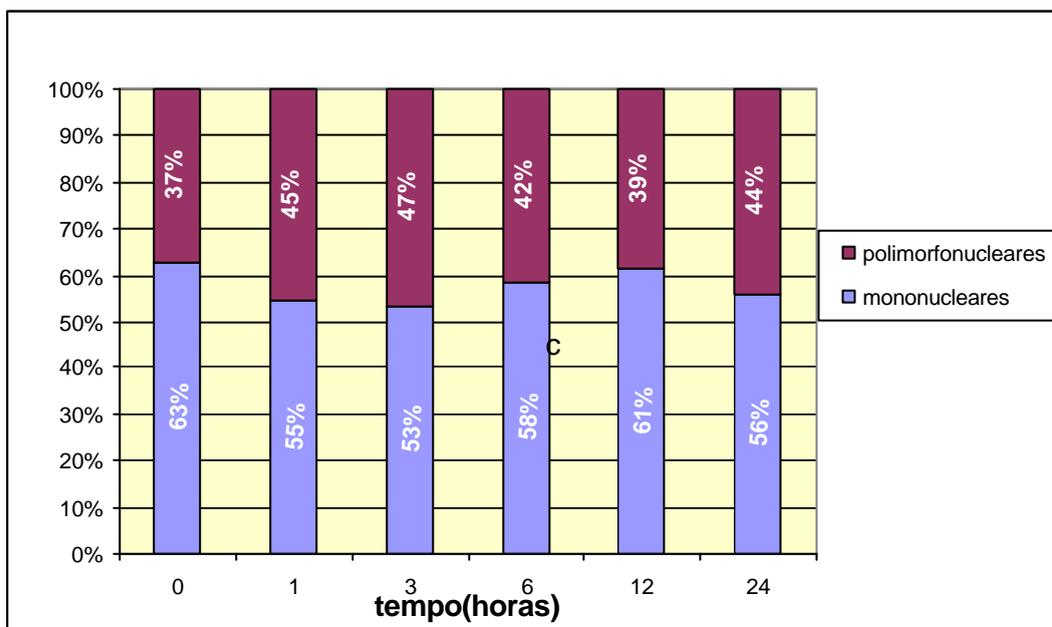


Figura 13: Percentual de total de células inflamatórias diafragmáticas.

Para testamos a hipótese da diferença estatisticamente significativa entre o número de células mononucleares e polimorfonucleares de acordo com o tempo, concluímos que estatisticamente que aumento do número dos dois tipos de células é diferente, pois o valor $p < 0,05$ (Tabela 7, Apêndice A).

4.3 Eletroforese

Pelo método utilizado de extração do DNA, podemos observar que nos tempos estudados e na dose de LPS utilizada, o dano tecidual causado não é

suficiente para induzir fragmentação do DNA. Observa-se um discreto arrasto após seis horas, sugerindo que há necrose no tecido. Os dados, entretanto, não são significativos, para que se possa afirmar o tipo de dano causado ao tecido (Figura 14).

