



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

NATALICE MARGARETH TEIXEIRA VARELA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
SURFACTANTE TIPO-B NO PULMÃO DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À
SEPSE**

Recife

2019

NATALICE MARGARETH TEIXEIRA VARELA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
SURFACTANTE TIPO-B NO PULMÃO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^o. Dr.: Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientador Prof^o. Dr. André Martins Galvão

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

V293a Varela, Natalice Margareth Teixeira.
Avaliação histopatológica e da expressão da proteína surfactante tipo-B no pulmão de ratos wistar submetidos à sepse / Natalice Margareth Teixeira Varela. – 2019.
47 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Sepsis. 2. Antibióticos. 3. Antioxidantes. 4. Surfactante pulmonar B. 5. SP-B. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (Orientadora). II. Título.

616 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-122)

NATALICE MARGARETH TEIXEIRA VARELA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
SURFACTANTE TIPO-B NO PULMÃO DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À
SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 29/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Manuela Figueiroa Lyra De Freitas (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Dayane Aparecida Gomes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. André Martins Galvão (Examinador Externo)
Faculdade Maurício de Nassau

RESUMO

O surfactante pulmonar é uma substância lipoproteica, produzida por pneumócito tipo II, cuja função é reduzir a tensão superficial nos pulmões e facilitar a ventilação. Durante a sepse, o pulmão é um órgão-alvo de muitas Espécies Reativas (ER), as quais interferem no balanço oxiredox, expressão gênica, síntese proteica e divisão celular. O presente estudo se propôs a investigar a influência da coadministração da ceftriaxona (30mg/kg, i.p) e antioxidantes ácido ascórbico (50 mg/kg), N-acetil cisteína (10mg/kg) e alfa tocoferol (20 mg/kg), na lesão pulmonar e na expressão da proteína surfactante pulmonar tipo-B (SP-B), em modelo experimental de sepse. Para isso, Ratos *Wistar* machos (300-350g) foram aleatoriamente divididos em cinco grupos (n=10 animais/grupo) e tratados durante cinco dias consecutivos, de acordo com os respectivos grupos: i) placebo não tratado (SHAM); ii) placebo tratado com ceftriaxona (SHAM+ATB); iii) séptico (CLP) não tratado; iv) séptico tratado com ceftriaxona (CLP+ATB) e v) séptico tratado com ceftriaxona + antioxidantes simultaneamente (CLP+ATB+AO). Na histologia, o pulmão revelou parênquima morfológicamente normal no grupo SHAM; enquanto no grupo CLP verificou-se septos interalveolares muito espessados (presença de edema), infiltrado inflamatório polimorfonuclear. No grupo CLP+ATB, verificou-se septos interalveolares poucos espessados (pouco edema), leve infiltrado leucocitário, sem alterações morfológicas alveolares. Já no grupo CLP+ATB+AO, verificou-se septos interalveolares morfológicamente normais, sem alterações morfológicas alveolares e sem infiltrado inflamatório. A análise imuno-histoquímica revelou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão da proteína SP-B no grupo CLP ($13,25 \pm 3,40$ marcações/campo); enquanto que os grupos CLP+ATB ($56,75 \pm 20,25$ marcações/campo) e CLP+ATB+AO ($56,75 \pm 20,25$ marcações/campo) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão da SP-B em relação ao grupo CLP. No que se refere à expressão da SP-B no LBA, através da técnica de *Western blotting*, apenas identificou-se possíveis oligômeros dessa proteína. Portanto, é possível afirmar que os grupos CLP+ATB e CLP+ATB+AO mostraram aumento na expressão da SP-B no parênquima pulmonar e nas doses utilizadas, a coadministração de ATB+AO foi melhor do que administração isolada de ATB para mitigar a lesão pulmonar induzida pela sepse em ratos *Wistar*.

PALAVRAS - CHAVE: Sepse. Antibiótico. Antioxidantes. Surfactante pulmonar B. SP-

ABSTRACT

Pulmonary surfactant, whose function is to reduce lung's surface tension and to facilitate ventilation is produced by type II pneumocyte. During sepsis, the lung is a target organ of many Reactive Species (RS) which interfere with oxiredox balance, gene expression, protein synthesis and cell division. This study aimed to investigate the influence of co-administration of ceftriaxone (30mg / kg, ip) and antioxidants N-Acetyl Cysteine (10mg/kg), ascorbic acid (50 mg/kg), and alpha-tocopherol (20 mg/kg), in lung's injury and pulmonary surfactant protein B (SP-B) expression, on a experimental model of sepsis. Male rats *Wistar* (300-350g) were randomly divided into five groups (n = 10 animals / group) and treated during five consecutive days, according to their respective groups: i) untreated placebo (SHAM); ii) ceftriaxone treated placebo (SHAM + ATB); (iii) untreated septic (CLP); iv) septic treated with ceftriaxone (CLP + ATB) and v) septic treated with ceftriaxone + antioxidants simultaneously (CLP + ATB + AO). On histology, lungs revealed morphologically normal parenchyma in the SHAM group; while in the CLP group there were very thickened interalveolar septa (presence of edema), polymorphonuclear inflammatory infiltrate. In the CLP + ATB group, there was a few thickened interalveolar septa (little edema), mild leukocyte infiltrate, without alveolar morphological alterations. Already in the histological analysis of the lung tissue of the CLP + ATB + AO group, there were morphologically normal interalveolar septa, without alveolar morphological alterations and without inflammatory infiltrate. Immunohistochemical analysis revealed a significant ($p < 0.05$) decrease of SP-B expression in CLP group (13.25 ± 3.40 markings / field); while the CLP + ATB (56.75 ± 20.25 markings / field) and CLP + ATB + AO (56.75 ± 20.25 markings / field) groups showed a significant increase ($p < 0.05$) of SP-B expression when compared with CLP group. Regarding the expression of SP-B in BAL, through the Western blotting technique, only possible oligomers of this protein were identified. It is possible to state that the CLP + ATB and CLP + ATB + AO groups showed increased expression of SP-B in the pulmonary parenchyma and in the doses used, co-administration of ATB + AO was better than administration of only ATB to mitigate sepsis-induced lung injury in *Wistar* rats.

KEY WORDS: Sepsis. Antibiotic. Antioxidants. Pulmonary surfactant B. SP-B

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
SP-A	Surfactante pulmonar do tipo A
SP-B	Surfactante pulmonar do tipo B
SP-C	Surfactante pulmonar do tipo C
SP-D	Surfactante pulmonar do tipo D
NAC	N-Acetil Cisteína
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
PC	fosfatidilcolina insaturada
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
SRIS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
LPS	Lipopolissacarídeos
TLRs	Toll like receptors
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
IL	Interleucinas
TNF- α	Fator de necrose tumoral
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio

SOD	Superóxidos dismutases
GSH	Glutathione peroxidase
CAT	Catalase
MDA	Malondialdeído
PLPs	Proteínas de ligação à penicilina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	SURFACTANTE PULMONAR.....	11
2.1.1	Metabolismo Surfactante pulmonar B (SP-B).....	12
2.1.2	Estrutura e Função da SP-B.....	13
2.2	SEPSE	14
2.3	LESÃO PULMONAR NA SEPSE	15
2.3.1	Mecanismos de lesão - Inflamação	16
2.3.2	Estresse oxidativo	17
2.4	TRATAMENTO DA SEPSE.....	18
2.4.1	Antibioticoterapia.....	19
2.4.2	Suplementação de Antioxidantes	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	LOCAL DE ESTUDO.....	23
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	23
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	23
4.3.1	Indução de sepse por ligação e punção cecal (CLP).....	23
4.3.2	Tratamento dos animais	25
4.3.3	Coleta do lavado bronco alveolar (LBA) e do tecido pulmonar	25
4.3.4	Determinação da proteína SP-B no LBA através da técnica de <i>Western blotting</i>	25
4.3.5	Análise histopatológica do tecido pulmonar	26
4.3.6	Imuno-histoquímica do pulmão	26
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	EFEITO DOS TRATAMENTOS COM CEFITRIAXONA ADMINISTRADA ISOLADAMENTE OU SIMULTANEAMENTE COM ANTIOXIDANTE SOBRE TECIDO PULMONAR DE RATOS <i>WISTAR</i> SÉPTICOS.....	28
5.2	EXPRESSÃO DA SP-B NO PULMÃO DOS RATOS <i>WISTAR</i>	29

5.3	DETERMINAÇÃO DA SP-B NO LBA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>WESTERN</i> <i>BLOTTING</i>	31
6	DISCUSSÃO.....	32
7	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	47

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o III Consenso Internacional de Sepse e Choque Séptico, a Sepse compreende a presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo à infecção (JAMA.2016)(MERVIN.S et al 2016).

Estresse oxidativo desempenha um importante papel na patogenia da sepse (CRIMI, E. et al., 2006; VON DESSAUER, B. et al.2010). Causa lesão devido à superprodução de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) e depleção de antioxidantes. (CRIMI, E. et al., 2006; CHUANG, C.C. et al.,2006).

Neutrófilos, responsáveis pela defesa inata, desempenham importante função na sepse, contribuindo com a produção de EROs e ERNs (CHEPKOVA, M. et al., 2006). O efeito pró inflamatório dessas espécies inclui, dano alveolar, edema intra-alveolar, infiltração de células inflamatórias, liberação de quimiocinas e citocinas, disfunção da mitocôndria e dano do DNA (ANDRADES, M. et al., 2005).

No pulmão esses efeitos pró inflamatórios estão associados com a disfunção do surfactante, que possui propriedade tensoativa, que reduz a força necessária para a inspiração, facilitando a ventilação. Além disso, sem o surfactante os alvéolos tenderiam a entrar em colapso durante a expiração (HALLIDAY, H.L., 2008). É composto por cerca de 90% de lipídio essenciais para a redução da tensão superficial da interface ar-líquido do pulmão, e cerca de 10% de proteínas com propriedades imunes e tensoativas. Das proteínas do surfactante, SP-B é a única cuja ausência é associada à falha letal da respiração, e sem ela, o surfactante não consegue desempenhar de forma eficiente a função tensoativa.

Atualmente antibioticoterapia é a base do tratamento da sepse, no entanto já se tem relatos na literatura de indução de produção de espécies reativas por vários antibióticos, por isso, pretende-se com este estudo, investigar a influência da coadministração da ceftriaxona (antibiótico) e antioxidantes N-Acetil Cisteína (NAC), ácido ascórbico e alfa-tocoferol sobre a lesão pulmonar e na expressão da SP-B em modelo experimental de sepse.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SURFACTANTE PULMONAR

O surfactante pulmonar é uma mistura de lipídios e proteínas, produzida pelos pneumócitos II, que além de reduzir a tensão superficial, representa a primeira barreira que os patógenos encontram numa das maiores superfícies expostas do corpo humano, que é o pulmão. (YAMANAKA, N.; KOBAYASHI, K. et al 1991; CROUCH E.C. .1998). Cerca de 90% da massa do surfactante é composta por lipídios, principalmente fosfolipídios incluindo fosfatidilcolina saturada (40-50% da mistura) como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que é o principal componente responsável por reduzir a tensão superficial para próximo de zero, fosfatidilcolina insaturada (PC), fosfolipídios aniônicos como fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilinositol (PI), e uma importante fração de lipídios neutros, principalmente colesterol, que pode representar até 5-10% da quantidade total de lipídios (VELDHUIZEN, R.; NAG, K.; POSSMAYER, F. 1998).

A coexistência de fosfolipídios saturados e insaturados, responde à necessidade simultânea da membrana de manter alta estabilidade, sob alta compressão, particularmente suportada pelos fosfolipídios saturados, como DPPC, e manter a fluidez e dinâmica suficiente, que é facilitada pelos fosfolipídios insaturados, para permitir a transformação estrutural, associada com a transferência de moléculas ativas da superfície, das células para a interface ar-líquido (LOPEZ-RODRIGUEZ, E. ; PÉREZ-GIL, J. 2014).

A composição quantitativa e qualitativa dos lipídios do surfactante, varia entre as espécies, e de acordo com as condições do ambiente, como a temperatura corporal (LOPEZ, E.; GASCOIN, G. et al., 2013). A alteração também acontece de acordo com as restrições fisiológicas, como taxa de respiração ou hibernação (WILLSON, D.F.; NOTTER, R.H. 2011), ou devido a situações patológicas, particularmente, lesão pulmonar (REUTER, S.; MOSER, C.; BAACK, M. 2015; KOPINCOVA, J.; CALKOVSKA, A. 2016). A composição de proteínas é também crítica para a função normal do surfactante.