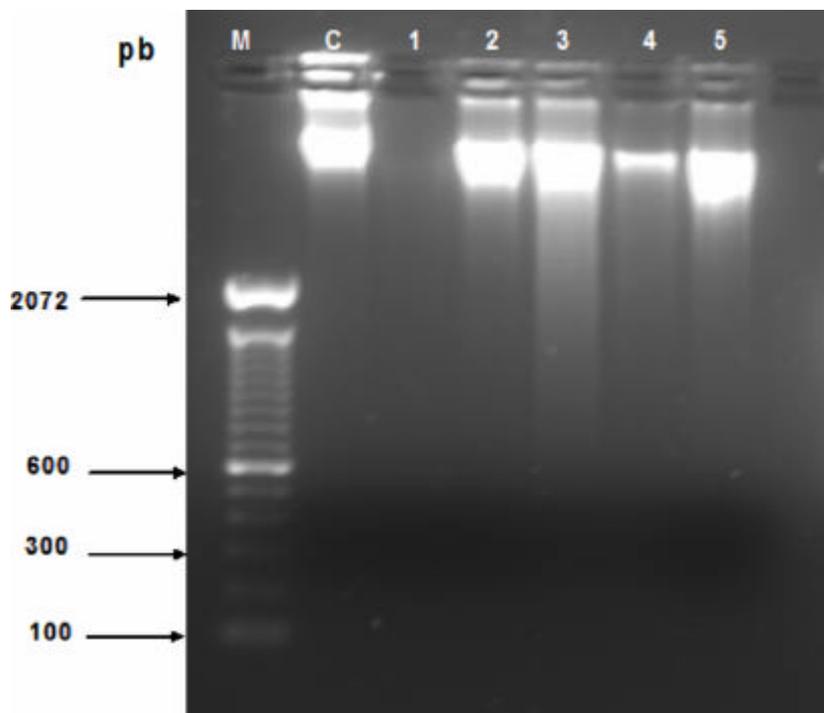


Figura 14: Perfil eletroforético do DNA extraído do tecido pulmonar. (M) Marcador de peso molecular 100 pb. (C) controle, (1) 1 hora, (2) 3 horas, (3) 6 horas, (4) 12 horas e (5) 24 horas.

Um padrão um pouco distinto foi observado para o tecido diafragmático. Em todos os tempos foi observado um padrão de arrasto exceto para a amostra de uma hora pois a quantidade de DNA obtida não pode ser visualizada em gel de agarose (Figura 15).

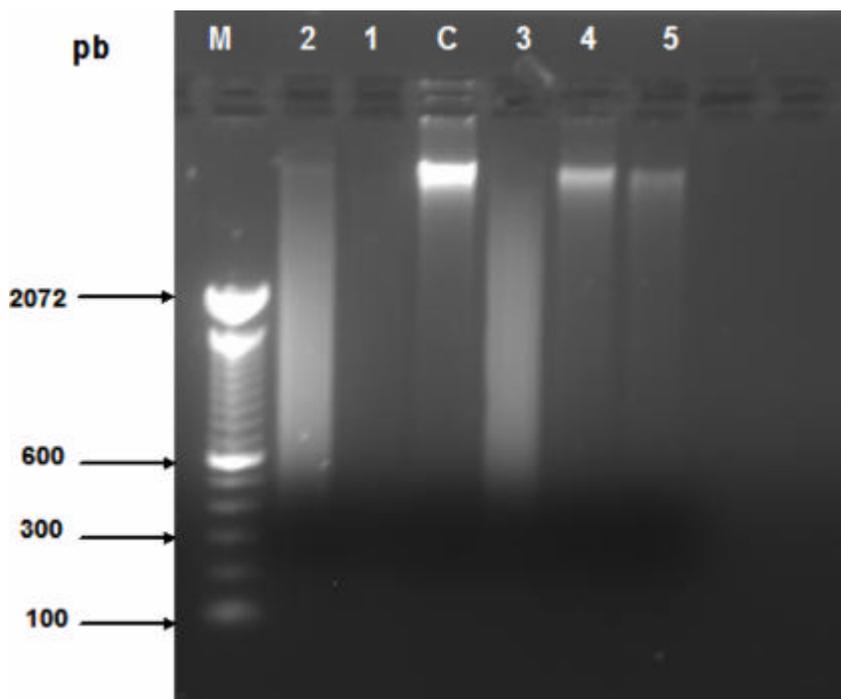


Figura 15: Perfil eletroforético do DNA extraído do do tecido diafragmático. (M) Marcador de peso molecular 100 pb. (C) controle, (1) 1 hora, (2) 3 horas, (3) 6 horas, (4) 12 horas e (5) 24 horas.

5 DISCUSSÃO

Os estudos em animais experimentais possibilitam a compreensão dos mecanismos lesivos e o desenvolvimento de esquemas terapêuticos, o que é imensamente difícil de ser realizado em humanos. O modelo mais aceitável sem dúvida é o que mais se assemelha na filogenética ao humano, porém algumas espécies animais apresentam resistência aos efeitos do LPS, além disso, quando necessitamos de número maior de amostras, os ratos se enquadraram neste perfil, sendo é claro que este modelo é amplamente utilizado por muitos autores (MENEZES, 2002).

Sabe-se que apesar de crescentes avanços da medicina as alterações causadas pelas endotoxinas nas Unidades de Terapia Intensiva ainda são a grande causa de mortalidade e morbidades, até mesmo em centros especializados (OZDÜULGER *et al*, 2002), isso pode ser explicado pelas reações inflamatórias sistêmicas desencadeadas pelas endotoxinas no organismo hospedeiro.

A resposta inflamatória endógena do organismo após exposição às endotoxinas leva a alterações diretas e indiretas sobre as células, causando lesões, alterando suas funções, deflagrando a síntese, liberando ou ativando a cascata de mediadores inflamatórios. Verifica-se que são os polimorfonucleares as células mais numerosas na resposta aguda da sepse, quando o processo inflamatório é intenso verifica-se também um aumento da permeabilidade capilar e edema, levando a oclusão capilar e isquemia (d'ACAMPORA *et al*, 2004)

No pulmão o LPS altera a mecânica pulmonar, alterando a oxigenação alveolar, arterial, e da ventilação do espaço alveolar, coincidindo com o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, sendo esta caracterizada pelo aumento da resistência ao fluxo aéreo e redução da complacência pulmonar. Existem evidências de que na lesão pulmonar existe a participação vigorosa dos neutrófilos desde o início da lesão, uma característica da lesão é o influxo para o espaço aéreo pulmonar, sendo que a sua persistência e elevação é associada ao aumento da mortalidade (BUENO, 1999).

Nos resultados obtidos neste trabalho foi verificado no parênquima pulmonar um aumento das células inflamatórias principalmente dos polimorfonucleares, sua presença foi verificada nos vasos sanguíneos (Figura 1 C), permeando o septo alveolar (Figura 1 D), foi verificado também o espessamento do septo alveolar, além do aumento do número total de células neutrofílicas estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle, sendo a identificação destas células um método de análise importante para a avaliação inflamatória.

Foi verificado também a partir da análise morfométrica do tecido pulmonar um aumento estatisticamente significativo de mononucleares ($p < 0,04$), embora para uma análise melhor fosse interessante que a avaliação ocorresse em um tempo maior, de preferência superior a 24 horas e com menores intervalos de coleta dos dados.

A disfunção muscular envolve também o comprometimento do diafragma, o qual em decorrência dos efeitos inflamatórios do LPS apresenta uma diminuição da contractilidade e perda de massa muscular na fase aguda, já na inflamação crônica é verificado o desgaste muscular e caquexia (KOTLER, 2000).

LIN *et al* (1998) comparou a indução aguda feita pela aplicação intra-arterial de LPS com a subaguda induzida com a ligação/perfuração cecal, os autores concluíram que ambas as técnicas alteram o potencial da membrana das células diafragmáticas, vários modelos foram propostos para explicar este mecanismo e justificar a perda da força muscular, como o desequilíbrio entre a oferta e utilização energética, e a liberação de mediadores inflamatórios, entre outros, porém a natureza precisa deste mecanismo permanece ainda obscura. Assim, embora se saiba da relação entre as afecções pulmonares ou sistêmicas com a alteração da contractilidade diafragmática pouco tem sido estabelecido para explicar qual o fator responsável pelo desencadeamento e perpetuação da disfunção, sabe-se, porém, que além das citocinas, alterações das funções mitocondriais podem agravar a capacidade de contractilidade desta musculatura.

Sendo a sepse um modelo de estudo da resposta inflamatória, verifica-se que a sua indução pode ser realizada de várias formas, desde a inalação ou instilação

intratraqueal de substâncias tóxicas, indução por modelo de ligação/perfuração cecal, disseminação de infecções de outros tecidos ou pela aplicação direta de endotoxinas. Porém a maior agressão ocorre no contato direto do LPS com o tecido diferente do contato intravenoso que desencadeia respostas sistêmicas e processos inflamatórios diferentes, desta forma, alguns destes eventos podem não ser percebidos de forma tão clara em determinados tecidos (BOCZKOWSKI *et al*, 1996).