Os restantes 8-10% do surfactante são constituídos por proteínas específicas (GOERKE, J. 1998). A primeira proteína especificamente associada com fosfolipídios do surfactante, foi identificada por King et al. (1973), e subsequentemente denominada SP-A (POSSMAYER, F. 1988). A identificação dos pequenos peptídeos hidrofóbicos SP-B e SP-C, aconteceu depois da SP-A, devido à sua dificuldade de coloração com azul de Coomassie e à ávida associação destes

com lipídios, dificultando a resolução deles no gel SDS-PAGE (PHIZACKERLEY, P.J.; TOWN, M.H.; NEWMAN, G.E, 1979).

As proteínas surfactante podem ser classificadas como sendo: proteínas hidrofílicas (SP-A e SP-D) e hidrofóbicas (SP-B e SP-C). Pertencentes à família das proteínas coletinas, SP-A e SP-D, estão diretamente relacionadas com a resposta imune inata na barreira alveolar, e com o reconhecimento, ligação e eliminação de patógenos (MAHONEY, A.D.; JAIN, L. 2013; AUTILIO, C. et al., 2017). Já as proteínas hidrofóbicas SP-B e SP-C, pertencentes à família das proteínas semelhantes a saponina, se encontram profundamente incorporadas nos fosfolipídios do surfactante, são essenciais para a atividade biofísica do surfactante, para a eficiente adsorção das moléculas ativas da superfície, e estabilidade mecânica do filme interfacial. Além disso, participam do processo de espalhamento de surfactante ao longo dos ciclos contínuos de respiração de compressão-expansão (HALLIDAY, H.L. 2008; SWEET, D.G. et al., 2013).

Modelos animais mostram que déficit de proteínas surfactantes leva a patologias respiratórias, demonstrando uma direta relação entre proteína surfactante pulmonar e função pulmonar normal. A princípio, déficit de SP-A e D, não é crítico, apesar dos animais com déficit de SP-A desenvolverem infecções pulmonares com maior frequência (FUJIWARA, T. et al., 1980). Déficit de SP-D pode estar relacionado com enfisema (TAKAHASHI, A.; FUJIWARA, T. 1986) e doença pulmonar obstrutiva crônica (OLMEDA, B.; MARTINEZ-CALLE, M.; PEREZ-GIL, J. 2017). Já déficit de SP-C está associado com patologias respiratórias crônicas (PARRA, E.; PEREZ-GIL, J. 2015), e deficiência completa de SP-B é incompatível com a vida, resultando em morte pouco depois do nascimento. (BERNARDINO DE LA SERNA, J. et al., 2013; SINGH, N. et al., 2015)

2.1.1 Metabolismo Surfactante pulmonar B (SP-B)

A expressão da SP-B é restrita às células claras (alveolares tipo I) e células alveolares tipo II do epitélio respiratório. Apesar de ser claro que a síntese de SP-B nas células alveolares II é associada com a síntese de surfactante, sua função nas células claras continua incerta, e as evidências apontam que ela pode não contribuir com a SP-B do surfactante, pois a ausência da expressão da SP-B nessas células, não influencia na sobrevivência do recém-nascido (HOROWITZ, S. et al., 1991; WIKENHEISER, K.A. et al., 1992).

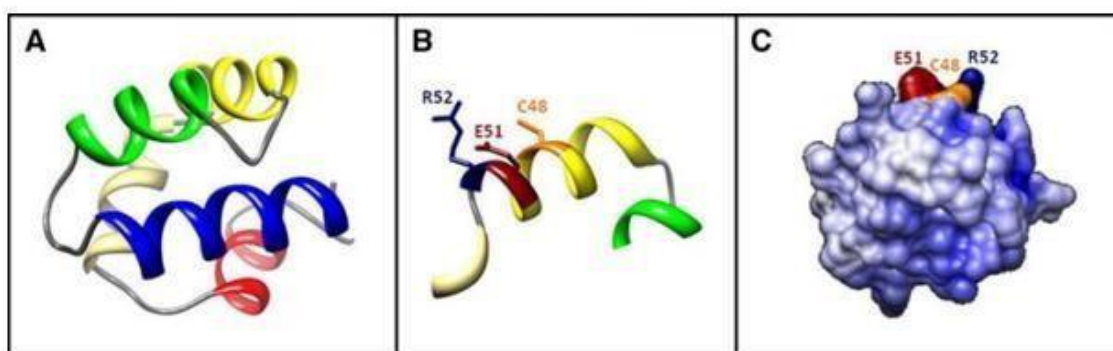
O produto primário da tradução da SP-B, é uma pré proteína de 381 aminoácidos. Um peptídeo sinal de 23 aminoácidos localizado no NH₂ terminal da pré proteína, medeia a translocação da SP-B no lúmen do retículo endoplasmático. Com a clivagem co translacional

do sinal, se forma a pró proteína, que possui um peptídeo maduro de 79 aminoácidos, com um pró peptídeo terminal NH₂ e COOH. A eliminação da porção terminal COOH não perturba o tráfego intracelular da pró proteína, já a da NH₂ provoca acúmulo da SP-B no retículo endoplasmático, o que corrobora a hipótese de que este peptídeo é uma chaperona intramolecular, para o peptídeo hidrofóbico maduro (LIN, S. et al., 1996). Após translocação no retículo endoplasmático, as proteínas são transportadas para o complexo de golgi, e dali para o plasma das células alveolares do tipo II. No plasma, ficam concentrados em grânulos de secreção chamados corpos lamelares, de onde são secretados, em resposta a um estímulo externo. (IKEGAMI, M. et al., 1993).

2.1.2 Estrutura e Função da SP-B

Segundo Zaltash et al (2000), entender o mecanismo por trás das funções da SP-B, fica difícil sem uma estrutura experimental, e ele o projetou, baseado numa estrutura tridimensional de NK-lisina monomérico, resultando em uma saponina globular, com 5 hélices (Figura 1).

Figura 1- Estrutura da proteína SP-B proposta por Zaltash et al., (2000)



SP-B recém processado pode associar-se com vesículas internas dos corpos multivesiculares, e promover a fusão de vesículas, o que em troca pode facilitar a formação das lamelas da membrana. Essa hipótese é corroborada por várias linhas de evidências. *In vitro*, se mostrou que SP-B está associada à agregação, fusão, e lise das vesículas de fosfolipídio (RYAN, M. A; QI, X.; WEAVER, T. E. 2005), o que *in vivo*, está associado com a transferência de lipídios entre as mono e bicamadas (CRUZ, A.; WORTHMAN, L. A.; PÉ REZ-GIL, J. 2000), e todos os processos de reestruturação da membrana, necessários durante o ciclo metabólico do surfactante pulmonar. SP-B é tido como essencial para a formação de corpos lamelares, que é a estrutura onde os pneumócitos II montam, estocam e secretam a membrana do surfactante pulmonar (STAHLMAN, M. T.; GRAY, M. P.; WEAVER, T. E. 2000).

Quanto à tensão superficial, a principal função dos fosfolípidos do surfactante é de atuar como molécula que se situa entre o ar e o líquido, reduzindo a tensão superficial, facilitando a abertura pulmonar na inspiração e mantendo a estabilidade pulmonar na expiração evitando o colapso alveolar (VELDHUIZEN, R. et al., 1998). No entanto, os lipídios sozinhos não são eficientemente adsorvidos na interface para formar o filme da superfície. SP-B é uma das mais importantes proteínas envolvidas na transferência do material na interface. Na ausência de SP-B, o lipídio mostra tensão superficial de equilíbrio elevada e lentidão cinética de adsorção durante a expansão (SCHÜRCH, D. et al., 2010).

A combinação de SP-B e fosfolípidos do surfactante mimetiza a maioria das funções quanto à atividade biofísica do surfactante natural “*in vivo*” (RIDER, E.D. et al., 1993), assim como aumenta a resistência à inativação por proteínas anômalas ao surfactante. Nos quadros de síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido ou do tipo adulto, e de lesão pulmonar, são encontrados níveis reduzidos de SP-B (HENRY, M.D. et al., 1996; GREENE, K.E. et al., 1999).

2.2. SEPSE

Sepse, é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada à infecção (MERVIN.S et al 2016). É responsável por 25% da ocupação de leitos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) no Brasil, sendo atualmente a principal causa de morte nessas unidades, e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e o câncer (ILAS 2019).

Dependendo da interação hospedeiro e microrganismo, a manifestação da seps se dá de forma distinta, (SIQUEIRA-BATISTA, R. et al., 2009) podendo clinicamente ser identificada como: infecção, síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), seps, seps grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (AMERICAN College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference 1992; PEREZ, M.C.A. 2009).

No Brasil, os aspectos epidemiológicos da seps têm sido investigados, destacando-se BASES Study (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) – estudo de coorte multicêntrico e observacional realizado em cinco unidades de terapia intensiva públicas e privadas –, no qual se identificou uma densidade de incidência de seps de 57,9 por 1000 pacientes-dia (95% IC 51,5- 65,3) (SILVA. E. et al., 2004). A taxa de letalidade de pacientes com Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), seps, seps grave e choque séptico foi 24,2%, 33,9%,

46,9%, e 52,2%, respectivamente. É importante comentar que outras investigações como o SEPSE Brasil (SALES JÚNIOR, J.A.L. et al., 2006) e o COSTS, (SOGAYAR, A.M. et al., 2008) apontam para taxas de letalidade similares. De forma ainda mais preocupante, o estudo multicêntrico PROGRESS (BEALE, R. et al., 2003), do qual fizeram parte sete UTIs nacionais, revelou que as taxas de letalidade nas UTIs no Brasil foram maiores (56%) que aquelas de outros países em desenvolvimento (45%) e de países desenvolvidos (30%), apesar de não existirem diferenças nas idades medianas de cada grupo, nem nos escores de prognóstico e de disfunção orgânica (SIQUEIRA-BATISTA, R. et al., 2009).

Um dos órgãos mais atingidos em episódios de sepse é o pulmão. Seps e SRIS estão entre as principais patologias envolvidas no desenvolvimento da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e da Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) (PADKIN et al., 2003).

2.3 LESÃO PULMONAR NA SEPSE

O pulmão é particularmente vulnerável a lesões inflamatórias, como consequência, os neutrófilos são atraídos e, tornando-se ativados, liberam mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesam direta ou indiretamente o endotélio vascular e o epitélio alveolar, propagando-se assim o processo inflamatório (PARSONS et al., 2005).

O epitélio pulmonar é composto principalmente por dois tipos celulares, as células alveolares do tipo I e as do tipo II, também chamados pneumócitos. Representam a barreira mecânica que protege o pulmão dos insultos do meio, está ativamente envolvida na defesa imune do pulmão e contribui para a manutenção do equilíbrio do fluído da superfície alveolar (GUILLOT, L. 2013). Os pneumócitos do tipo I, cobrem 90% da superfície alveolar (MASON, R.J. 2006; BEERS, M.F. 2017). Seu fino citoplasma e limitado número de mitocôndrias, lhes deixam extremamente sensíveis à lesão (HERZOG, E.L. et al., 2008) e vulneráveis (GRIFFITHS, M.J. et al., 2005). Essas células são altamente especializadas para a função chave do pulmão de troca gasosa entre alvéolo e capilar

O epitélio alveolar está em íntimo contato com a monocamada endotelial da rede de capilares pulmonares (LOSA, D.; CHANSON, M. 2015). Formam não só uma barreira passiva, mas também regula ativamente a permeabilidade vascular, passagem dos componentes do sangue para os tecidos circundantes, tônus vascular e sinalização e angiogênese (AIRD, W.C. 2008). A disfunção da barreira alvéolo capilar e a permeabilidade endotelial aumentada é uma das maiores características patológicas da lesão pulmonar aguda (JANGA, H. et al., 2018; JOHNSON, E.R.; MATTHAY, M.A. 2010).

2.3.1 Mecanismos de lesão - Inflamação

A inflamação é iniciada pelo dano tecidual ou pela presença de algum micro-organismo. Uma variedade de patógenos são reconhecidos de maneira inespecífica, através de regiões presentes nos micro-organismos chamados PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), ou através de proteínas intracelulares ou mediadores liberados de células mortas, que associadas aos PAMPs são chamados de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) (BIANCHI, 2007). Os DAMPs são representados por lipopolissacarídeos (LPS), de bactérias gram negativas (endotoxinas), ácido lipoteicoico e peptidoglicanos de gram-positivas (exotoxinas), entre outras, que disseminadas a partir do local agredido, ativam de modo sistêmico as células de defesa (OPAL, 2007).