Além disso, sabemos que as repercussões extra-pulmonares das endotoxinas são freqüentes, sendo a disseminação do LPS por via hematogênica principalmente a *E. coli* ocorrer pela sua translocação através das células do epitélio intestinal, podendo gerar complicações em vários tecidos, mesmo distantes (GARCÍA; BERMEJO, 1998).

Menezes *et al* (2005) pesquisando a ação da lesão pulmonar em animais, verificou mudanças na estrutura morfofisiológica com respostas inflamatórias maiores e também um maior conteúdo de polimorfonucleares nos animais que receberam o LPS na instilação no tecido pulmonar do que por via intraperitoneal, vale ressaltar que as análises foram realizadas 24h após a aplicação.

Nos estudos de Lin *et al* (1998), foi verificado o dano morfológico mais pronunciado do sarcolema do músculo diafragmático quando comparado ao músculo sóleo em animais com sepse induzida, os autores discutem que estes efeitos poderiam ser explicados pela ação local do LPS se este fosse aplicado intraperitoneal, porém a aplicação foi realizada intra-arterial, desta forma, os autores aceitam a hipótese de que isso ocorre pelo aumento do fluxo sanguíneo na atividade mecânica do diafragma comparado ao músculo do membro particularmente em estados de anestesia.

Estudo realizado por Boczkowski *et al*, (1996), comparando a ação do LPS nos músculos do coração, diafragma, abdômen e intercostais, verificou que o diafragmático e cardíaco possuem uma suscetibilidade maior do que os outros músculos avaliados, segundos os autores isso poderia ser explicado pelo aumento do fluxo sanguíneo muito solicitado no sistema cardiorrespiratório, porém isso não foi verificado nos músculos intercostais, tão necessário na respiração quanto o

coração e o diafragma. Outra explicação seria a proximidade destes com o local de aplicação que foi peritonial, porém isso não explica a não agressão dos músculos abdominais sendo que o LPS foi aplicado nesta musculatura. Não obstante, a hipótese utilizada seria que a mecânica respiratória puxa o fluido da cavidade abdominal para a face diafragmática, esta exposição excessiva geraria as diferenças observadas entre o diafragma e os outros músculos.

Diante destes trabalhos é interessante notar que o músculo diafragmático possui uma predisposição a ação do LPS, mesmo que em nossos dados o aumento no número de células não tenha sido estatisticamente significativo, nem resultados claros na eletroforese, pudemos percebermos na análise histológica a presença de edema, entre as fibras musculares, o qual foi observado após 12 horas de injeção de LPS, o que nos faz refletir sobre um possível comprometimento deste tecido.

No presente estudo foi observado que após seis horas da administração do LPS houve um pico no número de células polimorfonucleares e mononucleares em ambos os tecidos, sugerindo que o modelo de aumento linear do número de células não seria o mais adequado. Estudos verificam que após 6 horas a injeção intravenosa do LPS de *E. coli* a musculatura já sofre alteração na força de contração (SAMBE *et al* , 1998). Essa diminuição de força em relação ao grupo controle foi confirmada em diversos estudos sendo intimamente relacionada à ação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral. Trabalhos demonstraram que obteve-se uma melhora na força de contração no grupo submetido à aplicação do LPS associado ao tratamento de laser de baixa potência, onde foi verificando a sua ação anti-inflamatória promovendo a inibição do fator de necrose tumoral (AIMBIRE *et al*, 2006).

Poucas alterações estruturais foram observadas, como a discreta hiperemia do vaso e a presença de edema entre as fibras musculares, dados também observado por Ozdülger *et al* (2002) predominantemente no grupo 24 horas, porém isso não reflete necessariamente o desempenho da musculatura.

Torna-se claro, que tanto o pulmão quanto o diafragma são afetados após a aplicação do LPS, sendo que esta lesão aparece mais intensificada no pulmão,

porém diversos estudos confirmam a lesão do diafragma, mesmo que apenas analisando a função contráctil do diafragma. Deve-se considerar, entretanto, que alterações na função contráctil podem estar refletindo alterações a nível celular.

Vários autores demonstram que a presença dos neutrófilos é clara na lesão pulmonar. Porém as células mononucleares apesar de serem as primeiras células de defesa, liberadas inicialmente após a lesão podem também atuar mais eficientemente na defesa, o que justificaria o aumento no número de células pulmonares em nosso estudo. Dados semelhantes foram observados pela ativação e ação dos macrófagos alveolares na SDRA mesmo em pacientes que apresentavam neutropenia (BUENO, 1999, MORTELLITI; MANNING, 2002, MENEZES, 2002).

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que endotoxinas podem lesar diretamente as células endoteliais, sendo tempo e dose dependentes, essas alterações foram expressas por dilatações nas regiões intercelulares e pregueamento da superfície celular, que evoluiu para a acentuada retração celular, após 2 horas de exposição à maioria das células estavam mais eletrodensas do que as normais, indicando lesão celular (HARLAN, 1983 apud MENEZES, 2002, MEYRICK, 1986, apud MENEZES, 2002).

Fujita *et al.* (1998) em uma pesquisa com metodologia próxima a realizada neste estudo também com o intuito de estudar a histologia e a incidência de apoptose na lesão pulmonar induzida pela aplicação de LPS nos diferentes tempos, verificou que as alterações histológicas com visualização de neutrófilos intersticiais ocorriam após 6 horas, sendo que a migração para o septo alveolar foi observada após 24 horas, sendo o maior acometimento ocorrido em 48 horas.

Já na análise eletroforética do DNA os resultados foram compatíveis com os realizados neste trabalho, não foi observada fragmentação claro do DNA utilizando apenas a técnica de extração, porém utilizando a técnica de marcação das extremidades com digoxigenina-11-dUTP foi possível observar fragmentação do DNA após seis horas. Diferentemente da nossa metodologia os autores utilizaram um espaço de tempo maior e principalmente doses de LPS maiores em animais de

menor porte, sendo a avaliação entre três e 48 horas, com doses de 20mg/kg em camundongos.

Bohlinger *et al* (1996) verificou em seu estudo que a administração do LPS causa o aparecimento de fragmentação do DNA em vários tecidos, como fígado, pulmão, rim e intestinos, sendo o maior índice de lesão após 24 horas, apesar de grandes alterações serem observadas no tecido hepático, o tecido intestinal seguido pelo pulmonar são os que apresentaram maior fragmentação do DNA.

O estudo da resposta inflamatória nos diferentes órgãos é de importância essencial para a compreensão da ação do LPS de forma sistêmica, sendo possível a identificação dos tecidos mais acometidos, como o sistema respiratório, representado neste estudo pelo tecido pulmonar e musculatura diafragmática, desta forma, possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas preventivas e também curativas a fim de minimizar as lesões do LPS e broquear o processo inflamatório, conseqüentemente a sepse e a disfunção de múltiplos órgãos.

Devemos considerar que a apresentação de todos os fenômenos inflamatórios estão intimamente relacionados à capacidade imunológica do hospedeiro em desenvolver uma resposta inflamatória vigorosa, sendo que a deficiência imunológica pode permitir a instalação da infecção, porém a resposta exagerada e descontrolada pode gerar a liberação exacerbada de componentes inflamatórios, desta forma, a resposta imunológica pode ser considerada um fator determinante mais crítico que o processo que iniciou a resposta inflamatória (MENEZES, 2002).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que após a administração do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano os animais apresentaram comprometimento pulmonar e diafragmático.

O quadro histológico pulmonar apresentou-se com poucas alterações, porém com aumento significativo de células mononucleares e polimorfonucleares, hiperemia dos vasos, espessamento dos septos alveolares e polimorfonucleares de permeio.

No quadro histológico do tecido diafragmático observamos discreta hiperemia dos vasos sanguíneos, edema entre as fibras musculares e aumento significativo de células mononucleares, se avaliarmos com a exceção do grupo 6 horas.