Esta ativação, se dá da seguinte forma: A ligação dos DAMPs aos *Toll like receptors* (TLRs) (- Receptor associado a imunidade inata, capaz de reconhecer padrões moleculares. Está presente em vários grupos de células, como macrófagos e linfócitos), aciona diferentes vias celulares de sinalização, com ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B). A ativação do NF- κ B é rápida e imediata, com sua translocação para o núcleo, onde se liga a regiões de genes alvo para iniciar a transcrição de citocinas inflamatórias, como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), Fator de necrose tumoral (TNF- α), além de quimiocinas e moléculas de adesão, evento considerado crucial no desenvolvimento de sepse e da inflamação pulmonar (ROSS et al., 2000; KARIN; BEN-NERIAH, 2000; CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000; ZHANG; GHOSH 2001; COHEN, 2002).

TNF- α e IL-1 estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, células epiteliais dos pulmões e do intestino, facilitando a migração de leucócito, além de estimular células específicas do fígado, o qual produz proteínas de fase aguda, importantes para a defesa do hospedeiro por aumentar a produção de certas proteínas de coagulação e do sistema complemento (NETEA, et al., 2003).

Nesta complexa teia fisiopatogênica, o TNF- α tem um papel relevante, ao estimular os leucócitos e as células endoteliais a liberarem mais citocinas (bem como mais TNF- α) e a aumentar o *turnover* de ácido araquidônico (CURI; HOMEM DE BITTENCOURT JR, 2007). Além disso, a interação entre TNF- α e IL-1, por estimulação recíproca, propicia o desenvolvimento de um estado pró-coagulante através da inibição da trombomodulina, além de promover uma série de alterações hemodinâmicas encontradas na sepse, tais como aumento da

permeabilidade vascular, diminuição da resistência vascular periférica e inotropismo negativo (SIQUEIRA-BATISTA, R. et al., 2011).

Com a ativação sistêmica da resposta imune devido a liberação de grande quantidade de DAMPs do patógeno invasor e/ou do tecido lesado do hospedeiro, ocorre uma superestimulação das células imunes. Como resultado, a sepse é acompanhada de um marcado desequilíbrio nas respostas às citocinas, conhecida como tempestade de citocinas (aumento nos níveis plasmáticos em até 100x), a qual converte a resposta que normalmente seria benéfica para combater a infecção, em excessiva e danosa (RITTIRSCH; FLIERL; WARD. 2008).

As citocinas ativam uma coleção de cascatas inflamatórias que inclui o sistema complemento, o sistema de coagulação, fatores de crescimento, neuromediadores, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SEONG; MATZINGER, 2004; KONO; ROCK, 2008).

2.3.2 Estresse oxidativo

A expressão estresse oxidativo é relativa ao desequilíbrio entre a produção e a remoção de moléculas reativas oxidantes do organismo, levando ao seu aumento no organismo, o que constitui um mecanismo de lesão em várias doenças (KUMAR, V. et al., 2013). Esse desequilíbrio tem sido demonstrado em vários estudos de sepse, e níveis de antioxidantes diminuídos também tem sido relatado (GOODE, H. F. et al., 1995)

Há vários mecanismos envolvidos na produção de moléculas oxidantes, na saúde (FISHER JR, C. J.; DHAINAUT, J. F.; OPAL S. M. et al. 1994) e na sepse. Reações redox, são base para várias funções fisiológicas importantes, como sinalização celular (JONES, D. P. 2008.; ZHANG, J. et al., 2016). Oxidantes e antioxidantes são essenciais nesse processo. Agentes oxidantes são produzidos em pequenas quantidades, durante a respiração e geração de energia mitocondrial, e são produzidas também por leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, como mecanismo de eliminação de agentes lesivos, durante inflamação e defesa do hospedeiro (KUMAR, V. et al., 2013). Na sepse, essas mesmas células são responsáveis pela “explosão oxidativa” que desde cedo acontece (CHANOCK, S.J.et al., 1994; ROBINSON, J.M. BADWAY, J.A. 1994).

Essas moléculas reativas quando geradas em altas concentrações nas células, atacam ácidos nucleicos, proteínas e lipídios celulares. Além disso, iniciam reações auto catalíticas, e as moléculas que interagirem com eles, são também convertidas a radicais livres, propagando assim a cadeia de danos. Causam lesão através de três principais reações:

- Peroxidação lipídica das membranas: a interação lipídio- radical gera peróxido que são instáveis e reativos, e sobrevivem uma reação em cadeia auto catalítica;
- Ligação cruzada e outras alterações da proteína: resultando no aumento da degradação ou perda da atividade enzimática. As reações radicais livres também podem causar a fragmentação dos polipeptídios
- Lesões do DNA: As reações radicais livres com a timina no DNA mitocondrial e nuclear produzem quebra do filamento único no DNA. Essa lesão no DNA foi implicada na morte celular, envelhecimento celular e transformação maligna das células (KUMAR, V. et al., 2013).

Importantes EROs na patogenia da sepse inclui superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (HO). Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) inclui o radical livre Óxido nítrico (NO) e não radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (MEO, S. D. et al., 2016). A expressão de Óxido Nítrico sintetase (NOS), é aumentada pelos lipopolissacarídeos e pela ativação do $NF-\kappa\beta$, e consequentemente a concentração de NO . NO pode combinar com O_2 para formar $ONOO^-$ (BROWN, G. C. 2001). Níveis aumentados de NO , gera H_2O_2 na mitocôndria pela inibição da citocromo C oxidase (PODEROSO, J.J. et al., 1996).

As células desenvolveram múltiplas vias naturais de remoção dos radicais livres, pela ação de superóxidos dismutases (SOD), glutathione peroxidase (GSH), catalase (CAT) (KUMAR, V. et al., 2013). O efeito prejudicial dos Radicais Livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los com os seus sistemas naturais. Marcadores do estresse oxidativo na sepse, inclui diminuição dos níveis de GSH, aumento do nível de malondialdeído (MDA), aumento das proteínas do grupo carbonila, e aumento da relação SOD/CAT, causando acúmulo de H_2O_2 na célula (BREALEY, D. et al., 2004)

2.4 TRATAMENTO DA SEPSE

Assim que se suspeite que o paciente possa ter sepse, a antibioticoterapia deve ser iniciada, para evitar o desenvolvimento de complicações e progressão do paciente para choque séptico ou falha múltipla de órgãos. Para reduzir a mortalidade associada à sepse, recomenda-se que a antibioticoterapia seja iniciada nas primeiras horas após a sua identificação. Essa estratégia leva à redução de 13.7% de mortalidade associada à sepse (GAIESKI, D.F. et al., 2010; FERRER, R. et al., 2014).

O importante papel do estresse oxidativo mediando e promovendo a patogenia na sepse, faz com que ele seja um potencial alvo no tratamento de casos de sepse (CRIMI. E, SICA. V, SLUTSKY. AS, et al 2006-VON DESSAUER, B. et al., 2011). Antioxidantes possuem ação protetora no organismo contra as espécies reativas. Vários estudos mostraram que a terapia antioxidante combinada com a intervenção farmacológica convencional, pode diminuir a severidade da sepse, ou melhorar o quadro de pacientes sépticos, estando associada à redução da mortalidade, redução na duração da ventilação mecânica e tendência na redução de infecções (HUANG, T.S et al., 2013; HARDY, G. et al., 2012).

2.4.1 Antibioticoterapia

Considerando que inicialmente o agente agressor não é reconhecido, se indica neste momento, o uso de antibióticos de amplo espectro e baixa toxicidade, como as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (PEREIRA JUNIOR et al., 1998; CARVALHO et al., 2003). Cefalosporinas são drogas antimicrobianas beta lactâmicas, usadas como agente de primeira linha no tratamento de várias infecções como pneumonia, meningite e gonorreia. Desde a sua introdução na prática clínica em 1960, têm sido amplamente utilizadas. Comparado com outros agentes, as cefalosporinas apresentam menor nível de toxicidade, e um favorável perfil farmacocinético, além disso, apresentam amplo espectro de atuação e são de fácil administração ((WILLIAM, F. et al., 1999). .

Como as outras drogas betas lactâmicas, as cefalosporinas, exercem sua ação, interferindo na síntese do peptideoglicano, principal componente da parede celular bacteriana. Como parte do crescimento e divisão celular normal, os componentes peptidioglicanos são sintetizados no citoplasma, transportados através da membrana citoplasmática, e inseridos em peptideoglicanos reticulados, pelas enzimas carboxipeptidases, endopeptidases e transpeptidase. Essas enzimas, são chamadas de proteínas de ligação à penicilina (PLPs), estão alvo das drogas beta lactâmicas. Como o grupo amida do anel beta lactâmico das cefalosporinas é semelhante ao grupo amida do peptideoglicano, as cefalosporinas se ligam às PLPs, tornando-as inativas. Consequentemente, a integridade estrutural do peptidoglicano é substancialmente alterada. As cefalosporinas de terceira geração possuem uma alteração estrutural, que aumenta a sua afinidade pelas PLPs e aumenta sua atividade contra gram negativas (WILLIAM, F. et al., 1999).

Ceftriaxona é uma cefalosporina da terceira geração, que tem um amplo espectro de atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas. Pode ser administrada pela via

intravenosa ou intramuscular, já que sofre inativação no estômago, e sua absorção duodenal é limitada, inviabilizando a via oral. Geralmente, exibe maior espectro de atuação e maior atividade contra bactérias aeróbias gram negativas, do que as cefalosporinas de primeira e segunda geração. Sua eficácia no tratamento de ampla variedade de infecções causadas por bactérias gram positivas e gram negativas aeróbias e em alguns casos de bactérias anaeróbias tem sido documentada. Sua meia vida é muito maior (6-9h) do que a da maioria das cefalosporinas, e tem-se verificado eficácia da ceftriaxona com uma única dosagem diária, em vários tipos de infecção. Seu uso tem sido bem sucedido em pacientes que não responderam a outros antibióticos.

2.4.2 Suplementação de Antioxidantes

Segundo Pinho (2005), as defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: enzimáticas e não enzimáticas. A via enzimática, é um sistema composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH), as quais são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de espécies reativas (ER). A via não enzimática, composta por antioxidantes na sua maioria exógenos, incluem as vitaminas E, C, betacaroteno, vitaminas do complexo b, taurina entre outros. Grande parte dos antioxidantes não enzimáticos é encontrada na alimentação e eles podem ser suplementados por meio da dieta .

Antioxidantes como N-Acetil-Cisteína, ácido ascórbico e α -tocoferol mostraram diminuir a concentração de fator de necrose tumoral, Interleucina 1 e morte celular (GALLEY, H.F. et al., 1997; SALVEMINI, D. et al., 1999). Comparado com indivíduos saudáveis, a concentração de α -tocoferol, glutathione, β caroteno, ácido ascórbico e selênio, estão reduzidas nos pacientes com lesão pulmonar aguda (RICHARD, C. et al., 1990; BOWLER, R.P et al., 2003).

Biologicamente, vitamina C e E são as vitaminas antioxidantes mais importantes. Agem sinergicamente. Vitamina C é um potente doador de elétrons, que reage com radical hidroxila e superóxido. Vitamina E protege contra a peroxidação lipídica, resultando na formação de radicais alfa tocoferol, que em troca, são recicladas em vitamina E, com a colaboração de vitamina C (TYML, K. et al., 2005).

Estudos experimentais mostram que Vitamina C atenua lesão nos órgãos e melhora a sobrevivência nos animais sépticos, limita as consequências deletérias da sepse por múltiplos mecanismos, incluindo atenuação da resposta pró inflamatória, melhoria da função das barreiras

endotelial e epitelial e prevenção das anormalidades de coagulação associada à sepse (FISHER et al., 2011; FISHER et al., 2012; FISHER et al., 2014).