Não foi possível observar sinais claros de fragmentação do DNA das células pulmonares e diafragmáticas pela técnica utilizada. Existe uma sugestão de necrose mais evidente no músculo diafragmático, desta forma não existe uma correlação clara entre o comprometimento histopatológico dos tecidos estudados e o padrão verificado na eletroforese.

Pode-se demonstrar neste estudo que as alterações histopatológicas em até 24 horas não são tão pronunciadas, porém houve um aumento crescente do número de células mononucleares e polimorfonucleares em comparação com o grupo controle.

Porém acreditamos que são necessários novos estudos em tempos maiores de exposição ao LPS para determinar se a endotoxina é capaz de induzir lesões mais pronunciadas, que possam comprometer a função dos tecidos estudados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p.580.

AKAMINE *et al.* Choque Séptico e Mecanismo de Agressão tecidual IN: KNOBEL, **Condutas do Paciente Grave**. 2ªed. São Paulo: Atheneu, 1998, p. 18-43.

AIMBIERE, F. *et al.* Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-a levels in rat diaphragm muscle. **Lasers Med Sci.**, v. 21, p. 238-244, 2006.

ANDERSON, J.L.; WILLIAMS, M.B; HEAD, S.I. The role of nitric oxide in diaphragmatic dysfunction in endotoxemic rats. **Muscle Nerve**, v.24, p.30-36, 2001.

BARREIRO, E. *et al.* Protein Carbonyl Formation in the Diaphragm **Am J Resp Cell Mol Biol**, v.32, p.9-17, 2005.

BOCZKOWSKI, J. *et al.* Induction of Diaphragmatic Nitric Oxide Synthase after Endotoxin Administration in Rats **J. Clin Invest** v. 98, n.1, p.1550-1559, 1996.

BOCZKOWSKI J. *et al* Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia **Faseb J.**, v. 13, p. 1637-1646, 1999.

BOHLINGER, I. *et al.* DNA Fragmentation in Mouse Organs during Endotoxic Shock. **Am J Pathology**, v. 148,n. 4, p. 1381-1393, 1998

BUENO, P. C. S. **A lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica é um processo inflamatório?** 1999. 70f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

CARVALHO,C.R.R. ; BARBAS, C. S. V. ; AMATO, M.B.P. Ventilação Mecânica na Lesão Pulmonar Aguda/ Síndrome da Angústia Respiratória Aguda In: CARVALHO, C.R. R. **Ventilação Mecânica**. São Paulo: Atheneu, 2000, p.123-151.

COINTOIN A. S. *et al* Lipopolysaccharide-induced Diaphragmatic Contractile Dysfunction and Sarcolemmal Injury in Mice Lacking the Neuronal Nitric Oxide Synthase. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 163, p. 977-982, 2001.

CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.smaconsultores.com.br/sepse1>>. Acesso em: 17 de abril de 2007.

d'ACAMPORA *et al.* Efeitos da castração pós-natal sobre o tecido pulmonar após sepsis experimental de origem abdominal em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n. 2, p.115 119, 2004.

DAVID, C.M.N *et al*, Complicações da Ventilação Mecânica, In: **Relatório do**

Segundo Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica, 2000. Disponível em: <<http://www.somiti.org.br/w3/listaNoticiaCompleta.do.def?codigo=212>> Acesso em: 22/01/07.

DUARTE, P.A.D. **Corticosteróides inibe a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica em ratos**. 2000. 93f. Tese (Doutorado em Medicina) Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

FLISS, H.; GATINGER, D. Apoptosis in Ischemic and Reperfused Rat Myocardium **Circulation Research**, v.79, p.949-956, 1996.

FRANZOLIN, M. R.; CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Escherichia coli que causa infecções extra-intestinais In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005, p.303-309.

FUJITA, M., *et al.* Endothelial Cell Apoptosis in Lipopolisaccharide-Induced Lung Injury in Mice. **Inter Arch Immunol**, v.117, p.202-208, 1998.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, P.1008.

GARCIA J.M.A, BERMEJO, C.L. **Infecciones por enterobacterias**. *Medicine* v.7, n.78, p.: 3622-3628, 1998.

GATH, I. *et al.* Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. **FABS J.**, v.10, p.314-323, 1996.

GOLDMAN, L; BENNETT, J. C.; Edit. **Cecil: Tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p.1266.

GREEN, D.R., REDD, J.C. Mitochondria and Apoptosis, **Science**, v. 281, p.1309-1312, 1998.

GUO Y. *et al.* Production of Endothelins by the Ventilatory Muscle in Septic Shock. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.19, p.470-476, 1998.

HOCKE A.C. *et al* Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL-10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans **Cytokine**, v.33, p.199-211, 2006.

HOFFMANN, H. J Basic mechanisms of lung inflammation: executive summary of the first Lung Science Meeting of the European respiratory Society at Taormina, Italy in 2003. **Eur Respir J.**, v.22, n.44, p.1-3, 2003.

IMANAKA, H. *et al*, Ventilator-Induced Lung Injury is Associated with Neutrophil Infiltration, Macrophage Activation, and TGF- β 1 mRNA Upregulation in Rat Lung, **Anesth Analg.**, v.92, p. 428-436, 2001.

KOTHER, D.P. Cachexia **Ann Intern Med**, v.133,n.8, p.622, 2000.

KUMAR, V; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 7ªed; Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.1592.

LANG, C. H. *et al* Effect of High-Dose Endotoxin on Glucose Production and Utilization **Metabolism**, v.42, n.10, p.1351-1358, 1993.

LIN, M. C. *et al* . Diaphragm sarcolemmal injury is induced by sepsis and alleviated by nitric oxide synthase inhibition. **Am J Respir Crit Care Med**, v.158, p.1656-1663, 1998.

LIU S.H. *et al* Involvement of Nitric oxide in the in vivo effects of lipopolysaccharide on the contractile and electrical properties of mouse diaphragm **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.356, p.500-504, 1997.

LIU S.H. *et al*. Nitric oxide is not involved in the endotoxemia-induced alterações in Ca²⁺ and ryanodine responses in mouse diaphragms **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.366, p.327-334, 2002.

MENEZES, S. L. S. **Síndrome do desconforto respiratório agudo de etiologia pulmonar e extrapulmonar: diferentes síndromes?** 2002. 163f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

MENEZES, S.L.S. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **J Appl Physiol.**, v.98, p.1777-1783, 2005.

MORTELLITI, M.P.; MANNING H.L. Acute Respiratory Distress Syndrome American **Family Physician.**, v.65, n.9, p.1823-1830, 2002.

NIEDERMAN, M. *et al*. Guidelines the management of Adult with Community-acquired Pneumonia Diagnosi, Assessment of severity, Antimicrobial therapy, and Prevention **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, p.1730-54, 2001.

ORELLANA R. A. Endotoxemia reduces skeletal muscle protein synthesis in neonates. **Am J Phphysiol Endocrinol Metab.**, 283:E909-E916, 2002.

ORELLANA, R. A. *et al*. Modulation of protein synthesis by insulin is maintained during neonatal endotoxemia. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.291, p.E159-E166, 2006.

OZDÜÜLGER A. *et al* Ply(ADP-ribose) synthetase inhibition prevents lipopolisaccaride-induced peroxynitrite mediated damage in diaphragm. **Pharmacological Research**, v 46, 1, p.67-73, 2002.

PARSLOW T. G. *et al*. **Imunologia Médica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.702.

SAMBE, A., *et al.* Role of Nitric Oxide on Diaphragmatic Contractile Failure in *Escherichia coli* Endotoxemic Rats **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v.119, n.1, p.167-175, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor, vol, 3. p.198.1989,

SUPINSKI, I G.S. CALLAHAN, L.A. Caspase activation contributes to endotoxin-induced diaphragm weakness. **J Appl Physiol.**, v.100, p.1770-1777, 2006a.

SUPINSKI, I G.S. CALLAHAN, L.A. Hemin prevents cardiac and diaphragm mitochondrial dysfunction in sepsis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.40, p.127-137, 2006b.