A vitamina E é o maior antioxidante presente nas membranas celulares, e atua contra a peroxidação lipídica (KAY et al., 1986). Ela pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o superóxido, a hidroxila e com o oxigênio singlet (MACHLIN; BENDICH, 1987). A vitamina E pode também proteger contra a peroxidação modificando a estrutura da membrana. A vitamina E, localizada perto do citocromo P-450 no fosfolípido da membrana, varre os radicais livres formados no citocromo P-450. A seguir, a vitamina C reduz o radical tocoferil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

N-acetil cisteína (NAC), é um componente tiol, com potente atividade antioxidante e anti-inflamatória (COTGREAVE IA.1997; OKA, S. et al., 2000). É um dos elementos chave de defesa antioxidante do organismo, fonte exógena de Glutathione (GSH) (BERK, M. et al., 2008; CARMELI, C. et al., 2012), que é uma das moléculas antioxidantes endógenas mais importantes. (PERCARIO, S et al., 2009). Em casos de estresse oxidativo, a glutathione reduzida (GSH), age como substrato para a enzima glutathione peroxidase (GPX), que é essencial para a detoxificação do peróxido de hidrogênio e lipídico. Portanto os níveis de GSH plasmático podem estar depletados em casos de sepse (KELLER, G.A. et al., 1985; LYONS, J. et al., 2001). Após administração, NAC é convertida em L-cisteína, um dos constituintes de GSH, por isso

NAC é considerado como tendo ação como doador de cisteína, reabastecendo o estoque intracelular de GSH. Além disso, NAC possui também ação antioxidante intrínseca. Reage com radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (ARUOMA, O.I. et al., 1989), aumenta a atividade do superóxido dismutase citoplasmático e reduz peroxidase lipídica auto catalítica. NAC pode suprimir a ativação de neutrófilos e macrófagos (KHARAZMI, A. et al., 1988), atenua a adesão leucocitária induzida por endotoxinas e reduz o vazamento capilar (SCHMIDT, H. et al., 1997).

Estudos experimentais em ratos sépticos mostram que tratamento com NAC tem ação benéfica na GSH do eritrócito, no TNF- α plasmático, na função pulmonar e nos níveis de malondialdeído (MDA) renal (GÜL, M. ET AL., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da coadministração de ceftriaxona e antioxidantes na lesão pulmonar aguda induzida por sepse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a sepse por ligação e punção cecal (CLP) em ratos *Wistar*;
- Analisar as alterações histopatológicas no parênquima pulmonar de ratos *Wistar* tratados com ceftriaxona isoladamente ou coadministrada com antioxidante;
- Investigar a expressão imuno-histoquímica da proteína SP-B no parênquima pulmonar de ratos *Wistar* tratados com ceftriaxona isoladamente ou simultaneamente com antioxidantes;
- Quantificar a expressão da proteína SP-B no lavado bronco-alveolar de ratos *Wistar* tratados com ceftriaxona administrada isoladamente ou coadministrada com antioxidantes através da técnica de *Western blotting*.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos (LFPB) em parceria com o Laboratório de Neurofisiologia Endócrina (LNEM) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e dos laboratórios de histologia e biotecnologia do programa de pós graduação em patologia localizados na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, no *campus* Recife.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para avaliação histopatológica e da expressão da proteína surfactante tipo-B no pulmão de ratos sépticos tratados simultaneamente com ceftriaxona e antioxidantes foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos (300-350 g), provenientes do biotério do departamento de fisiologia e farmacologia do centro de biociências da UFPE. Todos os animais passaram por um período de adaptação de 24h, e foram mantidos em condições padrões (temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com controle de ciclo claro/escuro), com acesso à ração comercial (presence) e à água *ad libitum*, antes dos experimentos.

Todos procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Ética em Experimentação Animal, COBEA, e com a aprovação pelo Comitê de Ética do Centro de Biociências da UFPE sob o nº23076.027592/2017-85.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.3.1 Indução de sepse por ligação e punção cecal (CLP)

Inicialmente, os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais (n=10 animais/grupo) conforme descrito a seguir:

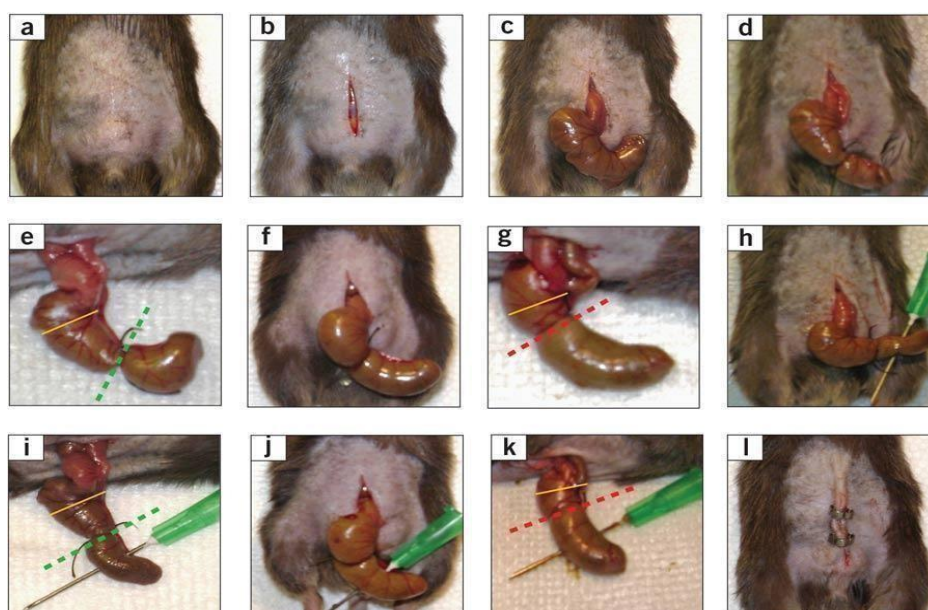
- Grupo SHAM - Placebo operado
- Grupo SHAM +ATB - Placebo operado tratado com ceftriaxona (30 mg/kg;i.p.);

- Grupo CLP – animais sépticos que receberam água destilada (15 ml/kg; i.p.).
- Grupo CLP+ATB – animais sépticos tratados com ceftriaxona (30 mg/kg; i.p.);
- CLP+ATB+AO – animais sépticos tratados simultaneamente com ceftriaxona (30 mg/kg; i.p.) e antioxidantes (26 mg/kg; i.p.).

Para minimizar a variabilidade entre os diferentes experimentos, o procedimento de indução de sepse foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador. Os animais dos grupos CLP, CLP+ATB ou CLP+ATB+AO foram submetidos ao modelo experimental de sepse, pela punção, ligadura e perfuração do cécum.

Para tanto, sob condições assépticas, e anestesia, (Cetamina e Xilasina, 100mg/kg e 10mg/kg, respetivamente), uma linha média de 3-centímetros, realizou-se laparotomia, para permitir a exposição do cécum (ANDRADES, et al., 2011). O cécum foi firmemente ligado com uma linha de sutura de seda 3,0 na sua base, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado com uma agulha de 14 gauge. Comprimiu-se então suavemente o cécum, para expor uma pequena quantidade de fezes a partir do local de perfuração (figura 3 abaixo). Uma operação simulada (laparotomia e exposição cecal, sem qualquer outra manipulação) foi realizada nos animais dos grupos SHAM ou SHAM +ATB.

Figura 2 - a) antissepsia e tricotomia da região abdominal inferior; b) incisão; c) exposição do cécum; d, e) Ligação cecal. a ligação na região tracejada a vermelho induz sepse severa e a na região tracejada de verde induz sepse moderada. f ,g) Sepse severa. h, i,j,k) Punção cecal. l) fechamento da cavidade (RITTIRSCH, D. et al., 2009).



4.3.2 Tratamento dos animais

Todos os animais foram observados, para determinar os sinais de infecção (tais como, piloereção, letargia, diarreia, taquipneia e perda de peso). 24h após o procedimento cirúrgico, os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos de acordo com seus respectivos grupos: i) SHAM; ii) SHAM+ATB (ceftriaxona; 30 mg/kg; i.p.); CLP água destilada (5 ml/kg; i.p.); CLP+ATB (ceftriaxona; 30 mg/kg; i.p.) e CLP+ATB+AO (ceftriaxona (30 mg/kg; i.p.) + antioxidantes (1ml/kg), contendo ácido ascórbico (50 mg/kg), N-acetil cisteína (10mg/kg) e alfa tocoferol (20 mg/kg). Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados para a coleta do lavado bronco alveolar e do tecido pulmonar. Estipulou-se coletar em cada grupo, o lavado bronco alveolar de seis animais, para determinação da expressão da SP-B, por *Western blotting*, e amostras do tecido pulmonar de quatro animais para as análise histopatológica e determinação da expressão da SP-B através da técnica de imuno-histoquímica

4.3.3 Coleta do lavado bronco alveolar (LBA) e do tecido pulmonar

O lavado bronco alveolar (LBA) foi obtido conforme descrito por De Castro (1995). Doze horas após o último procedimento experimental, os animais foram anestesiados. Em seguida, foram tricotomizados na região ântero-superior do pescoço e realizou-se a dissecação para exposição da traquéia. Na sequência, uma cânula (sonda de aspiração número 6) foi introduzida na traquéia e seis lavagens com 5 mL de água destilada foi feita, obtendo-se um volume final de 30 ml de lavado. O fluido coletado foi centrifugado a 1400 RPM durante 10 min a 4°C. O precipitado (PELLET CELL) do LBA foi ressuscitado em 1mL de água destilada e armazenado temporariamente em gelo, ao abrigo da luz. Os tecidos excisados (lobo inferior direito do pulmão), foram fixados em formol tamponado e processados para análise histopatológica.

4.3.4 Determinação da proteína SP-B no LBA através da técnica de *Western blotting*

A determinação das proteínas totais do LBA foi feita pelo método de Bradford. misturou-se 10µl do LBA a 45 µL do lavado para eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamina (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamina, 6-15%), efetuou-se a eletroforese na presença de

tampão de corrida, contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. Em seguida transferiu-se as proteínas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad®). Posteriormente, a membrana foi lavada em Tampão Salina Tris Tween-20 (TBST) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 e 2% Tween-20), 3 vezes por 10 min, em temperatura ambiente. A membrana foi então incubada a 4° C por 12 horas, com anticorpo primário específico contra as proteínas surfactante B (ABS 21- Merck Millipore a 1:1000). O anticorpo contra B-actina (sc-47778- Santa Cruz Biotechnology a 1:1000) foi utilizado como controle interno da reação de *Western blotting*. Após lavar as membranas com TBST para remover o anticorpo primário, os “blots” foram incubados por 1h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (*anti-rabbit* 1:10000). Após a ligação do anticorpo secundário, foi acrescentada uma solução de ECL (Armesham Biosciences®), que, ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente, permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário. As bandas foram visualizadas e as imagens captadas utilizando o sistema de foto documentador ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad®).

4.3.5 Análise histopatológica do tecido pulmonar

Para análise histopatológica, amostras do pulmão dos grupos de animais foram fixados em formalina 10% e processados de forma rotineira para inclusão em parafina. Cortes em parafina foram desparafinizados e corados através da técnica de hematoxilina e eosina (MONTES,G.S. 1996) e examinados através de microscópio óptico conectado a Câmera Leica DFC-280 do laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos da UFPE. Para cada grupo observou-se a arquitetura do tecido pulmonar, atendendo para a presença de congestão vascular, edema intersticial, alteração da estrutura alveolar e infiltrado de células inflamatórias.

4.3.6 Imuno-histoquímica do pulmão

Os cortes (4 µm) foram desparafinizados em xilol, hidratados em etanol (100%-70%) e submetidos a recuperação antigênica induzida por calor em tampão citrato 10mM (pH 6,0). Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de de

metanol-peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) por 30 minutos, a 25°C. Também foi aplicada a solução de bloqueio de marcação inespecífica a 1,5%, do kit de revelação ABC Staining System (SC-2018, Santa Cruz) conforme o fabricante, a 25°C. Para detecção do antígeno, a inibição do anticorpo primário anti- proteína surfactante B (SP-B, ABS21, Merck Millipore), diluído na solução de bloqueio de marcação inespecífica (1:100), foi realizada por 12 a 16 horas (overnight), a 4°C. A revelação, feita com o kit ABC Staining System, foi realizada de acordo com o fabricante, a 25°C, seguida de contra-coloração com hematoxilina, desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem da lâmina com Entellan (Merck). Entre cada etapa, as amostras foram lavadas duas vezes (5 min cada) com tampão fosfato de sódio (PBS) 100mM, pH 7,2, contendo 150 mM de NaCl. O controle positivo da marcação foi realizado utilizando amostra de pulmão humano, enquanto o controle negativo foi realizado substituindo o anticorpo primário pela solução de bloqueio do kit de revelação. As amostras então foram analisadas em microscopia óptica

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

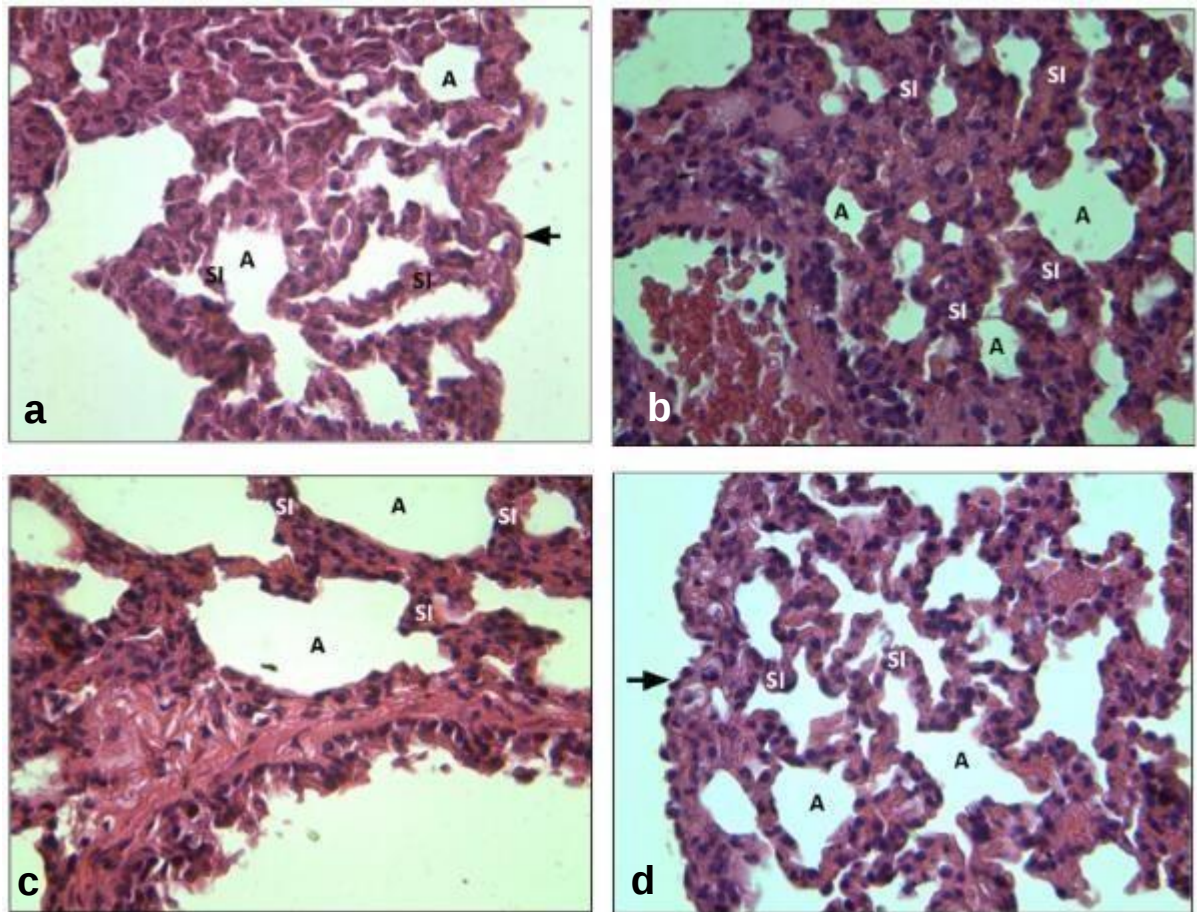
Os valores encontrados nos experimentos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) com comparações múltiplas entre as médias utilizando o *software GraphPad Prisma 8.0.2*. Para todos os experimentos realizados, os valores foram considerados estatisticamente significante quando $p < 0,05$

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM CEFITRIAXONA ADMINISTRADA ISOLADAMENTE OU SIMULTANEAMENTE COM ANTIOXIDANTE SOBRE TECIDO PULMONAR DE RATOS *WISTAR* SÉPTICOS:

A análise histológica do tecido pulmonar dos animais não sépticos (SHAM), sépticos (CLP) ou sépticos tratados com ceftriaxona isoladamente (CLP+ATB) ou coadministrada com antioxidantes (CLP+ATB+AO) está apresentada Figura 3. Na análise histológica do tecido pulmonar dos grupos SHAM se verificou parênquima pulmonar morfolologicamente normal (alvéolos preservados, celularidade representada principalmente por pneumócitos e alguns leucócitos (macrófagos) (figura 3A); enquanto no grupo CLP verificou-se septos interalveolares muito espessados (presença de edema), infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com alterações morfológicas alveolares. (Figura 3B). No grupo CLP+ATB (Figura 3C), verificou-se septos interalveolares poucos espessados (pouco edema), leve infiltrado leucocitário, sem alterações morfológicas alveolares. Já na análise histologia do tecido pulmonar do grupo CLP+ATB+AO (Figura 3D), verificou-se septos interalveolares morfolologicamente normais, sem alterações morfológicas alveolares e sem infiltrado inflamatório.

Figura 3 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de ratos *Wistar* **a**- placebo (SHAM); **b**- Séptico não tratado (CLP); **c**- Séptico tratado com ceftriaxona (CLP+ATB) e **d**- Séptico tratado com ceftriaxona e antioxidantes (CLP+ATB+AO). (A =Alvéolos; SI=Septo Interalveolar; Seta= Pleura visceral; Coloração H.E. AU 400X)



5.2 EXPRESSÃO DA SP-B NO PULMÃO DOS RATOS WISTAR

A expressão imuno-histoquímica de SP-B nos grupos SHAM, CLP, CLP+ATB e CLP+ATB+AO está registrada na figura 5 e 6. No grupo SHAM, observou-se uma boa distribuição da marcação da SP-B ($34,5 \pm 19,77$ marcações/campo) ao longo do parênquima pulmonar. No grupo CLP, foram evidenciadas as células e estruturas alveolares, mas nesse grupo a expressão de SP-B foi esparsa e bastante fraca ($13,25 \pm 3,40$ marcações/campo) quando comparada ao grupo SHAM. Nos grupos CLP+ATB e CLP+ATB+AO voltou-se a observar uma marcação mais bem distribuída e notório aumento da expressão da SP-B ($56,75 \pm 20,25$ e $65,25 \pm 28,67$ marcações/campo, respectivamente) ao longo do parênquima pulmonar. Os níveis de expressão da SP-B nesses grupos foram significativamente superiores ($p < 0,05$) àqueles registrados nos grupos CLP e comparável ao verificado no grupo SHAM.

Figura 4 - Imuno-histoquímica demonstrando marcação de SP-B no parênquima pulmonar de ratos Wistar.

a) grupo SHAM; b) Séptico não tratado (CLP); c) Séptico tratado com ceftriaxona (CLP+ATB); d) Séptico tratado com ceftriaxona e antioxidante (CLP+ATB+AO).

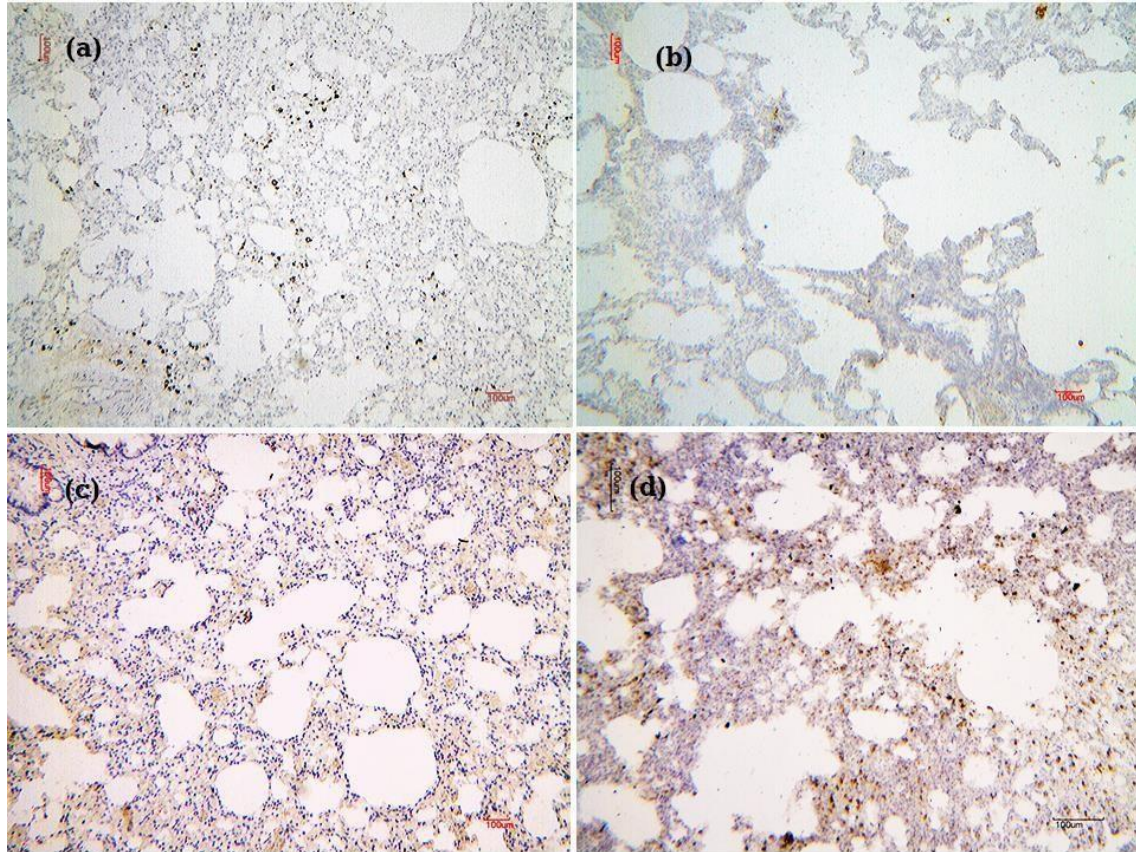
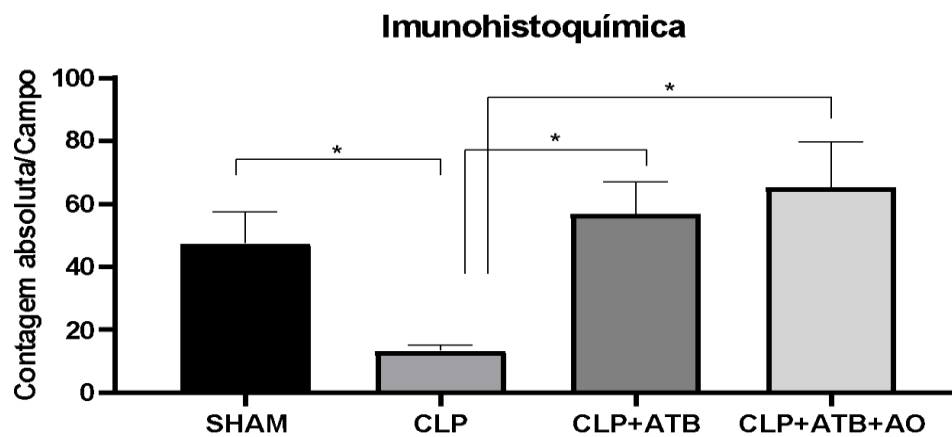


Figura 5 - Resultado da análise semi-quantitativa do número médio de marcação de SP-B/campo analisado nos grupos grupo SHAM; Séptico não tratado (CLP); Séptico tratado com ceftriaxona (CLP+ATB); Séptico tratado com ceftriaxona e antioxidante (CLP+ATB+AO).

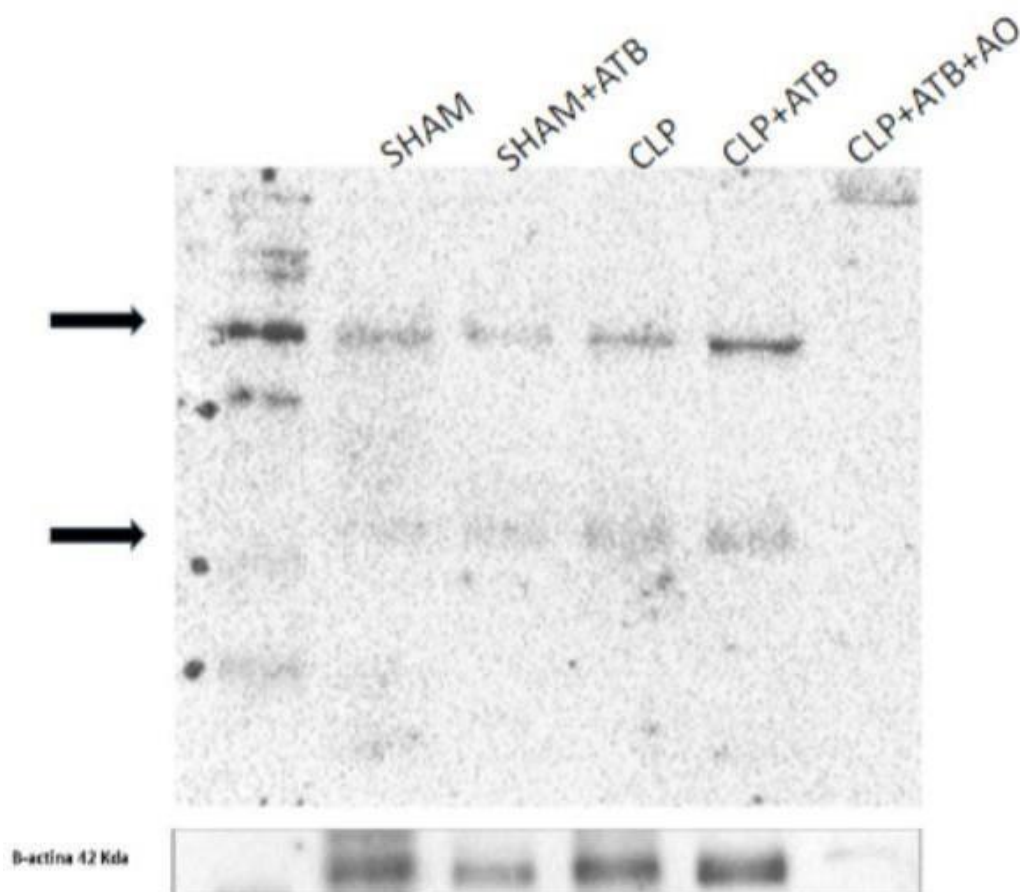


5.3 DETERMINAÇÃO DA SP-B NO LBA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*

A determinação da proteína SP-B no LAB, pelo *Western blotting* não foi possível, embora tenha sido verificada a formação de bandas que nos leva a crer que correspondem possivelmente aos oligômeros da proteína SP-B. Johansson, J.T. et al., (1991) relatam que a formação de oligômeros de 16, 24 e 32 kDa é característico da SP-B.

Técnicas de otimização dessa dosagem como liofilização do LBA e utilização do filtro Amicon stirred cells® já estão sendo investigadas e consideradas para pesquisas posteriores.

Figura 6 - *Western blotting* do LBA dos ratos Wistar, com setas mostrando os possíveis oligômeros da proteína SP-B.



6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que sepse induz a lesão pulmonar, associada à diminuição da expressão de SP-B no parênquima pulmonar. O grupo CLP foi o que apresentou maior grau de lesão e menor preservação da SP-B no pulmão. Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado associação entre a lesão pulmonar e expressão de SP-B. Baron et al., (2004) verificaram que óxido nítrico sintetase (NOS-2) induziu lesão pulmonar em ratos, e diminui a expressão de SP-B. Thammanomai et al, (2007), evidenciaram que ventilação com volume corrente reduzido em camundongos com lesão pulmonar aguda, reduziu a injúria pulmonar e aumentou a expressão de SP-B.

Bein et al., (2009) por outro lado, identificaram que a preservação da SP-B foi fundamental para a sobrevivência de animais submetidos a lesão pulmonar induzida por níquel. Embora não se tenha coletado dados de sobrevida, a maior quantidade de mortes foi verificada no grupo dos animais CLP, podendo isto estar associado com a redução aguda da SP-B nesses animais. Melton et al. (2003) associaram a diminuição da SP-B (cerca de 75% a 80%) com a parada respiratória. BEINK et al. (2009) descrevem que manter os níveis de SP-B no parênquima pulmonar é um fator crítico para a preservação da função pulmonar.

O estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na patogênese da lesão pulmonar (SALVEMINI, D. et al., 2002). Baradaran Rahimi et al. (2019), observaram que durante a sepse induzida por LPS, houve aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), e óxido nítrico (NO), e diminuição dos níveis de superóxido dismutase (SOD), e catalase (CAT) no pulmão de animais, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com antioxidantes restaurou o balanço redox, resultando em aumento significativo da atividade enzimática da SOD e CAT, mostrando um efeito protetor no parênquima pulmonar. Os estudos de WICHTERMAN et al e VILLA et al corroboram com os trabalhos anteriores, nos quais o tratamento com antioxidantes resultaram em diminuição dos efeitos de EROs, em pacientes com infecção respiratória grave (WICHTERMAN, K.A. et al., 1980; VILLA, P. et al., 1995).

Ceftriaxona isolada mostrou eficiência no tratamento da sepse, de modo que comparado com CLP, tanto CLP+ATB quanto CLP+ATB+AO apresentaram melhoras a nível histopatológico e imunohistoquímico. Todavia, o grupo CLP+ATB+AO apresentou uma eficiência ainda maior do que o grupo CLP+ATB, na prevenção dos danos do parênquima pulmonar, mostrando que o tratamento simultâneo com ceftriaxona e antioxidantes apresenta um efeito protetor ainda maior do que ceftriaxona isoladamente, confirmando a ação protetora de antioxidantes em casos de lesão pulmonar.

Essa ação protetora dos antioxidantes pode ser justificada pelo facto dela contribuir para sanar o efeito das ERs produzidas tanto pelos tecidos em situação de estresse oxidativo, quanto pelos neutrófilos, que em casos de sepse são a principal fonte de espécies reativas no organismo. Embora espera-se que em resposta à infecção bacteriana aguda, houvesse aumento na quantidade de leucócitos (neutrófilos), há evidências de que com a administração de ceftriaxona ocorre o oposto, estando esta associada com o efeito colateral potencialmente fatal de neutropenia. Se ocorre neutropenia, nos tecidos de onde os estímulos inflamatórios são gerados provavelmente haverá aumento no número de neutrófilos, que conseqüentemente contribui com o aumento da produção de espécies reativas no tecido, que perpetua o ciclo pró-inflamatório e de lesão. É possível que a associação de ceftriaxona com antioxidantes tenha diminuído a ação das ERs no parênquima pulmonar o protegendo de maneira mais eficiente do que a ceftriaxona isolada.

Galvão et al. (2014), verificou que a coadministração de antibióticos e antioxidantes, reduziu a produção de ânion superóxido, peroxidação lipídica e formação de proteína carboniladas e aumentou a quantidade grupo sulfidril. Isso contribuiu para a restauração do balanço redox no pulmão. A importância de antioxidantes é confirmada por estudos que indicam que pacientes que sobrevivem à sepse, têm maior potencial antioxidante do que os que não sobrevivem (LEVINE, R.L. et al., 1990), e que a diminuição dos níveis de antioxidantes está relacionada com mortalidade (BULAJ, G. et al., 1998).

Embora os antioxidantes aparentem ter relação com a preservação do parênquima pulmonar dos animais sépticos, não se pode afirmar que os antioxidantes contribuem para a preservação da SP-B no pulmão. Nos grupos CLP+ATB e CLP+ATB+AO, verificou-se aumento da expressão dessa proteína de maneira significativa, comparado com CLP, no entanto, não se verificou diferença na expressão da SP-B entre eles. Portanto a melhoria na histologia observada no CLP+ATB+AO, não é necessariamente associada à expressão da SP-B no parênquima pulmonar.

Coletivamente, nossos resultados indicam que a melhor proteção contra a lesão pulmonar induzida por ligação e punção fecal (CLP) foi exibida pelo grupo CLP+ATB+AO. Dessa forma, nossos resultados contribuem para sustentação de argumentos de que os antioxidantes se apresentam como coadjuvantes importantes no tratamento de infecções respiratórias envolvendo lesão pulmonar.

7 CONCLUSÃO

- Nas doses utilizadas, o tratamento com ceftriaxona isoladamente ou coadministrada com antioxidantes reduziu sensivelmente a lesão pulmonar induzidas pela sepse; porém a redução dessa lesão foi superior nos animais tratados com ceftriaxona coadministrada com antioxidantes.
- Embora os dois esquemas terapêuticos (ceftriaxona isoladamente ou coadministrada com antioxidantes) tenham induzido aumento na expressão de SP-B no tecido pulmonar dos animais; não houve diferença nessa expressão entre esses tratamentos;
- A ceftriaxona coadministrada com antioxidantes pode representar uma estratégia mais eficiente do que sua administração isolada para o tratamento da lesão pulmonar aguda induzida por sepse, uma vez que esse regime terapêutico se mostrou mais eficiente no tocante a preservação da histoarquitetura das células que compõem o tecido pulmonar de ratos *Wistar*.

REFERÊNCIAS

AIRD, W.C. **Endothelium in health and disease**. Pharmacol. Rep, 2008.

ALLEN, G.; BATES, J.H. **Dynamic mechanical consequences of deep inflation in mice depend on type and degree of lung injury**. J Appl Physiol, 2004.

AMERICAN College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med, 1992.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. **The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid**. Free Radic Biol Med, 1989.

AUTILIO, C.; ECHAIDE, M.; BENACHI, A.; MARFAING-KOKA, A.; CAPOLUONGO, E.D.; PEREZ-GIL, J.; DE LUCA, D. **A noninvasive surfactant adsorption test predicting the need for surfactant therapy in preterm infants treated with continuous positive airway pressure**. J. Pediatr, 2017.

BARNES, A.I.; HERRERO, I.L.; ALBESA, I. **New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin**. Int. J. Antimicrob Agents, 2005.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, A.A.; KUMAR, R.S.; MONICKARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. **Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications**. J Biosci, 2003.

BEERS, M.F. J. Biol. Chem. 1996.

BEERS, M.F.; MOODLEY, Y. **When Is an Alveolar Type 2 Cell an Alveolar Type 2 Cell? A Conundrum for Lung Stem Cell Biology and Regenerative Medicine**. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2017.

BEALE, R.; REINHART, K.; DOBB, G.; SILVA, E.; LECLERC, J.; BASSON, B.; ANGUS, D. **PROGRESS Advisory Committee. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an internet-based sepsis registry**. Chest, 2003.

BERK, M.; COPOLOV, D.; DEAN, O.; LU, K.; JEAUVONS, S.; SCHAPKAITZ, I. et al. **N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia – a double-blind, randomized, placebo-controlled trial**. Biol Psy. 2008

BILEK, A.M.; DEE, K.C.; GAVER III D.P. **Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening**, J. Appl. Physiol, 2003.

BIANCHI, M. E. **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger**. J Leukoc Biol, 2007.

BOWLER, R.P.; VELSOR, L.W., DUDA, B.; CHAN, E.D.; ABRAHAM, E.; WARE, L.B.; MATTHAY, M.A.; DAY, B.J. **Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury.** Crit. Care Med, 2003.

BONE, R. C. **The pathogenesis of sepsis.** Ann Intern Med, 1991.

BROWN, G.C. **Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2001.

CABRÉ, E. J.; LOURA, L. M.; PRIETO, M. **Topology and lipid selectivity of pulmonary surfactant protein SP-B in membranes: answers from fluorescence.** Biochim. Biophys, 2012.

CABRERA-BENÍTEZ, N.E.; PAROTTO, M.; POST, M.; HAN, B.; SPIETH, P.M.; CHENG, W.E.; VALLADARES, F.; VILLAR, J.; LIU, M.; SATO, M. **Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial–mesenchymal transition.** Crit. Care Med, 2012.

CARVALHO, P.R.A; TROTTA, E.A. **Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse.** J pediatri, 2003.

CARMELI, C.; KNYAZEVA, M.G.; CUÉNOD, M.; DO, K.Q. **Glutathione precursor N-acetyl-cysteine modulates EEG synchronization in schizophrenia patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.** PLoS ONE. 2012

CHANG YIN CHIA. **Avaliação da função de um novo surfactante, de origem porssinna obtido da extração orgânica acoplada á adsorção em derivado de celulose.** São Paulo, 2004

CHANOCK, S. J; BENNA, J.; SMITH, R. M; BABIOR, B. M. **The respiratory burst oxidase.** The Journal of Biological Chemistry, 1994.

CHRISTMAN, J. W.; SADIKOT, R. T.; BLACKWELL, T. S. **The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases.** Chest, v. 117, p. 1482–1487, 2000.

CLARK, J.C.; WERT, S.E.; BACHURSKI, C.J.; STAHLMAN, M.T.; STRIPP, B.R.; WEAVER, T.E.; WHITSETT, J.A. **Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice.** Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A, 1995

COHEN, J. **The immunopathogenesis of sepsis.** Nature, 2002.

CORRÊA, G. F.; ZAPPAROLI, A. **Modelo experimental em roedores-Ligadura e perfuração cecal.** Revista Eletrônica de Farmácia 2012.

COTGREAVE IA. **N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications.** Adv Pharmacol 1997.

CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT JR, P. I. **Metabolismo do ácido araquidônico na sepse.** In: SILVA, F. P.; VELASCO, I. T. Sepse. Manole; 2007.

CREUWELS, L. A.; BOER, E. H.; HAAGSMAN, H. P. **Neutralization of the positive charges of surfactant protein C. Effects on structure and function.** J. Biol. Chem, 1995.

CROUCH, E.C. **Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D.** Biochimica et Biophysica Acta, 1998.

CRUZ, A.; WORTHMAN, L. A.; PÉ REZ-GIL, J. **Microstructure and dynamic surface properties of surfactant protein SP-B/dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial films spread from lipid-protein bilayers.** Eur. Biophys. J, 2000.

ECKENHO, R.G.; SOMLYO, A.P. Am. J. Physiol. 1988.

ELBURKI, M.S.; ROSSA, C.; GUIMARAES, M.R.; GOODENOUGH, M.; LEE, H.M.; URYLOFO, F.A.; ZHANG, Y.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M. **A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations.** Mediators Inflamm, 2014.

EZRATY, B.; VERGNES, A.; BANZHAF, M.; DUVERGER, Y.; HUGUENOT, A.; BROCHADO, A.R.; SU, S.Y.; ESPINOSA, L.; LOISEAU, L.; PY, B. et al. **Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway.** Science, 2013.

FARNSWORTH, C.W.; SHEHATOU, C.T.; MAYNARD, R.; NISHITANI, K.; KATES, S.L.; ZUSCIK, M.J.; SCHWARZ, E.M.; DAISS, J.L.; MOONEY, R.A. **A humoral immune defect distinguishes the response to Staphylococcus aureus infections in mice with obesity and type 2 diabetes from that in mice with type 1 diabetes.** Infect Immun , 2015.

FERRER, R.; MARTIN-LOECHES, I.; PHILLIPS, G.; OSBORN, T.M.; TOWNSEND, S.; DELLINGER, R.P.; ARTIGAS, A.; SCHORR, C.; LEVY, M.M. **Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program.** Crit Care Med, 2014.

FUJIWARA, T.; MAETA, H.; CHIDA, S.; MORITA, T.; WATABE, Y.; ABE T. **Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease.** The Lancet, 1980.

FREISE, H.; BRÜCKNER, U.B.; SPIEGEL, H.U. **Animal models of sepsis.** J Invest Surg, 2001.

FLEISCHMANN, C. et al. **Assessment of global incidence and mortality of hospital treated sepsis — current estimates and limitations.** Am. J. Respir. Crit. Care Med, 2016.

GALVÃO, A.M; WANDERLEY, M.S.O; SILVA, A.; 1 FILHO, C.A.M. MELO-JUNIOR, M.R.; SILVA, L.A.; STRECK, E.L.; DORNELAS DE ANDRADE, A.F.; MAIA. M.B.S; BARBOSA DE CASTRO, C.M.M. **Intratracheal co-administration of antioxidants and ceftriaxone reduces pulmonary injury and mortality rate in an experimental model of sepsis.** Respiriology, 2014

GAIESKI, D.F.; MIKKELSEN, M.E.; BAND, R.A.; PINES, J.M.; MASSONE, R.; FURIA, F.F.; SHOFR, F.S.; GOYAL, M. **Impact of time to antibiotics on survival in patients with**

severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. Crit Care Med, 2010.

GOERKE, J. **Pulmonary surfactant: functions and molecular composition.** Biochim. Biophys. Acta, 1998.

GOODE, H. F.; COWLEY, H. C.; WALKER, B. E.; HOWDLE, P. D.; WEBSTER, N. R. **Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction.** Critical Care Medicine. 1995.

GREENE, K.E.; WRIGHT, J.R.; STEINBERG, K.P.; HULL, W.; RUZINSKI, J.T.; CALDWELL, E.; WONG, W.B.; HULL, W.T. J.A.; AKINO, T.; KUROKI, Y.; NAGAE, H.; HUDSON, L.D.; MARTIN, T.R. **Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS.** Am J Respir Crit Care Med, 1999.

GRIFFITHS, M.J.; BONNET, D.; JANES, S.M. **Stem Cells of the Alveolar epithelium.** Lancet, 2005.

GUO, Y.; RAMOS, R.I.; CHO, J.S.; DONEGAN, N.P.; CHEUNG, A.L.; MILLER, L.S. **In vivo bioluminescence imaging to evaluate systemic and topical antibiotics against community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected skin wounds in mice.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012.

GUILLOT, L.; NATHAN, N.; TABARY, O.; THOUVENIN, G.; LE ROUZIC, P.; CORVOL, H.; AMSELEM, S.; CLEMENT, A. **Alveolar Epithelial Cells: Master Regulators of Lung Homeostasis.** Int. J. Biochem. Cell Biol, 2013.

GÜL, M.; AYAN, M.; SEYDANOĞLU, A.; CANDER, B.; GİRİŞGİN, S.; ERAYMAN, I.; ERDEM, S. **The effect of N-acetyl cysteine on serum glutathione, TNF- α and tissue malondialdehyde levels in the treatment of sepsis.** Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2011

GUPTA, R. ; HERNANDEZ-JUVIEL, J.M. ; WARING, A.J. ; WALTHER, F.J. **Synthetic lung surfactant reduces alveolar-capillary protein leakage in surfactant-deficient rabbits.** Experimental Lung Research, 2015;

HAWGOOD, S.; DERRICK, M.; POULAIN, F. **Structure and properties of surfactant protein B.** Biochim. Biophys. Acta, 1998.

HALLIDAY, H.L. **Surfactants: past, present and future.** J Perinatol, 2008.

HANNA, N. **Sepsis and septic shock.** Topics in Emergency Medicine. Advanced Emergency Nursing Journal, 2003.

HENRY, M.D.; IKEGAMI, M.; UEDA, T.; JOBE, A. **Surfactant protein B metabolism in newborn rabbits.** Biochem Biophys Acta, 1996.

HERZOG, E.L.; BRODY, A.R.; COLBY, T.V.; MASON, R.; WILLIAMS, M.C. **Knowns and unknowns of the alveolus.** Proc. Am. Thorac. Soc, 2008.

- HOROWITZ, S.; WATKINS, R.H.; AUTEN, R.L.; MERCIER, C.E.; CHENG, E.R.Y. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*, 1991.
- IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. **Surfactant metabolism**. Sem. in Perinatology, 1993.
- INSTITUTO latino americano da sepse. O que é sepse. 2017
<http://www.sepsisnet.org/pg.php?v=o-que-e-sepse>
- JANGA, H.; CASSIDY, L.; WANG, F.; SPENGLER, D.; OESTERN-FITSCHEN, S.; KRAUSE, M.F.; SEEKAMP, A.; THOLEY, A.; FUCHS, S. **Site-Specific and Endothelial-Mediated Dysfunction of the Alveolar-Capillary Barrier in Response to Lipopolysaccharides**. *J. Cell. Mol. Med*, 2018.
- JOBIN, C.; BRADHAM, C.A.; RUSSO, M.P.; JUMA, B.; NARULA, A.S.; BRENNER, D.A.; SARTOR, R.B. **Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity**. *J Immunol*, 1999.
- JONES, D. P. **Radical-free biology of oxidative stress**. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2008.
- JOHNSON, E.R.; MATTHAY, M.A. **Acute lung injury: Epidemiology, pathogenesis, and treatment**. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv*, 2010.
- JOHANSSON, J.; GUSTAFSSON, M.; PALMBLAD, M.; ZALTASH, S.; ROBERTSON, B.; CURSTEDT, T. **Synthetic surfactant protein analogues**. *Neonatology*, 1998.
- JUNQUEIRA, L.C. U. E CARNEIRO, J. **Histologia básica** - [12. ed]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity**. *Annu Rev Immunol*, 2000.
- KELLER, G.A.; BARKE, R.; HARTY, J.T.; HUMPHREY, E.; SIMMONS, R.L. **Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. Predisposition of hepatocytes to oxidative stress: An experimental approach**. *Arch Surg*, 1985.
- KHARAZMI, A.; NIELSEN, H.; SCHIOTZ, P.O. **N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism**. *Int J Immunopharmacol*, 1988.
- KING, R.J.; KLASS, D.J.; GIKAS, E.G.; CLEMENTS, J.A. **Isolation of apoproteins from canine surface active material**. *Am. J. Physiol*, 1973.
- KOPINCOVA, J.; CALKOVSKA, A. **Meconium-induced inflammation and surfactant inactivation: specifics of molecular mechanisms**. *Pediatr. Res*, 2016.
- LIN, S.; PHILLIPS, K.S.; WILDER, M.R.; WEAVER, T.E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996.

- LOPEZ-RODRIGUEZ, E. ; PÉREZ-GIL, J. **Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy.** Biochimica et Biophysica Acta, 2014.
- LOPEZ, E.; GASCOIN, G.; FLAMANT, C.; MERHI, M.; TOURNEUX, P.; BAUD, O.; FRENCH YOUNG, C. **Neonatologist, Exogenous surfactant therapy in 2013: what is next? Who, when and how should we treat newborn infants in the future?** BMC Pediatr, 2013.
- LOSA, D.; CHANSON, M. **The Lung Communication Network.** Cell. Mol. Life Sci, 2015.
- LYONS, J.; RAUH-PFEIFFER, A.; MING-YU, Y.; LU, X.M.; ZURAKOWSKI D. C. M.; et al. **Cystein metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients.** Crit Care Med, 2001.
- MADHU, C. L.; NITYA, N. P.; JUBEDA, B.; VENKANNA, B.; RAFIA A. B.; MAHENDRA, R.; DHIRENDRA K. DINESH K.; SURENDRA, K. T. **Betulinic acid negates oxidative lung injury in surgical sepsis model.** Journal of surgical research, 2015.
- MAHONEY, A.D.; JAIN, L. **Respiratory disorders in moderately preterm, late preterm and early term infants.** Clin. Perinatol, 2013.
- MASON, R.J. **Biology of Alveolar Type II Cells.** Respiriology, 2006.
- MARY, K.; DAHMER, O'CAIN, P.; PATWARI, P.P.; SIMPSON, P.; LI, S.; NADINE HALLIGAN, N.; QUASNEY M.W. **The influence of genetic variation in surfactant protein B on severe lung injury in African American children.** Crit Care Med, 2011.
- MERRILL, D.J.; BALLARD, R.A.; CNAAN, A.; HIBBS, A.M.; GODINEZ, R.I.; GODINEZ, M.H.; TRUOG, W.E.; BALLARD. P.L. **Dysfunction of Pulmonary Surfactant in Chronically Ventilated Premature Infants.** Pediatr Res, 2004.
- MELTON, K. R.; NESSLEIN, L. L.; WEAVER, T. E. **SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice.** Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol, 2003.
- MEO, S. D.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. **Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016.
- MINGARRO, I.; LUKOVIC, D.; VILAR, M.; PEREZ-GIL, J. **Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends.** Curr. Med. Chem, 2008.
- MUSCEDERE, J.G.; MULLEN, J.B.; GAN, K.; SLUTSKY, A.S. **Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury.** Am. J. Respir. Crit. Care Med, 1994.
- NETEA, M. G. et al. **Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing?** Trends Immunol, 2003.
- NOGEE, L.M.; DEMELLO, D.E.; DEHNER, L.P.; COLTEN, H.R. N. **Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis.** Engl. J. Med, 1993.

NOGEE, L.M.; GARNIER, G.; DIETZ, H.C.; SINGER, L.; MURPHY, A.M.; DEMELLO, D.E.; COLTEN, H.R. *J.Clin. Invest.* 93 1860-1863, 1994 .

OLMEDA, B.; MARTINEZ-CALLE, M.; PEREZ-GIL, J. **Pulmonary surfactant metabolism in the balveolar airspace: biogenesis, extracellular conversions, recycling.** *Ann. Anat*, 2017.

OPAL, S. M. **The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis.** *Int J Med Microbiol*, 2007.

O'REILLY, M.A.; WEAVER, T.E.; PILOT-MATIAS, T.J.; SARIN, V.K.; GAZDAR, A.F.; WHITSETT, J.A. *Biochim. Biophys. Acta* , 1989.

OKA, S.; KAMATA, H.; KAMATA, K.; YAGISAWA, H.; HIRATA, H. **Nacetylcysteine suppresses TNF-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB kinases.** *FEBS Lett* 2000

PADKIN, A.; GOLDFRAD, C.; BRADY, A.R.; YOUNG, D.; BLACK, N.; ROWAN, K. **Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland.** *Crit Care Med*, 2003.

PARRA, E.; PEREZ-GIL, J. **Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films.** *Chem. Phys. Lipids*, 2015.

PARSONS, D.W.; WANG, T.L.; SAMUELS, Y.; BARDELLI, A.; CUMMINS, J.M.; DELONG, L.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; WILLSON, J.K.; MARKOWITZ, S.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C.; VELCULESCU, V.E. **Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway.** *Nature*, 2005.

PÉ REZ-GIL, J.; CASALS, C.; MARSH, D. **Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy.** *Biochemistry*, 1995.

PEREZ, M.C.A. **Epidemiologia, diagnóstico, marcadores de imunocompetência e prognóstico da sepse** [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.

PÉ REZ-GIL, J.; LOPEZ-RODRIGUEZ ,E. **Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes:From biophysics to therapy.** *Biochimica et Biophysica Acta* ,2014.

PERCARIO, S.; NAUFAL, A.S.; GENNARI, M.S.; GENNARI, J.L. **Antioxidant activity of edible blushing wood mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (Agaricomycetidae) in vitro.** *Int J Med Mushr.* 2009.

PEREIRA JÚNIOR, G.AMARSON, F.; ABEID, M; OSTINI, F.MSOUSA, S.HBASILE-FILHO. A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. *Medicina Ribeirão Preto*. V.31: 349-362, 1998.

PHIZACKERLEY, P.J.; TOWN, M.H.; NEWMAN, G.E. *Biochem*, 1979.

PHILIP, L.; BALLARD, L.W., GONZALES, R.I.; GODINEZ, M. H.; GODINEZ, R.C.S.; DONALD, C.; MCCURNIN, L. L.; GIBSON, B. A.; YODER, J. D.; KEREKMAN, P.H. G.; SHAUL, P.W. **Surfactant Composition and Function in a Primate Model of Infant Chronic Lung Disease: Effects of Inhaled Nitric Oxide.** *Pediatr Res*, 2006.

POSSMAYER, F. **A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-associated Proteins.** *Am. Rev. Respir. Dis*, 1988.

POULAIN, F.R.; NIR, S.; HAWGOOD, S. *Biochim. Biophys. Acta* , 1996.

PODEROSO, J. J.; CARRERAS, M. C.; LISDERO, C.; RIOBO, N. ; SCHOPFER, F.; BOVERIS. A. **Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1996.

RAVANI, R.R.; GODINEZ, R.I.; GODINEZ, M.H.; WENTZ, E.; ZAMAN, A.; CUI, Z.; POOLER, P.M.; GUTTENTAG, S.H.; BEERS, M.F.; GONZALES, L.W.; . BALLARD. P.L. **Respiratory distress after intratracheal bleomycin: selective deficiency of surfactant proteins B and C.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001.

REUTER, S.; MOSER, C.; BAACK, M. **Respiratory distress in the newborn.** *Pediatr. Rev*, 2015.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. **Harmful molecular mechanisms in sepsis.** *Nat Rev Immunol*, 2008.

RICHARD, C.; LEMONNIER, F.; THIBAUT, M.; COUTURIER, M.; AUZEPY, P. **Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome.** *Crit. Care Med*, 1990.

RIDER, E.D.; IKEGAMI, M.; WHITSETT, J.A.; HULL, W.; ABSOLOM, D.; JOBE, A.H. **Treatment responses to surfactant containing natural surfactant protein in preterm rabbits.** *Am Rev Respir Dis*, 1993.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, S.M. ; FLIERL, M.A. ; WARD, P.A. **Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture.** *Nature*, 2009.

ROSS, S. D. et al. **Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor- κ B.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000.

ROSS, M.; KROL, S.; GALLA, H. J. **Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C.** *Eur. Biophys. J*, 2002.

ROBINSON, J. M.; BADWEY, J. A. **“Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes,”** *Immunology Series*, 1994.

RYAN, M. A; QI, X.; WEAVER, T. E. **Mapping and analysis of the lytic and fusogenic domains of surfactant protein B.** *Biochemistry*, 2005.

SARKER, M.; WARING, A.J.; WALTHER, F.J.; KEOUGH, K.M.; BOOTH, V. **Structure of mini-B, a functional fragment of surfactant protein B, in detergent micelles.** Biochemistry, 2007.

SALES JÚNIOR, J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S. et al. **Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras.** Rev Bras Ter Intensiva, 2006.

SCHMIDT, H.; SCHMIDT, W.; MÜLLER, T.; BÖHRER, H.; GEBHARD, M.M.; MARTIN, E. **N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo.** Crit Care Med 1997;

SCHÜRCH, D.; OSPINA, O.L.; CRUZ, A.; PÉREZ-GIL, J. **Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films.** Biophys. J, 2010.

SERNA, B.L. J.; VARGAS, R.; PICARDI, V.; CRUZ, A.; ARRANZ, R.; VALPUESTA, J.M.; MATEU, L.; PEREZ-GIL, J. **Segregated ordered lipid phases and protein-promoted membrane cohesivity are required for pulmonary surfactant films to stabilize and protect the respiratory surface.** Faraday Discuss, 2013.

SEONG, S. Y.; MATZINGER P. **Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses.** Nat Rev Immunol, 2004.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; ALBUQUERQUE, V.S.; MADALONFRAGA, R.; ALEKSANDROWICZ, A.M.C.; GELLER, M. **Ensino de imunologia na educação médica: lições de Akira Kurosawa.** Rev Bras Educ Med, 2009.

SILVA, E.; PEDRO, M.D.E.A.; SOGAYAR, A.C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R.G.E.; SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J.D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P.C.; DE MATOS, G.F.; BENTO, A.M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P.C.; KNOBEL, E. **Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study).** Crit Care, 2004.

SINGH, N.; HALLIDAY, H.L.; STEVENS, T.P.; **Comparison of animal-derived surfactants for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants.** Cochrane Database Syst. Rev, 2015.

SIMONATO, M.; BARITUSSIO, A.; ORI, C.; VEDOVELLI, L.; ROSSI, S.; DALLA, M.L.; RIZZI, S.; CARNIELLI, V.P.; COGO, P.E. **Disaturated-phosphatidylcholine and surfactante protein-B turnover in human acute lung injury and in control patients.** Respir Res, 2011.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; LIMA, L.C.; VITORINO, R.R.; ALVAREZ, M.C.; PEREZ, MENDONÇA, E.G; OLIVEIRA, M.G.A; GELLER, A. **Sepse: atualidades e perspectivas.** Rev Bras Ter Intensiva, 2011.

SOGAYAR, A.M.; MACHADO, F.R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A.; GRION, C.M.; LOBO, S.M.; TURA, B.R.; SILVA, C.L.; CAL, R.G.; BEER, I.; MICHELS, V.; SAFI, J.; KAYATH,

M.; SILVA, E. **Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. COSTS - A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units.** Pharmacoeconomics, 2008.

SPRAGG, R.G.; LEWIS, J.F.; WALMRATH, H.-D.; JOHANNIGMAN, J.; BELLINGAN, G.; LATERRE P.-F.; WITTE, M.C.; RICHARDS, G.A.; RIPPIN, G.; RATHGEB, F. **Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome.** N. Engl. J. Med, 2004.

STAHLMAN, M. T.; GRAY, M. P.; WEAVER, T. E. **Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice.** Lab. Invest, 2000.

STEINBERG, K .P. et al. **Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med, 2006.

SWEET, D.G.; CARNIELLI, V.; GREISEN, G.; HALLMAN, M.; OZEK, E.; PLAVKA, R.; SAUGSTAD, O.D.; SIMEONI, U.; SPEER, C.P.; VENTO, M.; HALLIDAY, H.L. **European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants.** Neonatology, 2013.

TANAKA, Y.; TAKEI, T.; KANAZAWA, L. **Lung surfactants. II. Effects of fatty acids, triacylglycerols and protein on the activity of lung surfactant.** Chem Pharm Bull, 1983.

TAKAHASHI, A.; FUJIWARA, T. **Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function.** Biochem. Biophys. Res. Commun, 1986.

THAMMANOMAI, A.; MAJUMDAR, A.; BARTOLA ´K-SUKI, E.; SUKI. B. **Effects of reduced tidal volume ventilation on pulmonary function in mice before and after acute lung injury.** J Appl Physiol, 2007.

TYML, K.; LI, F.; WILSON, J.X. **Delayed ascorbate bolus protects against maldistribution of microvascular blood flow in septic rat skeletal muscle.** Crit Care Med, 2005.

VELDHUIZEN, R.; NAG, K.; POSSMAYER, F. **The role of lipids in pulmonary surfactant.** Biochim. Biophys. Acta, 1998.

VILLA, P.; GHEZZI, P. **Effect of N-acetyl-L-cysteine on sepsis in mice.** Eur. J. Pharmacol, 1995.

VORBROKER, D.K.; VOORHOUT, W.F.; WEAVER, T.E.; WHIT-SETT, J.A.; Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol, 1995.

VOORHOUT, W.F.; VEENENDAAL, T.; HAAGSMAN, H.P.; WEAVER, T.E.; WHITSETT, J.A.; VAN GOLDE, L.M.G.; GEUZE, H.J Am. J. Physiol, 1992.

VON DESSAUER, B.; BONGAIN, J.; MOLINA, V.; QUILODRAN, J. CASTILLO, R. RODRIGO, R. **Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management.** J Crit Care, 2011.

WARING, A.; WALTHER, F.; GORDON, L.; HERNANDEZ-JUVIEL, J.; HONG, T.; SHERMAN, M.; ALONSO, C.; ALIG, T.; BRAUN, A.; BACON, D. **The role of charged amphipathic helices in the structure and function of surfactant protein B.** J. Pept. Res, 2005.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. **The acute respiratory distress syndrome.** N Engl J Med, 2000.

WEAVER, T.E.; LIN, S.; BOGUCKI, B.; DEY, C. **Processing of surfactant protein B proprotein by a cathepsin D-like protease.** Am. J. Physiol, 1992.

WEAVER, T. E. **Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C.** Biochimica et Biophysica Acta, 1998.

WEAVER, T.E.; WHITSETT, J.A. Am. J. Physiol, 1989.

WIKENHEISER, K.A.; WERT, S.E.; WISPE, J.R.; STAHLMAN, M.; DAMORE-BRUNO, M.; SINGH, G. KATYAL, S.L.; WHITSETT, J.A Am. J.Physiol, 1992.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. **Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal.** J. Surg. Res, 1980.

WILLSON,D.F.; NOTTER,R.H. **The future of exogenous surfactant therapy.** Respir. Care, 2011.

WILLIAM, F.; MARSHALL, M.D.;ANIS, E.;BLAIR, M.D. **The Cephalosporins.**Mayo Clin Proc, 1999.

WEAVER, T. E.; . WHITSETT, J. A.. **Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins.** Biochem. J. 1991.

YAMANAKA, N., KOBAYASHI, K., KUROKI, Y., KATAURA, A., AKINO, T. **Implication of Surfactant Apoprotein in Otitis Media with Effusion.** Annals of Otology, Rhinology & Laryngology,1991.

YONGAN, X.U.; LIN, G.E.; ABDEL-RAZEK,O.; JAIN, S.; LIU, Z.; HONG, Y.; NIEMAN, G.; JOHNSON, F.; GOLUB,L.M.J.J.; COONEY, R.N.; WANG, E.G. **differential susceptibility of human sp-b genetic variants on lung injury caused by bacterial pneumonia and the effect of a chemically modified curcumin.** Shock, 2016.

ZHANG, Y.; GU, Y.; LEE, H.M.; HAMBARDJIEVA, E.; VRANKOVA, K.; GOLUB, L.M.; JOHNSON, F. **Design, synthesis and biological activity of new polyenolic inhibitors of matrix metalloproteinases: a focus on chemically-modified curcumins.** Curr Med Chem, 2012.

ZHANG, G.; GHOSH, S. **Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity.** J Clin Invest, 2001.

ZHANG, J., WANG, X.; VIKASH, V.et al., **ROS and ROS-mediated cellular signaling.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 01 de setembro de 2017.

Ofício nº 92/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.^a **Maria Bernadete de Sousa Maia**

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Centro de Biociências

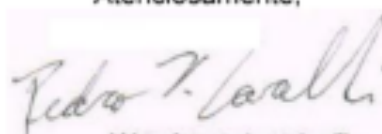
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.027592/2017-85**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação histopatológica e da expressão da proteína surfactante tipo-B no pulmão de ratos Wistar submetidos à sepse**”, registrada com o nº **23076.027592/2017-85**, sob a responsabilidade de Prof.^a **Maria Bernadete de Sousa Maia** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017 a 28/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	90
Peso/Idade	300-350g/2-3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos – CB/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584