TAILLÉ, C. *et al.* Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.163, p.753-761, 2001.

TEER, A. I. Inflamação N: PARSLOW *et al*, **Imunologia Médica**. 10^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.165-175.

UDOBI, K. F. *et al.* Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am Family Physical** v.67, n. 2, p.315-322, 2003.

UCHÔA, L.C.J., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10ed, Guanabara Koogan, 2004, p.540.

WHITE, M.K. *et al*, Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **J. Immunol**, v.150, p.5124-534, 1993.

APÊNDICE A – Testes ANOVA

Tabela 1 - ANOVA estatística de regressão – Células mononucleares de parênquima pulmonar

RESUMO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,823673			
R-Quadrado		0,678438			
R-quadrado ajustado		0,598047			
Erro padrão		0,862382			
Observações		6			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,276301	6,276301075	8,439263	0,04389561
Resíduo	4	2,97481	0,743702509		
Total	5	9,251111			

Tabela 2 - ANOVA estatística de regressão – Células polimorfonucleares de parênquima pulmonar

RESUMO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,807926			
R-Quadrado		0,652744			
R-quadrado ajustado		0,56593			
Erro padrão		4,453396			
Observações		6			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	149,1202	149,120172	7,518891	0,051795618
Resíduo	4	79,33094	19,83273477		
Total	5	228,4511			

Tabela 3 – Comparação entre mononucleares e polimorfonucleares de parênquima pulmonar

Anova: fator único						
RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
tempo (horas)	6	46	7,666667	82,66666667		
mononucleares	6	3,038578605	0,50643	0,037735802		
polimorfonucleares	6	2,961421395	0,49357	0,037735802		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	205,4449	2	102,7225	3,724431315	0,04861	3,682317
Dentro dos grupos	413,7107	15	27,58071			
Total	619,1556	17				

Tabela 4 - ANOVA estatística de regressão – Células mononucleares diafragmáticas

RESUMO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,665994285			
R-Quadrado		0,443548387			
R-quadrado ajustado		0,304435484			
Erro padrão		0,269341424			
Observações		6			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,231302	0,231302	3,188406	0,148708918
Resíduo	4	0,290179	0,072545		
Total	5	0,521481			

Tabela 6 - ANOVA estatística de regressão – Células mononucleares diafragmáticas sem o grupo 6 horas.

RESUMO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,987729597			
R-Quadrado		0,975609756			
R-quadrado ajustado		0,967479675			
Erro padrão		0,048089047			
Observações		5			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,277507	0,277507	120	0,001628625
Resíduo	3	0,006938	0,002313		
Total	4	0,284444			

Tabela 6 - ANOVA estatística de regressão – Células polimorfonucleares diafragmáticas

RESUMO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,606645			
R-Quadrado		0,368019			
R-quadrado ajustado		0,210023			
Erro padrão		0,276447			
Observações		6			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,178012	0,178012	2,3293	0,20166036
Resíduo	4	0,305692	0,076423		
Total	5	0,483704			

Tabela 7 – Comparação entre as células mononucleares e polimorfonucleares do músculo diafragma

Anova: fator único						
RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
	6	46	7,666666667	82,66666667		
mononucleares	6	3,464444444	0,577407407	0,0014107		
polimorfonucleares	6	2,535555556	0,422592593	0,0014107		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	205,5163473	2	102,7581737	3,729	0,048462	3,682317
Dentro dos grupos	413,3474403	15	27,55649602			
Total	618,8637877	17				

ANEXO A – CEP

FVE Fundação
Valeparaibana de
Ensino

Univap
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

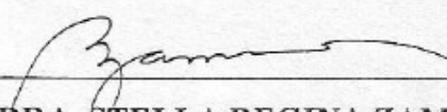
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO (2ª via)

Certificamos que o Protocolo n.º A032/CEP/2006, sobre *“Efeitos induzidos pela ventilação mecânica com óxido nítrico nas células pulmonares e diafragmáticas em animais experimentais”* sob a responsabilidade da Dra. Josane Mittmann, foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2007



PROF. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa