

**Ministério da Educação
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG**

MARIA ÂNGELA RODRIGUES

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR SEPSE EM RATOS COM
HIPERPROLACTINEMIA**

Alfenas/MG

2011

MARIA ÂNGELA RODRIGUES

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR SEPSE EM RATOS COM
HIPERPROLACTINEMIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

Alfenas/MG

2011

MARIA ÂNGELA RODRIGUES

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR SEPSE EM RATOS COM
HIPERPROLACTINEMIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

Aprovada em: ____/____/____

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Dedico aos meus pais, Totti e Isaura, que me ensinaram que o amor, sustenta a nossa existência. Saudades

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu amigo, sempre.

Aos meus pais, Totti e Isaura, que de maneiras diferentes, me deixaram o exemplo de vida como meu melhor presente.

A minha irmã Guiomar, pelo apóio.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva, pela orientação neste trabalho, mas acima de tudo, pelo ensino sempre eficiente, incentivo ao desenvolvimento científico, pela tolerância, e pela força nos momentos difíceis.

A Professora Dra. Estela Regina Oliveira, pelo carinho, e pela contribuição intelectual nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira, que foi paciente na minha ausência durante as atividades do laboratório de Patologia.

Ao Pós Doutorando do laboratório de Fisiologia Alexandre Vieira, pela amizade, pelo apóio nos experimentos.

A estagiária Amanda Esteves Rocha, pelo apóio dado durante a minha ausência no laboratório de patologia.

A Universidade Federal de Alfenas pelo suporte necessário para a realização dos meus experimentos.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela iniciativa inovadora, em qualificar e proporcionar aos profissionais o desenvolvimento intelectual e científico.

Aos amigos da Pós-Graduação, Luciana Costa Teodoro, Fabiana Cardoso Vilela, Michael Brian Santiago, Bruno Zavan, Ana Laura Oliveira de Carvalho Obrigada, pelo apóio, e amizade.

Aos técnicos do laboratório de fisiologia José dos Reis Pereira e Marina de Fátima Venâncio, pela amizade e apóio dado durante meus experimentos.

Aos Professores do laboratório de fisiologia: Roseli Soncini, Carina Aparecida Fabrício de Andrade, Carlos Giovani Oliveira Nascimento, Jalile Amim Naves Ventura, pela amizade e ótima convivência.

A todos aquele que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A sepse é caracterizada por ser um processo inflamatório sistêmico devido a uma infecção, levando a lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo e a falência múltipla dos órgãos. São achados histopatológicos da sepse: edema intersticial e alveolar, acúmulo de neutrófilos e macrófagos, hemorragia, lesão endotelial e do epitélio alveolar, e colapso alveolar. Acredita-se que a prolactina, hormônio produzido nas células lactotróficas da hipófise interfira no processo inflamatório, ora estimulando-o, ora inibindo-o. Além da relação direta com a lactação, este hormônio tem sido considerado um importante modulador do sistema imune, estimulando a proliferação e a sobrevivência celular. No presente estudo, buscou-se determinar os aspectos morfofuncionais do pulmão comprometido pela sepse induzida pela ligação e perfuração do ceco (CLP) em ratos com hiperprolactinemia induzida por sulpiride, um antagonista da dopamina. O presente estudo mostrou que os ratos pré-tratados com salina e submetidos a CLP, desenvolveram o padrão morfológico da sepse como por exemplo, aumento nas células inflamatórias com predomínio dos polimorfonucleares (neutrófilos), edema intersticial e colapso alveolar. Além disso, o presente estudo mostrou que a sepse induzida por CLP produziu diminuição da pressão arterial média bem como queda em alguns parâmetros ventilatórios como por exemplo, volume corrente e volume pulmonar em ratos não anestesiados. Interessante observação foi que grupos de ratos pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP apresentaram um maior comprometimento nos achados morfológicos bem como uma potencialização na queda do volume corrente durante a análise ventilatória. O presente estudo sugere que a hiperprolactinemia deve ser atentamente observada, pela estreita relação com o agravamento do processo inflamatório provocado por uma infecção pré-existente, que resultaria no aumento do número de óbitos em pacientes sépticos.

Palavras-chave: Sepse. Testes funcionais dos pulmões. Prolactina. morfologia.

ABSTRACT

Sepsis is characterized as a systemic inflammatory process due to an infection, leading to acute lung injury, acute respiratory distress syndrome and multiple organs failure. Histopathological findings of sepsis are: interstitial and alveolar edema, accumulation of neutrophils and macrophages, hemorrhage, endothelial and alveolar epithelial injury and alveolar collapse. It is believed that prolactin, a hormone produced by pituitary lactotroph cells, interferes on the inflammatory process, sometimes stimulating it and sometimes inhibiting it. In addition to the direct relationship on lactation, this hormone has been observed to play important role on the modulation of the immune system, stimulating the cell proliferation and cell survival. In the present study, we sought to determine the morphofunctional aspects of compromised lung during sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP) in rats with hyperprolactinemia induced by sulpiride, a dopamine antagonist. The present study showed that pretreated rats with saline and subjected to CLP developed the morphological pattern of sepsis such as increase in inflammatory cells with predominance of polymorphonuclear cells, interstitial edema and alveolar collapse. In addition, this study showed that sepsis induced by CLP produced a decrease in mean arterial pressure and decrease in ventilatory parameters such as tidal and pulmonary volume in unanesthetized rats. An interesting observation was that pretreated rats with sulpiride and subjected to CLP had a greater impairment in the morphological findings as well as an increase in the fall of the tidal volume during the ventilation analysis. The present study suggests that the hyperprolactinemia should be closely observed by a close relationship with the worsening of the inflammatory process caused by a pre-existing infection, which would result in increasing the number of deaths in septic patients.

Keywords: Sepsis. Functional test lungs. Prolactin. Morphology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Animais utilizados	19
3.2	Delineamento do experimento	19
3.3	Modelo experimental de sepse	21
3.3.1	Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	21
3.3.2	Cirurgia fictícia (CF).....	21
3.4	Coleta do sangue para análise hormonal	22
3.5	Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)	23
3.6	Coleta do pulmão para avaliação do edema pulmonar	23
3.7	Avaliação invasiva da pressão arterial	24
3.8	Coleta do pulmão para análise histopatológica, morfométrica e da celularidade	24
3.8.1	Processamento histológico para microscopia dos pulmões.....	24
3.9	Quantificação dos parâmetros morfométricos e da celularidade	25
3.9.1	Análise morfométrica.....	25
3.9.2	Análise da celularidade.....	26
3.9.3	Análise histopatológica.....	26
3.10	Ventilação Pulmonar	26
3.11	Análise estatística	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Análise da dosagem da prolactina (ng/ml)	29
4.2	Contagem do número de células no lavado broncoalveolar (LBA)	30
4.3	Análise do edema pulmonar	31
4.4	Análise da pressão arterial	32
4.5	Análise morfométrica	33
4.6	Análise da celularidade	34
4.7	Análise histopatológica	35
4.7.1	Animais pré-tratados com salina e sulpiride, submetidos a cirurgia fictícia (CF) e sacrificados em 6 horas.....	35
4.7.2	Animais pré-tratados com salina e sulpiride, submetidos a CLP e sacrificados em 6 horas.....	35
4.7.3	Animais pré-tratados com salina e sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia (CF) e sacrificados em 24 horas.....	37
4.7.4	Animais pré-tratados com salina e sulpiride e submetidos a CLP e sacrificados em 24 horas.....	37
4.8	Análise da ventilação	39
4.8.1	Volume corrente (ml/Kg).....	39
4.8.2	Volume pulmonar (ml/Kg/min).....	40
4.8.3	Frequência respiratória (ciclos/min).....	41
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) comprometeram por volta de 200.000 pacientes nos Estados Unidos durante o ano de 2005, com uma mortalidade de aproximadamente 40% (RUBENFELD et al., 2005).

A Conferência de Consenso Americano/Europeu de 1994 recomendou a definição padrão da LPA e da SDRA, que vem sendo utilizada deste então. Nesta definição, o paciente com LPA apresenta infiltrado inflamatório bilateral, com hipoxemia arterial, causada pelo acúmulo de líquido nos espaços aéreos (edema) e diminuição da hematose.

De acordo com Bernard et al. (1994) a deficiência na troca gasosa gera um aumento na concentração maior de dióxido de carbono no sangue, que conseqüentemente aumenta a freqüência respiratória, a ventilação por minuto e o trabalho da respiração.

Para Ashbaugh et al. (1967) a LPA e a SDRA é caracterizada também pela redução da complacência pulmonar, o que agrava a insuficiência respiratória aguda, especialmente em pacientes com sepse (MARTIN et al., 2001), condição esta, caracterizada como sendo uma resposta inflamatória sistêmica devido a uma infecção (BONE et al., 1992). Um dos principais fatores de risco para LPA e a SDRA é a sepse (BERNARD et al., 1994).

Durante a sepse ocorre a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (*systemic inflammatory response syndrome - SIRS*) com liberação sistêmica de citocinas e outros mediadores químicos, o que resulta em disfunção de órgãos e sistemas. A *SIRS* representa o desfecho de uma infecção persistente e lesão tecidual grave onde o pulmão é o mais afetado (HEADLEY; TOLLEY; MEDURI 1997). De acordo com Bernard et al. (1992) o dano alveolar difuso é uma reação inespecífica dos pulmões a uma variedade de afecções.

Os principais mediadores químicos liberados durante a sepse são: o fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas IL-1 β e IL-6. A IL-1 β ativa neutrófilos e controla o aumento na regulação das moléculas de adesão dos leucócitos no endotélio e estimula a produção da enzima óxido nítrico sintetase induzida pelas

células do endotélio que contribui para um efeito vasodilatador característico do choque séptico (KOBAYASHI et al., 1998). A IL-6 induz a ativação das células T e a quimiotaxia dos neutrófilos (YEH et al., 2005).

Um modelo bem descrito da fisiopatologia da SDRA é uma forma de inflamação aguda no pulmão mediada por neutrófilos, com atuação de citocinas e indução de estresse oxidativo (DEMLING, 1995).

Para Burrows e Edwards (1970) e Capelozzi (2008), o achado histopatológico presente na SDRA, é caracterizado por lesão de células epiteliais e endoteliais do pulmão, edema pulmonar, formação de membrana hialina, organização de fibrose intersticial e proliferação de pneumócitos tipo II.

Segundo Bernard et al. (1994), Rocco e Zin (2005), duas vias etiopatogênicas podem levar ao desenvolvimento de LPA e a SDRA. A primeira via se dá pela lesão inicial no epitélio pulmonar e a segunda, resulta da resposta inflamatória sistêmica e lesão do endotélio alveolar.

A agressão direta no epitélio pulmonar acarreta na ativação de uma cascata inflamatória com aumento da permeabilidade da membrana alveolar-capilar e formação de edema intersticial (ROCCO; ZIN, 2005). Na agressão indireta, o pulmão é atingido secundariamente pela ação de mediadores químicos liberados de um foco extrapulmonar, resultando em lesão das células endoteliais, causando um aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de monócitos, linfócitos, neutrófilos, plaquetas e outras células, além de hiperemia e edema intersticial (PELOSI; CAIRONI; GATTINONI, 2001; ROCCO; ZIN, 2005).

Depressão acentuada da resposta imunológica mediada por células é, com frequência, observada em pacientes com trauma grave (PAPE et al., 1999). O trauma contribui para uma subsequente sepse ou falência múltipla de órgãos (FMO) (BAKER et al., 1994), que são as principais causas de morte nos processos cirúrgicos na unidade de cuidados intensivos (WAYDHAS et al., 1992). O mecanismo fundamental no qual o trauma induz imunossupressão não é bem entendido, apesar do considerável progresso no tratamento de sepse e MOF, ainda existem falhas na estratégia terapêutica (AYALA et al., 1994).

Acumulo de neutrófilos desempenha um papel central na patogênese da sepse na fase aguda pulmonar (GUO et al., 2006). De acordo com os autores Katzenstein et al., (1976), Teplitz (1976), Snyder et al., (1990) e Meduri (1996), a

fase exsudativa é caracterizada por congestão capilar, edema intersticial e alveolar e hemorragia intra-alveolar, acompanhada da presença de neutrófilos e macrófagos.

Neutrófilos são as principais células da resposta imune inata e apresentam um papel crítico na defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos. O número de neutrófilos no lavado broncoalveolar em pacientes com (SDRA) é significativamente aumentado e associado com menor sobrevida (WEILAND et al., 1986).

Na inflamação, o acúmulo de neutrófilos pode exercer dois resultados significantes: remoção do microorganismo invasor e danos nos tecidos. A lesão tecidual parece relacionar-se com a liberação de proteases e radicais livres derivados da ativação de neutrófilos. Proteases e radicais livres gerados na inflamação contribuem para a lesão no endotélio, que é característica da SDRA. Citocinas e quimiocinas aumentam a resposta inflamatória de fase aguda. Embora o recrutamento de neutrófilos para o pulmão seja essencial para a resposta de defesa do hospedeiro, eles são prejudiciais quando em desequilíbrio (GUO et al., 2002).

Prolactina é um hormônio polipeptídico sintetizado e secretado na parte anterior da glândula hipófise, nas células denominadas de lactotrofos, que compreendem cerca de 25-50% do total de células hipofisárias e em outros tecidos e órgãos extra-hipofisário como: sistema nervoso central, placenta, glândula mamária, útero, células do sistema imune. A sua função não está limitada somente a reprodução, mas associa-se também com o controle da homeostase (FREEMAN et al., 2000).

Nos mamíferos o hipotálamo controla a secreção de prolactina na hipófise. Tanto inibindo, como também estimulando pela remoção da inibição (BEN-JONATHAN, 1985).

As vias comuns para o controle na inibição e estimulação na secreção da prolactina são os neurônios neuroendócrinos que produzem os fatores de inibição da prolactina (PIF) como a dopamina (DA), somatostatina (SST), e ácido g-aminobutírico (GABA), ou fatores de liberação de prolactina (PRF), como o hormônio liberador de tirotropina (TRH), ocitocina (OT), e neurotensina (NT). Os (PIF) e (PRF) dos neurônios neuroendócrino são lançados na veia porta eminência mediana e atingem os lactotrófos da hipófise anterior. A dopamina hipotalâmica é o principal

(PIF) fisiológica. Os receptores de dopamina (D_2) encontram-se et al., nas membranas das células lactotróficas da glândula hipófise. (CARON, 1978).

Está bem estabelecido que a secreção da prolactina é regulada pelo hipotálamo através do mecanismo de feedback (MILENKOVIC; PARLOW, 1990). Elevação do nível de prolactina aumenta síntese de dopamina hipotalâmica (DEMAREST et al., 1985) e a concentração de dopamina na veia porta hipotálamo-hipófise (GUDELSKY; PORTER, 1980). Tal efeito pode ser confirmado nas condições de hipofisectomia e pela bromocriptina, um agonista da dopamina, com queda dos níveis sanguíneos de prolactina (DEMAREST et al., 1985).

O TRH foi originalmente isolado como um fator hipofisiotrópico que estimula secreção do hormônio estimulante da tireóide (TSH) nas células lactotrofos da hipófise anterior (SCHALLY et al., 1966). Estudos posteriores mostraram que TRH estimula a liberação dose dependente de prolactina nos lactotrofos em modelos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BLAKE, 1974)

O aumento na concentração de prolactina é observado no estresse, gravidez, amamentação, epilepsia e com o uso de medicação (SULIMAN et al., 2000). Durante a gravidez, há um continuo aumento na concentração sérica de prolactina (10-20 ng-ml) para um nível maior que 200 ng-ml (KLETZKY et al., 1985).

Administração de opióides durante a anestesia geral pode rapidamente aumentar concentração de prolactina em pacientes, do nível normal (< 20 ng/ml) para 150-250 ng-ml (CROZIER et al., 1994). Semelhante elevação na concentração de prolactina tem sido demonstrada em pacientes que ingerem drogas neurolépticas (POLLOCK; McLAREN, 1998).

A secreção da prolactina é afetada por uma grande variedade de estímulos providos pelo ambiente. Os mais importantes estímulos fisiológicos que elevam a secreção de prolactina pela hipófise são: o aleitamento e aumento no nível de esteróides ovarianos, principalmente estrógeno (NEIL, 1970; DE GREEF et al., 1981; FREEMAN et al., 2000). Tais estímulos são transmitidos para o hipotálamo que permite a remoção da inibição e conseqüente secreção da prolactina. Sem esses estímulos, nos mamíferos, o controle exercido pelo hipotálamo sobre a secreção de prolactina pela hipófise é inibitório. A secreção de prolactina é também influenciada por regulação autócrina ou parácrina (BEM – JONATHAN, 1985).

A dopamina é o principal fator de inibição da secreção de prolactina. Produzida no hipotálamo, é liberada no sistema porta-hipofisária, atinge os receptores D2 presentes na membrana dos lactotrofos na hipófise anterior que determinam a inibição da secreção de prolactina (FREEMAN et al., 2000; BEN-JONATHAN; HNASKO, 2001). A inibição da secreção de prolactina por ativação dos receptores D2 está associada com a inibição do metabolismo da adenilato ciclase e do fosfato de inositol (FREEMAN et al., 2000; SIMMONDS, 1985). Estudos anteriores demonstraram que camundongo com o gene receptor D2 alterado, tem hiperprolactinemia e hiperplasia lactotrofos na hipófise anterior (FREEMAN et al., 2000; SAGRILLO; VOOGT, 1991).

O sulpiride é um antagonista da dopamina, o qual, apresenta uma massa molecular de 341,427 g/mol, de fórmula 5-(aminosulfonyl)-N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2-methoxybenzamide, sintetizado a partir de 5 aminosulfoácido salicílico, como indicado na Figura 1.

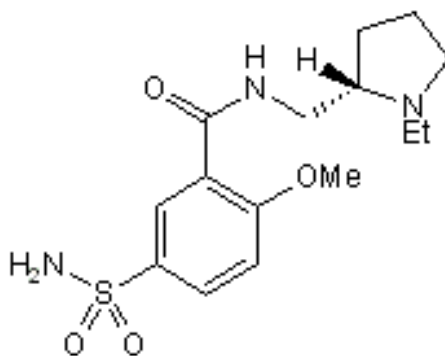


Figura 1. Síntese do sulpiride.

Fonte: <http://www.tocris.com/disprod.php?ItemId=1889>

O sulpiride é o princípio ativo de algumas drogas antipsicóticas usadas para tratar a esquizofrenia e outros transtornos psicóticos. As drogas antipsicóticas bloqueiam os receptores da dopamina D2 dos neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, que estão relacionados com sintomas psicóticos. Entretanto, os medicamentos antipsicóticos podem causar efeitos colaterais indesejáveis devido ao bloqueio desses receptores em regiões não-mesolímbicas, induzindo, como resposta, hiperprolactinemia (KAPUR; MAMO, 2003).

Em células lactótroficas da glândula pituitária anterior o sulpiride atua como antagonista da dopamina e influencia a secreção de prolactina (WIECK; HADDAD, 2003). Vários estudos têm mostrado que o tratamento com drogas que contêm sulpiride pode aumentar os níveis médios de prolactina em até dez vezes (MELTZER; FANG, 1976; GRUEN et al., 1978; KURUVILLA et al., 1992; BUSHE; SHAW, 2007).

Prolactina é um mediador da rede imunoneuroendócrina, onde os sistemas imune, nervoso e endócrino se intercomunicam (FREEMAN et al., 2000; GOFFIN., 1998) possuindo importante papel na regulação da resposta imune fisiológica, e nos estados patológicos, como as doenças auto-imunes (FREEMAN et al., 2000; BUSKILA; SHOENFELD, 1996; JETSCHMANN et al., 1997; BERCZI et al., 1997).

Níveis elevados de prolactina são observados em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico, Esclerose Múltipla, Artrite Reumatóide, Psorise, Artrite, AIDS, e em pacientes submetidos ao transplante de órgãos antes da rejeição. É sugerido que o aumento dos níveis de prolactina esteja associado ao agravamento das doenças auto-imune (KANIK; WILDER, 2000; JACOBI et al., 2001; WALKER, 2001). Bromocriptina pode suprimir as doenças autoimunes e causar anormalidades nas células T e NK em pacientes com hiperprolactinemia patológica (VIDALLER et al., 1992).

Sugere-se que os linfócitos podem ser uma fonte de produção de prolactina bem como a hipófise anterior (FREEMAN et al., 2000; GALA; SHEVACH, 1994). Células do sistema imune, timo e membranas dos linfócitos contêm mRNA para prolactina e liberam prolactina bioativa semelhante a prolactina da glândula hipófise (FREEMAN et al., 2000; DIMATTA et al., 1988).

Embora o controle da secreção da prolactina pela hipófise anterior seja diferente nos linfócitos, há evidência de que estas células apresentem receptores para dopamina que podem estar envolvidos na regulação da secreção e liberação de prolactina pelos mesmos (FREEMAN et al., 2000; DEVINS et al., 1992).

A liberação da prolactina pela glândula hipófise e células imune exerce influência sobre o sistema imune por mecanismo endócrino, parácrino e autócrino (MATERA, 1997), através da ligação do receptor específico da prolactina (PRL-R), expresso nas membranas de todas as células imune e hematopoiéticas (FEYSOT et al., 1998). Os receptores de prolactina pertencem a superfamília

citocinas/hematopoiéticas a qual incluem receptores para IL-2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 15 e Interferon (IFN). Agindo através de seu receptor, a prolactina modula a função do sistema imune estimulando a proliferação e a sobrevivência celular (COSMAM, 1993).

A prolactina estimula células T e B, células natural Killer (NK), macrófagos, neutrófilos, células hematopoiéticas e células dendríticas apresentadoras de antígeno (KOOIJMAN et al., 1996; DOGUSAN et al., 2001; MATERA et al., 2001).

Animais modificados geneticamente para o gene responsável pelo (PRL-R) receptor de prolactina não mostraram efeitos importantes para o desenvolvimento do sistema imune, ou seja, apresentaram células B, T, NK normais, bem como a resposta mitogênica, sugerindo que a prolactina não é essencial para o desenvolvimento e funções do sistema imunológico normal (BOUCHARD et al., 1999).

Ratos hipofisectomizados exibem marcada supressão das funções imunes que podem ser restauradas pela administração de prolactina (BERCZI; NAGY, 1991). Para compreender como a prolactina modula a proliferação das células T, foram clonados genes da linhagem celular de linfoma T de rato, o Nb₂, induzidos a proliferar pela ação da prolactina (YU-LEE et al., 1990). O Nb₂ das células T expressam um elevado número de receptores para prolactina mas somente 30% da ocupação da superfície PRL-R é necessária para obter uma resposta de máxima proliferação (GERTLER, 1997; GOUT et al., 1980).

A prolactina estimula a adesão dos leucócitos no endotélio, mediada pelas integrinas desempenhando relevante papel na resposta inflamatória (PÁVEL et al., 2005).

Estudos recentes mostram que a prolactina, assim como o estrógeno são protetores contra a inflamação em trauma grave (JARRAR et al., 2000; KNOFERL et al., 2000). O sexo parece influenciar na resposta ao trauma. Pacientes do sexo feminino sobrevivem mais do que pacientes do sexo masculino (MORRIS et al., 1990) apoiando a idéia que os hormônios femininos poderiam proteger contra complicações da sepse.

Pacientes do sexo masculino, ao contrário, apresentam maior sensibilidade para infecção relacionada com um alto nível citocinas pró-inflamatória tal como IL-6 (OFFER et al., 1996).

Existem controversas na ação da prolactina sobre o processo inflamatório, mostrando efeitos ora estimulatórios ora inibitórios. Alguns pesquisadores verificaram que uma acentuada hiperprolactinemia durante a inflamação sistêmica, diminuiria a sobrevivência e geraria uma profunda supressão das funções imunes (REINER et al., 2003). Por outro lado, René et al. (1995), baseados nas medidas das funções imunes dos linfócitos, sugeriram que a prolactina poderia ser útil no tratamento de choque hemorrágico que induz imunossupressão.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Verificar possíveis alterações nos aspectos morfofuncionais do pulmão durante a sepse induzida pela ligação e perfuração do ceco (CLP) em ratos com hiperprolactinemia induzida pelo sulpiride.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a lesão pulmonar aguda através da contagem de células no lavado broncoalveolar, do edema pulmonar, avaliação histológica, avaliação morfométrica, e avaliação da celularidade
- Analisar os parâmetros ventilatórios (Volume Corrente, Volume Pulmonar, Frequência Respiratória) durante a sepse

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Foram utilizados 48 ratos albinos Wistar, pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Os animais foram mantidos em sala climatizada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), em caixas de polipropileno, em no máximo 5 animais por caixa, com livre acesso à água e alimento, durante todo experimento, e em obediência ao ciclo circadiano de claro/escuro. Os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente de experimentação por sete dias. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Unifal-MG.

Os animais foram tratados com veículo (salina) ou sulpiride trinta minutos antes da cirurgia fictícia (CF) e da cirurgia ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Desta forma, temos os seguintes grupos experimentais:

- 1- Salina/CF
- 2- Salina/CLP
- 3- Sulpiride/CF
- 4- Sulpiride/CLP

3.2 Delineamento do experimento

Foram utilizados seis animais para cada grupo experimental e os diferentes parâmetros foram avaliados 6 ou 24 horas após a realização dos procedimentos cirúrgicos.

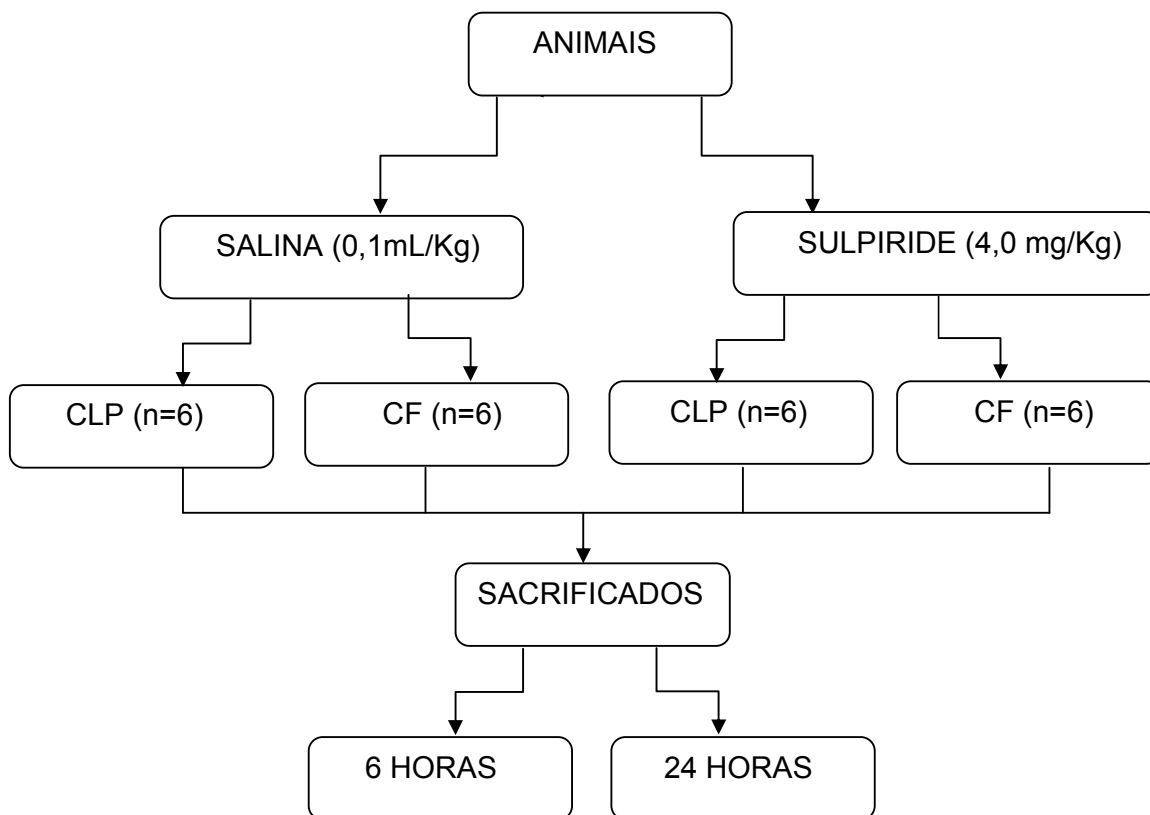


Figura 2 – Esquema de delineamento do experimento
 Fonte: Do autor

Os 6 animais de cada grupo foram submetidos às análises: hormonal; do lavado broncoalveolar; morfológica (alterações do tecido pulmonar e estudo da celularidade); morfométrica; da ventilação e da pressão arterial.

Todos os procedimentos foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia e de Patologia da UNIFAL-MG, com exceção da análise da dosagem hormonal, executada no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

3.3 Modelo experimental de sepse

3.3.1 Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A cirurgia de ligadura e perfuração do ceco foi realizada conforme descrito por Wichterman et al. (1980). Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE) (250 mg/Kg de peso corporal). Após a anestesia, a região abdominal foi depilada e feita a assepsia com álcool 70%, e realizada uma incisão de aproximadamente 2,5 centímetro na porção inferior ao abdômen. Primeiramente cortou-se a camada da pele e em seguida a camada muscular. O ceco foi retirado da cavidade abdominal e a luz intestinal foi reduzida por uma ligação acima da válvula íleo-cecal, para evitar a interrupção do trânsito intestinal. O ceco foi perfurado em locais avasculares, diferentes e próximos, por 10 vezes, com uma agulha de 18G, com o extravasamento de pequena quantidade do conteúdo cecal, após compressão. O segmento intestinal foi recolocado na cavidade abdominal e a incisão na camada da pele e muscular foi fechada com fio de Nylon 3.0. Todos os animais receberam 1,0 ml de NaCl (0,9 %) depois da cirurgia para reposição da volemia, e tiveram acesso a água e a ração.

3.3.2 Cirurgia fictícia (CF)

Os animais foram manipulados da mesma forma, exceto pela não realização da ligadura e da perfuração do ceco, de tal forma, que o órgão foi recolocado na cavidade abdominal seguido de sutura na camada da pele e muscular, com fio de Nylon 3.0. Todos os animais receberam 1,0 mL de NaCl (0,9%) após a cirurgia para reposição da volemia, e tiveram acesso a água e a ração.

3.4 Coleta do sangue para análise hormonal

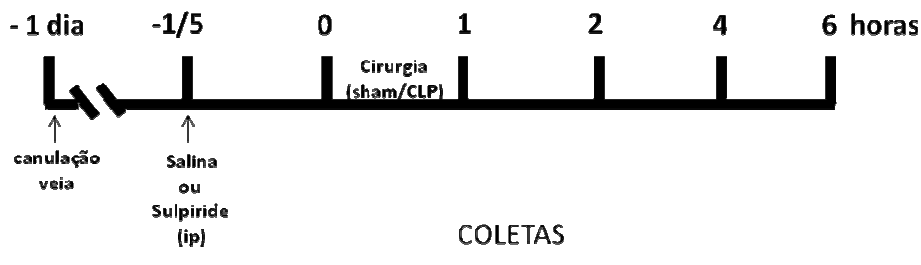
A veia jugular dos ratos foram canuladas 24 horas antes do início dos experimentos. Vinte quatro horas após a canulação, foi feita a primeira coleta e a mesma foi considerada como controle. Imediatamente após a primeira coleta, foi administrado via intraperitoneal (ip) salina ou sulpiride. Após meia hora dessa administração (salina ou sulpiride) foi realizada uma segunda coleta (ver tempo 0 no gráfico 1). Imediatamente após essa segunda coleta foi feita a cirurgia CLP para indução da sepse bem como a cirurgia fictícia. As outras coletas foram feitas após 1, 2, 4 e 6 horas da cirurgia (ver protocolo em linha abaixo). Após cada coleta do sangue, os animais receberam 1,0 ml de solução salina, para reposição do volume plasmático.

As amostras de sangue foram mantidas em tubos heparinizados e em seguida centrifugadas em 3000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. As alíquotas de plasma coletadas foram mantidas à - 20°C até o momento das dosagens de prolactina.

A dosagem hormonal de prolactina foi realizada pela técnica de radioimunoensaio.

Para a coleta de sangue os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE) (250 mg/Kg de peso corporal), para introdução de uma cânula na veia jugular, de onde foram retirados 300µL de sangue de cada animal dos quatro grupos: Salina/CF, Sulpiride/CF, Salina/CLP e Sulpiride/CLP.

Protocolo em linha



3.5 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)

Os animais (n=6 por grupo) foram anestesiados com (TBE) (250 mg/Kg de peso corporal) e submetidos a ligadura e perfuração do ceco CLP e a cirurgia fictícia CF.

Após 6 ou 24 horas das cirurgias os animais foram anestesiados e traqueostomizados para a coleta do LBA, como descrito por Tavares de Lima et al. (1998) e Bozinovski et al., (2004). Foi feita uma pequena incisão na região do pescoço para exposição da traquéia. Uma linha de nylon foi colocada abaixo da traqueia, facilitando assim sua exposição onde foi feita pequena incisão para introdução de cânula de polietileno até o pulmão. Uma seringa de plástico de 3,0 mL, contendo solução salina tamponada (PBS) estéril, a 37°C, foi adaptada nesta cânula para introdução do conteúdo.

Foram aspirados 3,0 mL do lavado broncoalveolar para coleta do exsudato inflamatório. O procedimento foi repetido por cinco vezes consecutivas, sendo que este volume total foi colocado em um ependorf. Logo em seguida o material foi centrifugado em 3000 rpm, a 4°C, por 15 minutos.

Para a contagem do número de células o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1,0 mL de PBS para análise da viabilidade celular. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer.

3.6 Coleta do pulmão para avaliação do edema pulmonar

Os animais (n=6 por grupo) foram anestesiados com (TBE) e submetidos a ligadura e perfuração do ceco CLP e a cirurgia fictícia CF.

Após 6 ou 24 horas os animais foram anestesiados com (TBE), e feita uma abertura no tórax para a retirada do pulmão esquerdo, que imediatamente foi pesado e transferidos para uma estufa à 80°C por 72 horas. A diferença de peso úmido/seco dos pulmões dos animais foi então determinada.

3.7 Avaliação invasiva da pressão arterial

Os animais (n=6 por grupo) foram anestesiados com (TBE) e submetidos a ligadura e perfuração do ceco (CLP) e a (CF) cirurgia fictícia.

Após 24 das cirurgias, os animais foram novamente anestesiados e foi introduzida uma cânula na femural contendo solução salina e heparina à 0,2%.

A medida da pressão arterial foi realizada através de um transdutor de pressão e um conversor analítico-digital (Biopac MP-100) acoplado a um computador.

3.8 Coleta do pulmão para análise histopatológica, morfométrica e da celularidade

Os animais (n=6 por grupo) foram anestesiados e submetidos a ligadura e perfuração do ceco (CLP) e a cirurgia fictícia (CF).

Após 6 e 24 horas do procedimento cirúrgico os animais foram novamente anestesiados para abertura do tórax e exposição do ventrículo direito, para realização de técnica de perfusão tecidual. A perfusão foi realizada utilizando seringa de 20 mL adaptada a uma agulha de gavagem e inserida no ventrículo direito, contendo inicialmente 20 mL de solução a 2% de soro fisiológico e heparina, e posteriormente, de 20 mL do fixador paraformaldeído (pH 7,4 à 0,1 M).

Logo em seguida o pulmão direito foi retirado, fixado em solução de paraformaldeído (pH 7,4 a 0,1M) e imediatamente levados para a câmara à vácuo por 20 minutos, para acelerar a penetração do fixador.

3.8.1 Processamento histológico para microscopia dos pulmões

Os fragmentos de pulmões foram processados rotineiramente (desidratados, diafanizados e incluídos em parafina). Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo rotativo manual da marca *Lupe*, em seis secções semi seriadas (1:10) com 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas para microscopia de luz (Olympus CX40), de acordo com

seus aspectos quantitativos (morfometria e celularidade) e qualitativos (análise histológica).

3.9 Quantificação dos parâmetros morfométricos e da celularidade

A análise morfométrica e a celularidade dos pulmões foram realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) segundo Weibel (1990), utilizando-se uma ocular, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostas em paralelo (Figura 3) acoplada ao microscópio de luz.

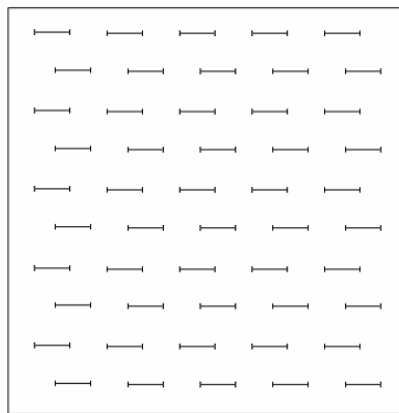


Figura 3 – Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos e de celularidade.

Fonte: WEIBEL, 1990

3.9.1 Análise morfométrica

Para quantificar a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes, por lâmina, em aumento de 200x, como descrito por Weibel (1990).

3.9.2 Análise da celularidade

Em um aumento de 1000x foram quantificados: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (PMN-neutrófilos) e mononucleares (MN- macrófagos, linfócitos), em dez campos aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que coincidem com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. Assim, o resultado foi apresentado como fração de área de tecido pulmonar. Os PMN e MN, foram quantificados os números de células presentes no septo alveolar, no espaço alveolar e o número total de cada tipo celular, bem como a celularidade total (PMN + MN).

3.9.3 Análise histopatológica

As lâminas da análise histopatológica foram observadas e descritas nos aumentos de 100x, 200x e 400x.

3.10 Ventilação Pulmonar

Seis animais de cada grupo foram anestesiados com (TBE) e submetidos a sepse através da ligadura e perfuração do ceco (CLP) e a cirurgia fictícia (CF), e após 6 ou 24 horas foram avaliados quanto a frequência respiratória, o volume corrente e o volume pulmonar.

As medidas da ventilação pulmonar (VE) foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, como descrito por Bartlett e Tenney (1970). Os ratos permaneceram dentro de uma câmara vedada com volume de ar corrente aquecido, a uma temperatura equiparada à corporal e com saturação de vapor de água. Ao expirar, o volume de ar corrente do animal foi resfriado até a temperatura da câmara, gerando perda de vapor de água. Nessa situação de aquecimento e umedecimento do ar inspirado e o resfriamento e a desidratação do ar expirado pequenas mudanças de pressão ocorrem e podem ser detectadas por um transdutor sensível conectado à câmara de acrílico, onde o animal se locomove livremente. A câmara estava equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.e tinha conexão com um transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência que evitava

artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas.

Durante as medidas de ventilação o fluxo foi interrompido, e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 minutos) para que as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração pudessem ser medidas como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão foram coletados por um registrador o qual foi conectado a um conversor analógico-digital que permitiu a digitalização dos sinais por um microcomputador, utilizando-se um programa de aquisição de dados. A análise dos dados foi feita no programa Excel, permitindo a obtenção da frequência respiratória (F_R) e da amplitude do sinal (P_T). O volume corrente (V_T) foi calculado através da fórmula abaixo, descrita por Bartlett e Tenney (1970). A calibração do volume foi feita antes e durante cada experimento por injeção na câmara de 1 mL de ar (volume conhecido) usando-se uma seringa graduada. A ventilação pulmonar foi calculada multiplicando-se o V_T pela F_R . Segundo Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \times V_K \times \frac{T_C}{T_R} \times \frac{(P_B - P_C)}{(P_B - P_C) - \frac{T_C}{T_b} \times (P_B - P_R)}$$

Símbolos da equação:

VT: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na camara do animal.

TR: temperatura ambiente

3.11 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de Student. Para comparação de três ou mais médias aplicou-se a análise de variância (One-way) seguido do pós-teste de Newman-Keuls, quando apropriado. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da dosagem da prolactina (ng/ml)

Foi observado que a injeção intraperitoneal (ip) de sulpiride causou um aumento na concentração plasmática de prolactina quando comparado com os ratos pré-tratados com salina ip, sendo que essa hiperprolactinemia foi mantida durante todos os períodos de coleta (tempo 0 até 6, gráfico 1). Além disso, observamos que a sepse induzida pelo CLP causou uma elevação de prolactina plasmática sendo que essa elevação ocorreu apenas 1 hora após a cirurgia (gráfico 1).

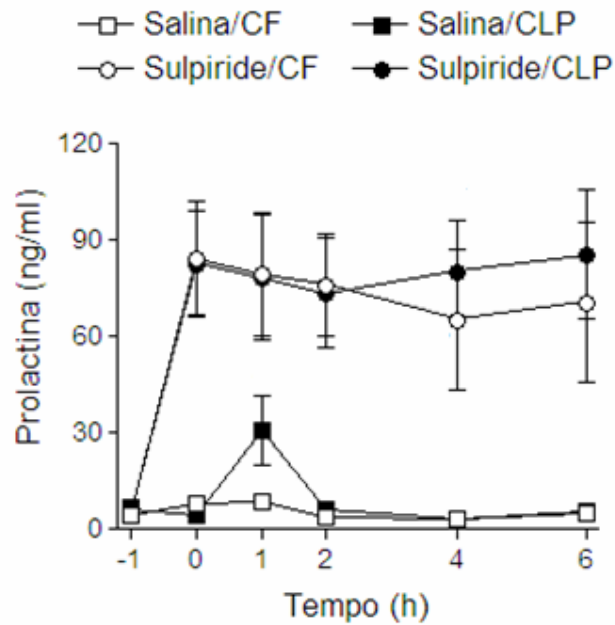


Gráfico 1 – Concentração da prolactina de ratos (n=6 por grupo), A coleta do sangue foi realizada (hora zero) antes da cirurgia, e depois 1, 2, 4 e 6 horas após CLP ou CF. Sulpiride+CF e Sulpiride+CLP mostraram aumento ($p<0,05$) quando comparados com o grupo Salina+CF e Salina+CLP. O grupo salina+CLP, mostrou aumento somente 1 horas após cirurgia.

Fonte: do autor.

4.2 Contagem do número de células no lavado broncoalveolar (LBA)

Quanto ao número de células no LBA, foi observado um aumento em 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 2A) e em 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 2B) no grupo pré-tratado com salina e submetidos a CLP, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF. O pré-tratamento com sulpiride não alterou o número de células no LBA nos animais submetidos a CF, no entanto, provocou um incremento ($p < 0,05$) no número de células no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP quando comparado com o grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, tanto em 6 horas, como em 24 horas após a realização da cirurgia (gráfico 2A e 2B). No grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, foi observado também um aumento no número de células em 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 2B), quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP.

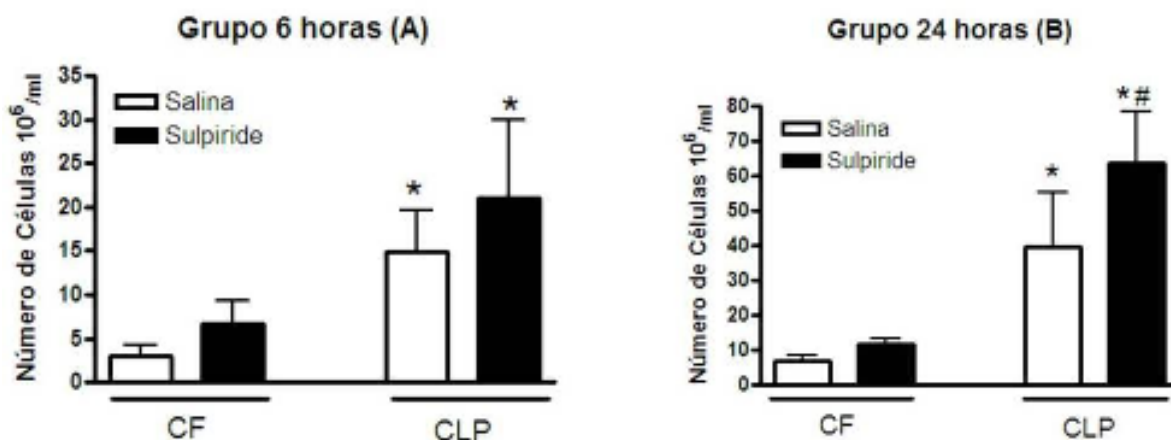


Gráfico 2 – Número de células do lavado broncoalveolar de ratos (n=6 por grupo) tratados com sulpiride e salina e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com grupo Salina+CLP.

Fonte: do Autor

4.3 Análise do edema pulmonar

Quanto a análise do edema pulmonar, não foi observado em 6 horas alterações significativas entre os grupos estudados (gráfico 3A). No entanto, em 24 horas o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, mostrou um aumento no peso dos pulmões ($p < 0,05$; gráfico 3B), quando comparados com o grupo pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia, o mesmo efeito foi observado no grupo pré-tratados com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia.

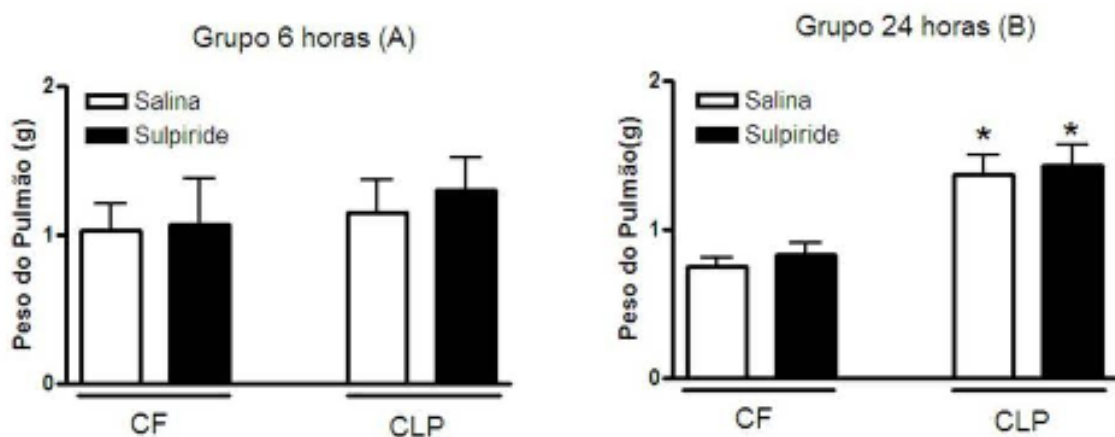


Gráfico 3 – Avaliação do edema pulmonar de ratos ($n=6$ por grupo) tratados com sulpiride e salina e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Fonte: do Autor

4.4 Análise da pressão arterial

Quanto a análise da pressão arterial, foi observado que após 24 horas a realização da CLP houve uma queda na pressão arterial ($p < 0,05$; gráfico 4) no grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a cirurgia fictícia CF. O grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, quando comparado com o grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, mostrou também uma queda na pressão arterial de 40 (mmHg), ($p < 0,05$; gráfico 4).

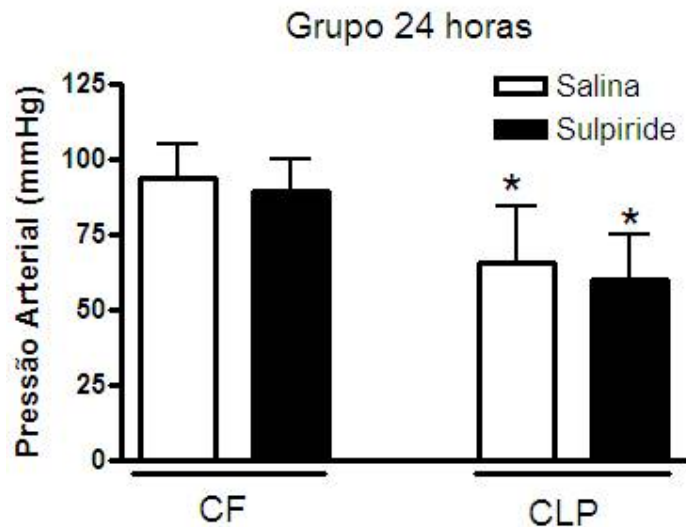


Gráfico 4 – Avaliação da pressão arterial de ratos (n=6 por grupo) tratados com sulpiride e salina submetidos a CLP ou CF, sacrificados após 24 horas. Valores expressos com média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: do Autor

4.5 Análise morfométrica

Quanto a análise morfométrica do tecido pulmonar normais, foi observado uma redução na percentagem dos alvéolos pulmonares em 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 5A) e em 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 5B) no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF e no grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CF. No grupo pré-tratado sulpiride e submetidos a CLP também foi observado uma queda acentuada na percentagem dos alvéolos pulmonares normais as 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 5A) e as 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 5B) quando comparado com o grupo pré-tratado com sulpiride e submetido CF, e com o grupo Salina+CLP.

Quanto os alvéolos pulmonares colabados, foi observado um aumento em 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 5A) e em 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 5B) no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, e no grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetidos a CF. No grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, observou-se um aumento nos alvéolos colabados as 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 5A) e as as 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 5B), quando comparado com o grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CF, com o grupo pré-tratado com salina e submetidos a CLP, e com grupo pré-tratado com salina e submetidos a CF.

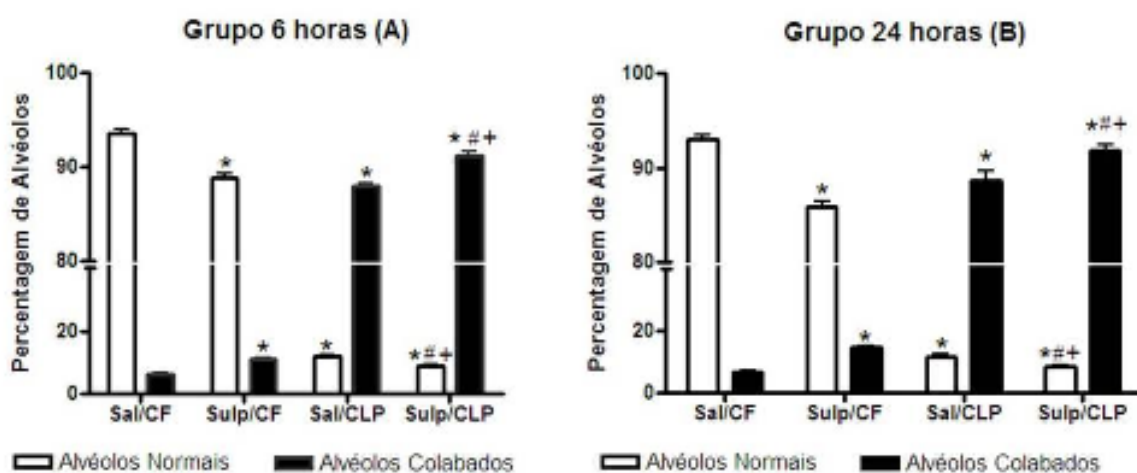


Gráfico 5 – Percentagem de alvéolos pulmonares normais e colapsados de ratos ($n=6$ por grupo) tratados com sulpiride e salina, e submetidos a CLP ou CF sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como DP. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle, # $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina+CLP, + $p < 0,05$ comparado com o grupo Sulpiride+CF.

Fonte: do Autor

4.6 Análise da celularidade

Quanto à análise da celularidade, foi observado um aumento em 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 6A) no número de polimorfonucleares (PMN), e de mononucleares (MN) no grupo pré-tratado com salina e submetidos a CLP, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetidos a CLP, e no grupo pré-tratado com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia CF, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e CF. No grupo pré-tratado com sulpiride e submetidos a CLP, foi observado um aumento ($p < 0.05$; gráfico 6A) no número de polimorfonucleares PMN e de mononucleares MN, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, e com o grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CF.

Em 24 horas, foi observado um aumento ($p < 0.05$; gráfico 6B) no número de mononucleares MN no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CF, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CF, e houve um aumento ($p < 0.05$; gráfico 6B) no número de PMN, no grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CF, no entanto, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, foi observado um aumento ($p < 0.05$; gráfico 6B) no número de MN e de PMN quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, e quando pré-tratado com sulpiride e submetido a CF.

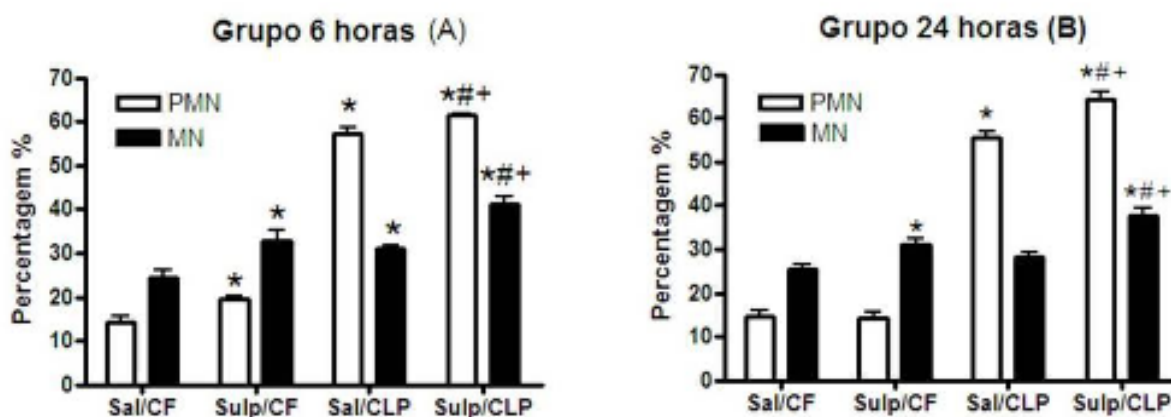


Gráfico 6 - Percentagem das células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) dos pulmões de ratos ($n=6$ por grupo) tratados com sulpiride e salina e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com grupo Salina/CLP, + $p < 0.05$ comparado com o grupo Sulpiride/CF.

Fonte: do Autor

4.7 Análise histopatológica

4.7.1 Animais pré-tratados com salina e sulpiride, submetidos a cirurgia fictícia CF e sacrificados em 6 horas.

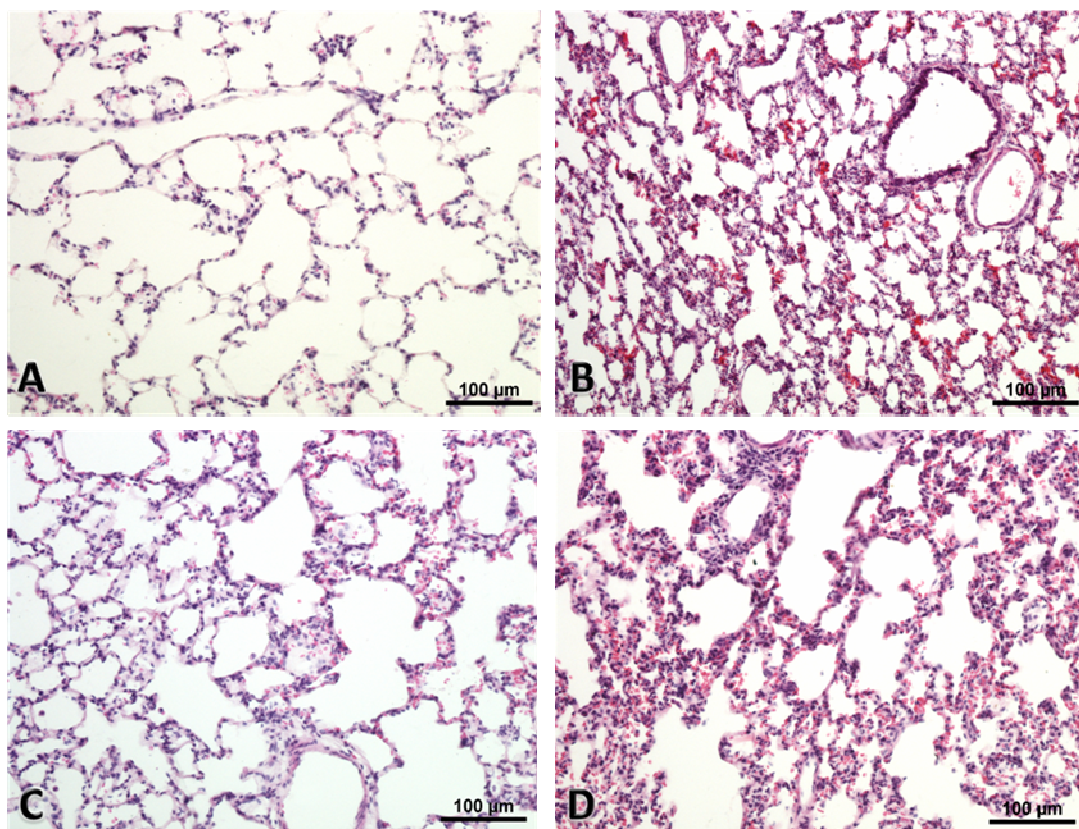
Nos animais pré-tratados com salina, submetidos a cirurgia fictícia CF o aspecto morfológico pulmonar estava próximo do normal , exceto pela presença de poucas células inflamatórias (Fotografia 1A).

Já nos animais pré-tratados sulpiride, submetidos a cirurgia fictícia CF notou-se aumento das células inflamatórias com ligeiro espessamento localizado dos septos interalveolares (Fotografia 1 C).

4.7.2 Animais pré-tratados com salina e sulpiride, submetidos a CLP e sacrificados em 6 horas.

Nos animais pré-tratados com salina, submetidos a CLP observou-se hiperemia, edema intersticial e alveolar discretos, localizados; hemorragia intersticial e alveolar também discreta, mais disseminada. Foi notado por todo o parênquima alveolar Infiltrado inflamatório de PMN, predominantemente neutrófilos. Áreas com moderado colapso alveolar também foram notadas (Fotografia 1 B).

Já nos animais pré-tratados sulpiride, submetidos a CLP houve agravamento dos aspectos notados no grupo CLP salina. Notou-se aumento dos septos interalveolares pelo edema intersticial, pela hemorragia e por células inflamatórias predominantemente neutrofílicas, difusamente distribuídas (Fotografia 1 D).



Fotografia 1 – Fotomicrografias do parênquima pulmonar, representando a arquitetura alveolar. **(A)** Animais submetidos a Salina+CF mostram áreas de alvéolos sem alterações expressivas. **(B)** Animais submetidos a Salina+CLP mostram áreas com alvéolos colapsados e infiltrado inflamatório. **(C)** Animais submetidos a Sulpiride+CF mostram áreas de discreto infiltrado inflamatório. **(D)** Animais submetidos a Sulpiride+CLP mostram áreas com alvéolos colapsados, espessamento dos septos e infiltrado inflamatório difuso e moderado. Aumento 20x.

Fonte: do Autor

4.7.3 Animais pré-tratados com salina e sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia CF e sacrificados em 24 horas.

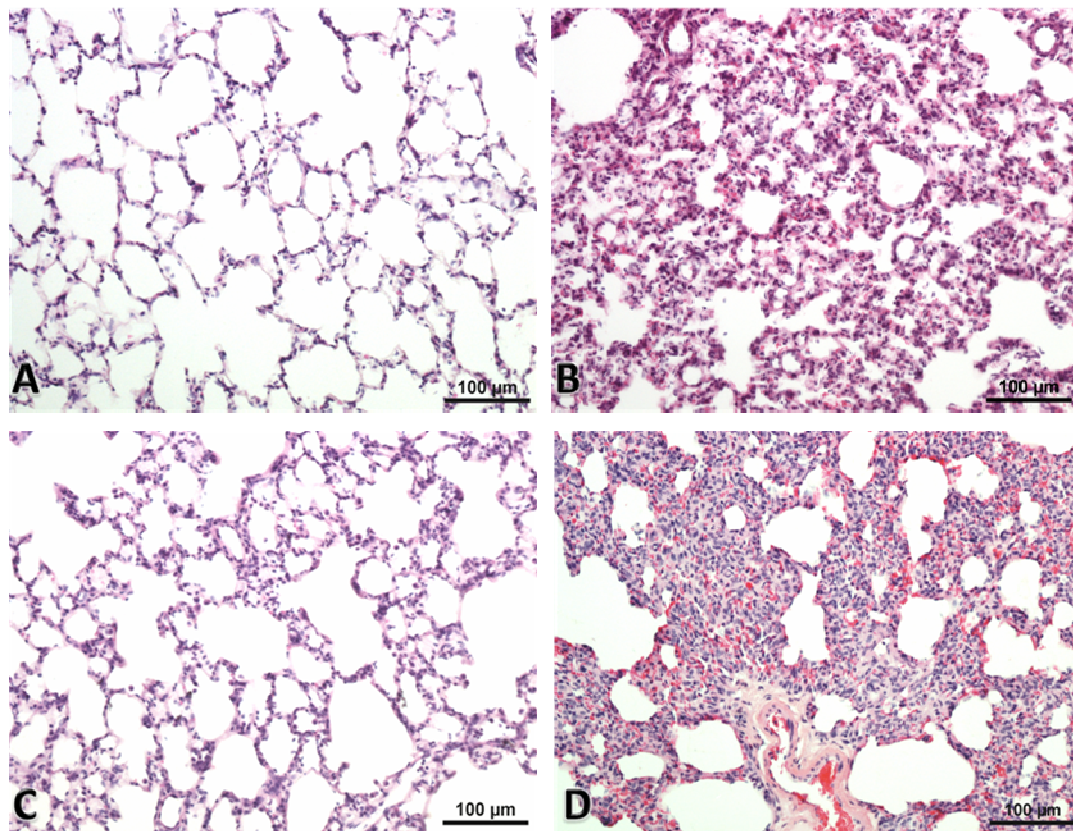
Nos animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF o aspecto morfológico pulmonar, estava próximo do normal e presença de poucas células inflamatórias. (Fotografia 2A).

Nos animais pré-tratados com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF notou-se um aumento de células inflamatórias distribuídas difusamente com presença de alvéolos próximos ao normal ao lado de outros colapsados. (Fotografia 2C).

4.7.4 Animais pré-tratados com salina e sulpiride e submetidos a CLP e sacrificados em 24 horas.

Nos animais pré-tratados com salina e submetidos a CLP salina observou-se hiperemia, edema intersticial e alveolar de discretos a moderados e difusamente distribuídos; hemorragia intersticial e alveolar mais disseminada; infiltrado inflamatório de PMN, moderado e difuso predominantemente neutrofílico; aumento das áreas de colapso alveolar (Fotografia 2B).

Nos animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP houve agravamento dos aspectos notados no grupo CLP salina, com aumento expressivo dos septos interalveolares, devido ao edema intersticial, à hemorragia e ao infiltrado inflamatório misto, com predomínio de neutrófilos, difusamente distribuídos (Fotografia 2C).



Fotografia 2 – Fotomicrografias do parênquima pulmonar, representando a arquitetura alveolar. **(A)** Animais submetidos a Salina/CF mostram áreas de alvéolos próximos do normal **(B)** Animais submetidos a Salina/CLP mostram áreas com alvéolos colapsados, espessamento dos septos e infiltrado inflamatório moderado. **(C)** Animais submetidos Sulpiride/CF mostram áreas com alvéolos próximos ao normal ao lado de outros colapsados e a presença de poucas células inflamatórias difusamente distribuídas. **(D)** Animais submetidos Sulpiride/CLP mostram agravamento do colapso alveolar, do espessamento dos septos, e aumento na intensidade do infiltrado inflamatório difuso, de moderado a intenso. Aumento 20x.

Fonte: do Autor.

4.8 Análise da ventilação

4.8.1 Volume corrente (ml/Kg)

Quanto ao volume corrente (ml/Kg) em 6 horas, não foram observado alterações entre os grupos estudados (gráfico 7A), no entanto, foi observado em 24 horas uma queda ($p < 0,05$; gráfico 7B) no grupo pré-tratado com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia CF, no grupo pré-tratado com salina e submetidos a CLP, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, quando comparados com o grupo pré-tratado com salina e submetido a cirurgia fictícia CF. No grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, foi também observado uma queda no volume corrente de ($p < 0,05$; gráfico 7B), quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP.

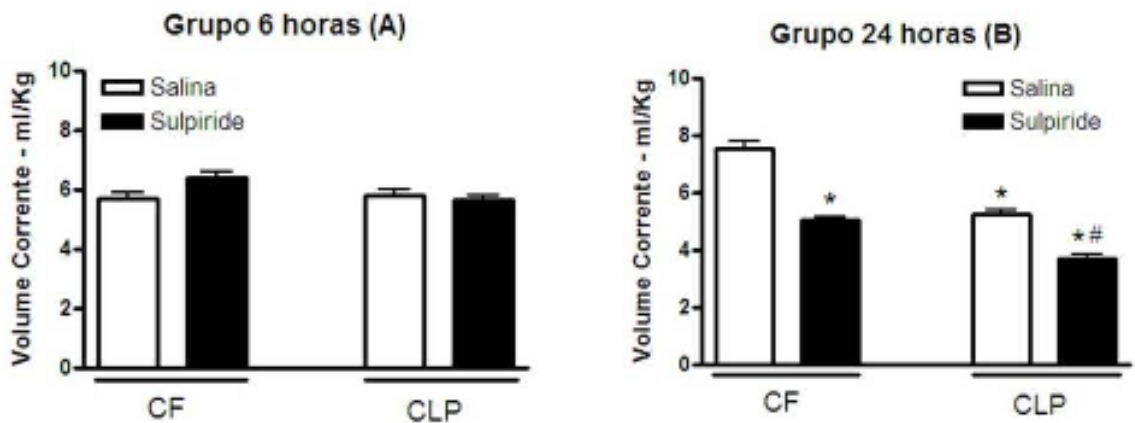


Gráfico 7 - Medida do Volume Corrente VT/ml/Kg, de ratos (n=6 por grupo), tratados com sulpiride e salina, e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle, # $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina+CLP.

Fonte: do Autor

4.8.2 Volume pulmonar (ml/Kg/min)

Quanto ao volume pulmonar (ml/Kg/min) foi observado um aumento em 6 horas ($p < 0.05$; gráfico 8A) no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a cirurgia fictícia CF. No grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP, foi observado uma queda em 24 horas ($p < 0.05$; gráfico 8B), quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a cirurgia fictícia CF, e uma queda ($p < 0.05$; gráfico 8B), no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, quando comparado com o grupo pré tratado com sulpiride a submetido a cirurgia fictícia CF.

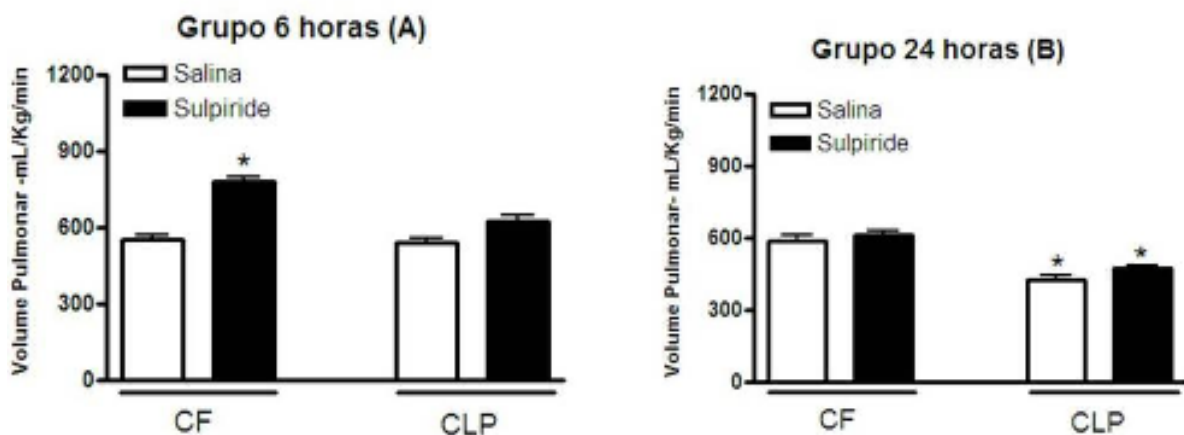


Gráfico 8 - Medida do Volume pulmonar de ratos ($n=6$ no grupo), tratados com sulpiride e salina e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: do Autor

4.8.3 Frequência respiratória (ciclos/min)

Quanto a frequência respiratória não houve alteração entre os grupos em 6 horas, no entanto, foi observado um aumento em 24 horas de ($p < 0,05$; gráfico 9A) no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a cirurgia fictícia CF, no entanto, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, foi observado um aumento de ($p < 0,05$; gráfico 9B) quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP.

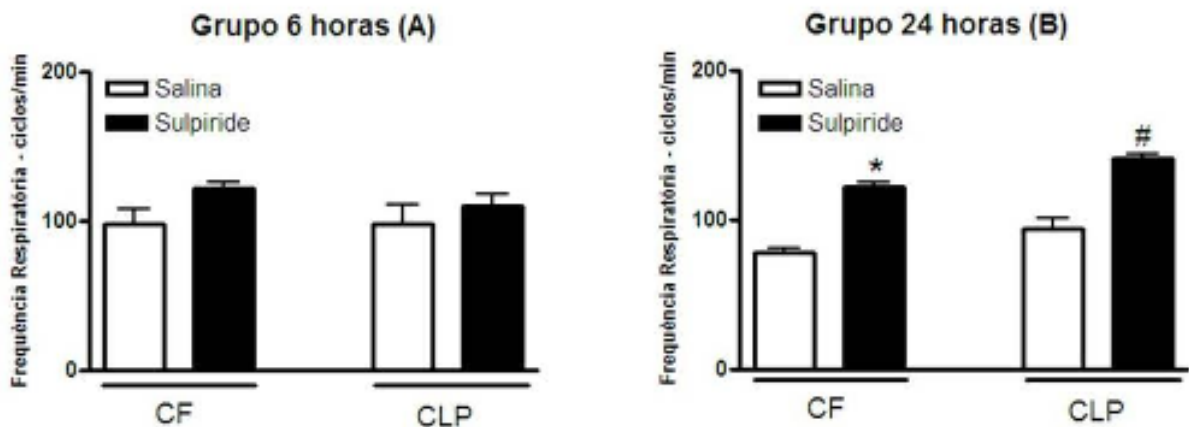


Gráfico 9 - Medida da Frequência respiratória, de ratos ($n=6$ por grupo), tratados com sulpiride e salina e submetidos a CLP ou CF, sacrificados em 6 horas (A) ou 24 horas (B). Valores expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle, # $p < 0,05$ comparado com o grupo Salina +CLP.

Fonte: do Autor

5 DISCUSSÃO

A sepse é caracterizada por ser um processo inflamatório sistêmico, devido a uma infecção, seguida pela falência múltipla dos órgãos (BAKER et al., 1994). Os achados histopatológicos encontrados durante a sepse são: presença de edema intersticial e alveolar, acúmulo de neutrófilos e macrófagos, áreas com hemorragia, e evidências de lesão endotelial e do epitélio, muitas vezes com desnudamento destes.

De acordo com os autores Bone et al. (1997), Parrillo, (1993), Thiemermann, (1997), Schmidt et al. (2001), Sharshar et al. (2003), a sepse está associada com profunda alteração cardiovascular caracterizada por hipotensão e diminuição da resistência sistêmica, da contratilidade do miocárdio, e da sensibilidade dos barorreceptores arteriais. Segundo Godin e Buchman (1996) e Toweill et al. (2000), a sepse humana resulta em uma queda na variabilidade da frequência cardíaca e da oscilação na pressão arterial. Isto indica um desacoplamento entre sistema nervoso autônomo e cardiovascular.

Para o estudo da interferência da hiperprolactinemia na sepse foi utilizado, neste trabalho, o sulpiride e para obtenção da sepse a técnica de ligadura e perfuração do ceco (CLP). A CLP permite o extravasamento do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal com um aumento na probabilidade de causar a sepse e conseqüente lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo e falência múltipla dos órgãos (BAKER et al., 1980). Esse modelo imita as fases hemodinâmica e metabólica da sepse humana, e a resposta imune ao evento (REMICK et al., 2000).

Em nossos experimentos os animais submetidos à cirurgia CLP, desenvolveram sinais clínicos de sepse incluindo, ereção dos pelos, letargia e diarreia. Esses achados estão de acordo com os autores, Benjamim et al. (2000), Correa et al. (2007), Salkowski et al. (1998), Torres-Duenas et al. (2006).

Para o estudo da interferência da hiperprolactinemia na sepse foi utilizado, neste trabalho, o sulpiride e para obtenção da sepse a técnica de ligadura e perfuração do ceco (CLP). A CLP permite o extravasamento do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal com um aumento na probabilidade de causar a sepse e conseqüente lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo e

falência múltipla dos órgãos (BAKER et al., 1980). Esse modelo imita as fases hemodinâmica e metabólica da sepse humana, e a resposta imune ao evento (REMICK et al., 2000).

No presente estudo, a indução de sepse pela CLP mostrou, na análise do lavado broncoalveolar, um aumento no número de leucócitos, nos animais pré-tratados com salina e submetidos à CLP, quando comparados com nos animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia (CF), e nos animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP, quando comparados com os animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia após 6 horas. No grupo de 24 horas houve mesmo aumento de leucócitos, no entanto, no grupo pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP houve um aumento de leucócitos, quando comparado com o grupo pré-tratados com salina e submetido a CLP.

Paralelamente a esses achados, a análise da celularidade nos grupos de animais 6 horas ou 24 horas, mostraram que os animais pré-tratados com salina e submetidos a CLP, os animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP, e os animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia, quando comparados com os animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, revelou um aumento no número de polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN). Em adição, o grupo de animais de 24 horas pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP quando comparado com os animais pré-tratados com salina e submetidos a CLP, foi observado um aumento significativo de neutrófilos e macrófagos. Tal achado sugere que o sulpiride, atuando possivelmente pelo aumento dos níveis da prolactina, modula o processo inflamatório no pulmão de ratos sépticos.

Estudos anteriores demonstraram que o aumento de leucócitos desempenha um papel central na resposta inflamatória e imunológica, e é controlado por várias moléculas de sinalização e adesão (EBNET et al., 1996). A adesão dos leucócitos ao endotélio proporciona fixação e medeia a sua migração transepitelial, estimulada por fatores quimiotáticos produzidos no microambiente local. A prolactina age nas células inflamatórias circulantes estimulando as integrinas dos leucócitos funcionais que medeiam a adesão desses ao endotélio (PAVEL et al., 2005). De acordo com autores como Bole et al. (1998), as células inflamatórias apresentam receptores para prolactina, o que é consistente com os achados de Kooijman et al. (1996), Dogusan

et al. (2001), Matera et al. (2001), Bouchard et al. (1999) que relacionam a prolactina ao estímulo das células T, células B, células NK, macrófagos, neutrófilos, células hematopoiéticas e células apresentadoras de antígeno.

Nossos estudos demonstraram que nos animais pré-tratados com salina e submetidos CLP e nos animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP, tanto do grupo de 6 horas quanto no de 24 horas, houve um aumento significativo no número de neutrófilos. Segundo Zemans et al. (2009) e Albertine et al. (2002), número elevado de neutrófilos pode danificar o epitélio alveolar, provavelmente pela liberação de mediadores químicos e moléculas intracelulares que induzem a dissolução das junções comunicantes entre o epitélio alveolar, bem como pela indução de apoptose e necrose dos pneumócitos tipo I e II. Esses mediadores químicos incluem elastase, peptídeos catiônicos e espécies reativas de oxigênio.

Em adição, os resultados mostraram aumento no número de macrófagos nos animais pré-tratados com salina e submetidos CLP e nos animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP. Recentes estudos indicaram uma marcada depressão na capacidade dos macrófagos e sua liberação de citocinas inflamatórias, em animais CLP com sepse de 24 horas, e associaram-na a uma severa imunossupressão. Tal disfunção dos macrófagos na sepse tardia poderia reduzir drasticamente, a habilidade dos animais para controlar os efeitos letais da sepse. (AYALA et al., 1996; AYALA et al., 1990).

Lesão vascular aguda causada pela liberação de mediadores químicos aumento a permeabilidade no nível da micro-circulação pulmonar, resultando na formação de edema de alto teor protéico o que dificulta as trocas gasosas. As interleucinas liberadas pelos leucócitos facilita a quimiotáxia e conseqüentemente a migração de um grande número de neutrófilos e macrófagos (STAUB, 1974; 1981). Considera-se que a lesão vascular pulmonar é a causa inicial mais importante da LPA/SDRA (MICHAEL et al., 2010). No presente estudo, o Grupo de 6 horas não mostrou edema pulmonar significativo. Entretanto, no Grupo de 24 horas houve um aumento no peso dos pulmões dos animais pré-tratados com salina e submetidos CLP, quando comparados com os animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, sugerindo que os animais pré-tratados com salina e submetidos CLP, apresentaram uma lesão pulmonar aguda.

Existe uma comunicação bilateral entre o sistema imune e sistema nervoso central (SNC) (BESEDOVSKY et al., 1985; BLALOCK et al., 1999). Sinais aferentes atingem o SNC através da circulação sanguínea e dos nervos, fornecendo ao cérebro informações sobre a constante mudança durante a infecção nos tecidos locais e da resposta inflamatória. Um exemplo da interação humoral é a presença da interleucina-6 (IL-6), uma citocina que funciona como um ativador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, nas respostas da fase aguda durante o estresse.

Durante o choque séptico o SNC, o eixo hipotálamo-hipófise, o simpático e o parassimpático estão freqüentemente posicionados para modular a inflamação, maximizando a capacidade defensiva, e ao mesmo tempo evitando a toxicidade sistêmica. As manifestações mais comuns incluem delírio, fraqueza, alteração no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), disfunção do eixo hipotálamo/hipófise, e acelerado gasto energético (SCHROEDER et al., 2001). Para Landry et al. (1997) o choque séptico levaria a uma diminuição na liberação da vasopressina pela hipófise, podendo contribuir para a hipotensão. Em nossos achados, os animais do grupo de 24 horas pré-tratados com salina e submetidos CLP, quando comparados com os animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, revelaram queda na pressão arterial, sugerindo que nesses animais, o eixo hipotálamo/hipófise encontrava-se em desequilíbrio, devido, provavelmente, ao choque séptico.

A liberação de mediadores químicos pelos leucócitos durante a sepse, estimula a síntese da enzima óxido nítrico sintetase pelas células do endotélio e a produção de NO (Óxido Nítrico) o que contribui para o efeito vasodilatador característico do choque séptico (KOBAYASHI et al., 1998). O NO leva a hipotensão por relaxamento do músculo liso vascular e prejudica o fluxo na microcirculação, gerando danos em múltiplos órgãos, como o pulmão, coração, e rins, e queda na atividade simpática contribuindo ainda mais para a queda da pressão arterial. Em adição, alterações do eixo hipotálamo/hipófise ocorrerão pela estimulação dos mediadores químicos inflamatórios sistêmicos que resultam na queda da liberação de vasopressina e conseqüente queda da pressão arterial.

No presente estudo, foi avaliada a morfometria pulmonar nos grupos de animais de 6 ou 24 horas. Esses grupos mostraram um significativo aumento de alvéolos colapsados nos animais pré-tratados com salina e submetidos CLP, quando comparados com o grupo de animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia

fictícia CF. Os animais pré-tratados com sulpiride e submetidos CLP, também mostraram um aumento significativo nos alvéolos colapsados, quando comparados com os animais pré-tratados com salina e submetidos CLP. Em adição, os achados histológicos revelaram um intenso infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, edema, hemorragia, e espessamento dos septos alveolares no grupo de animais pré-tratados com sulpiride e submetidos CLP (Fotografia 2D), quando comparados com o grupo de animais pré-tratados com salina e submetidos CLP (Fotografia 7B).

Segundo Snapper et al. (1985) e Wright et al. (1989), não se deve descartar a relação entre a presença de células inflamatórias e a hiperreatividade das vias aéreas, secundárias a inflamação. De acordo com Cai et al. (2009) a saída dos PMN que se acumulam na micro-vasculatura pulmonar e tornam-se ativados, leva a degranulação e liberação de vários mediadores químicos, o que resulta em aumento na permeabilidade vascular e perda sustentada da função da barreira endotelial. Apesar dos neutrófilos causarem lesão pulmonar endotelial, esses apresentam um papel vital para o hospedeiro, especialmente contra a infecção bacteriana.

Para Oliveira et al. (2009) a CLP produz modificações histológicas do parênquima pulmonar compatíveis com as lesões de fase aguda, com colapso alveolar e infiltração predominante neutrofílica, resultando em agravamento da sepse.

No presente estudo, o aumento no nível de prolactina, induzido pela ação do sulpiride, provavelmente acentuou o número de células inflamatórias neutrofílicas no pulmão e relacionou-se com o colapso alveolar, importante fator para o desenvolvimento da hipoxemia.

Paralelamente a esses achados morfológicos, a análise da ventilação pulmonar sugeriu que os grupos de animais de 24 horas, pré-tratado com sulpiride e submetido a cirurgia fictícia CF, pré-tratado com salina e submetidos CLP, pré-tratado com sulpiride e submetidos CLP, mostraram uma queda no Volume Corrente VT, quando comparado com os animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, e o grupo de animais pré-tratado com sulpiride, mostrou também uma queda no Volume Corrente VT, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP. Em adição pré-tratados com salina e sulpiride submetidos CLP quando comparados respectivamente com os animais pré-tratados

com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, e com os animais pré-tratados com sulpiride e submetidos a cirurgia fictícia CF, mostraram uma queda no Volume Pulmonar. Os animais pré-tratados com sulpiride submetidos a cirurgia fictícia CF, quando comparados com os animais pré-tratados com salina e submetidos a cirurgia fictícia CF, mostraram, um aumento na frequência respiratória, e os animais do grupo, pré-tratado com sulpiride e submetido a CLP, também mostraram um aumento na frequência respiratória, quando comparado com o grupo pré-tratado com salina e submetido a CLP. Sugerindo que esses animais, provavelmente, apresentaram um quadro de hipoxemia.

A falta de O₂ dificulta as funções metabólicas e prejudica a manutenção da homeostasia energética. A hiperventilação é observada durante a hipoxemia (STEINER; BRANCO, 2002) e, de acordo com Taylor et al. (1999) ativa os quimiorreceptores periféricos localizados nos corpos carotídeos e aórticos, levando a informação posteriormente ao sistema nervoso central que desencadeia a resposta hiperventilatória.

Estudos têm demonstrado que uma área localizada no bulbo ventrolateral rostral (RVL) está envolvida nas respostas compensatórias à hipoxemia (HIROOKA et al., 1997; NITSOS; WALKER, 1999), sob a influência da rede respiratória central, cuja atividade tem uma ritmicidade respiratória diretamente relacionada com o nervo frênico (GUYENET, 2000; GUYENET; KOSHIYA, 1992; RICHTER; SPYER, 1990).

Em adição, RVL apresenta importante conexão com duas principais áreas medulares relacionadas com a inspiração: o grupo respiratório dorsal (DRG) e o grupo respiratório ventral (VRG), sugerindo que os neurônios da área RVL desempenham um papel no controle da respiração (BONGIANNI et al., 1991). De acordo com Burton et al. (2000) o neurotransmissor L-glutamato também participa do controle da respiração.

No presente estudo, os animais com CLP mostraram um quadro de hipoxemia, sugerido pelos achados morfológicos e funcionais (queda do volume corrente, e do volume pulmonar). Provavelmente esses animais tentaram utilizar os mecanismos fisiológicos presentes na área do bulbo, na tentativa de defesa contra as falhas nos parâmetros respiratórios. Esperava-se, por exemplo, um aumento na frequência respiratória nos animais com CLP. No entanto, isto não foi observado,

sugerindo que esses mecanismos de defesa da sepse estavam bloqueados, e não responderam corretamente.

Neste estudo, foi avaliado o efeito da hiperprolactinemia na morfologia e função dos pulmões durante a lesão pulmonar aguda causada pela sepse. Acredita-se que a prolactina interfira no processo inflamatório, ora estimulando-o, ora inibindo-o. Segundo Bem-Jonathan et al. (1996) a prolactina, hormônio produzido nas células lactotróficas da hipófise, era responsável somente pela lactação, mas foi posteriormente considerado um componente importante na modulação do sistema imune estimulando a proliferação e a sobrevivência celular.

Para o presente estudo, a hiperprolactinemia foi estimulada pelo sulpiride, um antagonista da dopamina, que possivelmente leva ao excesso de prolactina e a uma condição favorável ao estudo do processo inflamatório na sepse.

O sulpiride é uma importante droga utilizada em pacientes com distúrbios psiquiátricos, sugerindo um maior cuidado no acompanhamento do paciente que faça uso do mesmo, uma vez que ele poderia interferir num processo inflamatório pré-existente.

Segundo Horseman et al. (1997) animais com silenciamento do gene que transcreve o receptor para prolactina (PRL-R) não apresentaram interferência na resposta inflamatória, possivelmente pelo fato da prolactina não ser essencial no desenvolvimento e função do sistema imune normal. Por outro lado, em mulheres pós-parto a hiperprolactinemia é um fator fisiológico, mas se houver ativação do processo inflamatório a prolactina pode passar a ser um agravante desta resposta, exacerbando-a, podendo levar a condição de sepse, o que sugere que a prolactina pode não ser essencial, mas interfere, de algum modo, nesta resposta (BOUCHARD et al., 1999).

A CLP mostrou-se eficaz na indução da sepse, com características morfológicas próprias desta condição, como infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, edema intersticial e alveolar, e colapso alveolar, além de alteração na prova funcional como queda do volume corrente, do volume pulmonar, da pressão arterial e aumento na frequência respiratória.

Os animais que foram pré-tratados com sulpiride e submetidos a CLP apresentaram um maior comprometimento nos achados morfológicos, comprovados pela resposta funcional.

Foi possível comprovar a indução de hiperprolactinemia pela administração de sulpiride através da técnica de radioimunoensaio. O sulpiride acentuou a resposta inflamatória sistêmica provocada pela sepse induzida pela CLP, comprovada pela elevação do número de leucócitos.

A hiperprolactinemia deve ser atentamente observada pela estreita relação com o agravamento de condições do processo inflamatório, provocado por um processo infeccioso que possibilita o aumento no número de óbitos em pacientes sépticos.

Estudos futuros serão necessários para comprovar se os animais em sepse e com hiperprolactinemia apresentarão alterações imunomodulatórias.

6 CONCLUSÃO

- A CLP provocou alterações no parênquima pulmonar, que podem levar a hipoxemia, no entanto, a análise funcional não mostrou uma resposta ventilatória adequada, indicando uma deficiência no seu controle durante a sepse.
- A hiperprolactinemia induzida pelo sulpiride acentuou as alterações morfofuncionais do pulmão, que podem estar relacionadas com o agravamento da sepse.

REFERÊNCIAS

ALBERTINE, K. H. et al. Fas and fas ligand are upregulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Pathol.**, Salt Lake City, v. 161, p. 1783–1796, 2002.

ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, p. 319-323, 1967.

AYALA, A. et al. Does endotoxin tolerance prevent the release of inflammatory monokines IL-1 IL-6 or TNF during sepsis. **Arch. Surg.**, Michigan, v.127, p. 191-197, Feb. 1992.

AYALA, A. et al. Sepsis selectively activates peritoneal but not alveolar macrophage release inflammatory mediators (IL-1, IL-6 and TNF). **Surg Forum**, Michigan , v. 41, p. 17-119, Mar. 1990.

AYALA, A. et al. Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. **Arch. Surg.**, Michigan , v. 129, p. 1172, Nov, 1994.

BAKER, C. et al. Epidemiology of trauma deaths. **Am. J. Surg.**, San Francisco, v. 140, p. 144-150, July 1980.

Bartlett, D. J.; Tenney, S.M.; Control of breathing in experimental anemia. **Respir Physio.**, v.10, p.384-95, Oct.1970 .

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis**, São Paulo, v. 182, p. 214–223, July 2000.

BEN-JONATHAN, N. et al Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions,and clinical aspects. **Endocr Rev**, Cincinnati, v. 17, p. 639-669, Dec.1996.

BEN-JONATHAN, N. ; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev**, Cincinnati , v. 6, n. 22, p.724-63, Dec. 2001.

BERCZI, I. et al. Pituitary hormones and immune function. **Acta Paediatr Suppl.** Canada, v. 423, p. 70, Nov. 1997.

BERCZI, I. ; NAGY, E. Effects of hypophysectomyon immune function. In Ader R, Felten DI, Cohen N (ed.), **Psychoneuroimmunology**, New York, p.339, 1991.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, Tennessee, v. 149, p.818-824, 1994.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.E.; SORKIN. E. Immunoneuroendocrine interactions. **J. Immunol.**, v. 135, p. 750–754, Aug. 1985.

BLAKE, C. A. et al. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats. **Endocrinology**, v. 94, p. 503–508, Feb. 1974.

BLALOCK, J. E. et al. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol. Today**, Birmingham, v. 15, p. 504–511, Nov.1999.

BONGIANNI, F. et al. Reciprocal connections between rostral ventrolateral medulla and inspiration-related medullary areas in the cat. **Brain Res**, Florence, v. 565, p. 171–174, Nov. 1991..

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest** , Chicago, v.112, p. 235–243, July 1997.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus **Conference American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Chest**, Chicago, v. 101, p. 1644-1655, June 1992.

BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN. V.; EDERY, M,. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathway sand phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Rev**, Paris, v.19, p. 225–268, June 1998.

BOUCHARD, B. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. **J Immunol**, Paris, v. 163, p. 576–582, July 1999.

BOZINOVSKI, S. et al. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Victoria, v. 286, p. 877-85 Apr. 2004.

BUSKILA, D.; SHOENFELD, Y. Prolactin, bromocriptine and autoimmune diseases. **Isr J Med Sci**, Israel, v. 32, p. 23–27, Jan. 1996.

BURTON, M. D.; KAZEMI, H. Neurotransmitters in central respiratory control. **Respir. Physiol.**, Boston, v.122, p. 111–121, Sept. 2000.

CAI, S. et al. Myeloid differentiation protein-2-dependent and -independent neutrophil accumulation during Escherichia coli pneumonia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, Louisiana, v. 40, p.701–9, June 2009.

CARON, M. C. et al. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. **J Biol Chem**, Printed , v. 253, p. 2244-2253, Apr, 1978.

CORREA, P. B. et. al. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J. Neuroimmunol**, Ribeirão Preto, v.183, p. 17–25, Feb. 2007.

COSMAN, D. The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine*. Seattle, W.A, v. 5, p.95 -106, Mar. 1993.

CROZIER, T. A. et al. Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. **Br J Anaesth**, Göttingen, v. 72, p. 280, Mar.1994.

CUI, X. et al. Neuronal nitric oxide synthase deficiency decreases survival in bacterial peritonitis and sepsis **Intensive Care Med**, Bethesda, v. 33, p. 1993, Nov. 2007.

DEMAREST, K. T. et al. Sexual differences in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. **Neuroendocrinology**, v 32, p. 108–113, Feb. 1981.

DEMAREST, K. T.; RIEGLE, G. D.; MOORE, K. E. Hypoprolactinemia induced by hypophysectomy and long-term bromocriptine treatment decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the responsiveness of these neurons to prolactin. **Neuroendocrinology**, v. 40, p. 369–376, May 1985.

DEVINS, S. S. et al. Effects of dopamine on T-lymphocyte proliferative responses and serum prolactin concentrations in critically ill patients. **Crit Care Med**, Missouri-Kansas , v. 20, p.1644–1649, Dec. 1992.

DEMLING, R. H. The modern version of adult respiratory distress syndrome. **Annu. Rev. Med.**, Boston, v. 46, p. 193–202, 1995.

DIMATTIA, G. E. et al. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. **Endocrinology**, Manitoba, v.122, p. 2508–2517, 1988.

DOGUSAN, Z. et al. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. **J Neuroimmunol**, Brussels, v.120, p.58–66, 2001.

EBNET, K.; KALDJIAN, E. P.; ANDERSON, A. O. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. **Annu Rev Immunol**, Bethesda, v. 14, p.155–177, 1996.

FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiol Rev**, Tallahassee, v. 80, p.1523–1631, Oct. 2000.

GALA, R. R.; SHEVACH, E. M. Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages. **Proc Soc Exp Biol Med**, Detroit, v. 205, p.12–19, Jan.1994.

GERTLER, A. Recombinant analogues of prolactin, growth hormone, and placental lactogen: correlations between physical structure, binding characteristics, and activity. **J Mamm Gland Biol Neoplasia**, Jerusalém, v. 2, p.69–80, Jan.1997.

GISELE, G. P. et al. Intravenous glutamine decreases lung and distal organ injury in an experimental model of abdominal sepsis. **Critical Care**, Rio de Janeiro, v.13, p. 74. May 2009.

GODIN. P. J.; BUCHMAN, T.G.; Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. **Crit. Care. Med.**, Bethesda, v. 24, p. 1107–1116, 1996

GOFFIN, V.; FERRAG, F.; KELLY, P. A. Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors. In: *Advances in Molecular and Cellular Endocrinology*, edited by LeRoith D. London: JAI., Londres, p. 1- 33, 1998.

GOUT, P. W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. **Cancer Res**, v. 40, p. 2433–2436, July 1980.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radic. Biol. Med*, Ann Arbor, v. 33, p. 303–310, 2002.

GUYENET, P. G.; KOSHIYA, N. Respiratory -sympathetic integration in the medulla oblongata. In: KUNOS, G., CIRIELLO, J. Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation. Boston: **Birkhauser**,1992. v.2, p. 226–247

GUYENET, P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. **Respir Physiol**, Charlottesville, v.121, p.147–162, July 2000.

HEADLEY, A. S.; TOLLEY, E.; MEDURI, G.U. Infections and the inflammatory responses in acute respiratory distress syndrome. **Chest**, Memphis, v.111, p.1306 - 1321, May 1997.

HIROOKA, Y. et al Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience**, New South Wales, Oct. v. 80, p.1209–1224, 1997.

HORSEMAN, N.D.et al. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. **EMBO J**, Cincinnati, v.16, p. 6926–6935, Dec. 1997.

JARRAR, D. et al. Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage. **Surgery**, Providence, v. 128, p. 246–2, Aug. 2000.

JETSCHMANN, J. U. et al. Expression and in-vivo modulation of and adrenoceptors on human natural killer (CD16) cells. **J. Neuroimmunol**, Hannover, v.74, p. 159, Apr. 1997.

KANIK, K. S.; WILDER, R. L. Hormonal alterations in rheumatoid arthritis, including the effects of pregnancy. **Neuroendocr Mech Rheum Dis**, Tampa, v. 26, p. 805–823, Nov 2000.

KAPUR, S.; MAMO, D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Toronto, v. 27, p. 1081–90, Oct. 2003.

KATZENSTEIN, A. A.; BLOOR, C. M.; LIEBOW, A. A. Diffuse alveolar damage: The role of oxygen, shock and related factors. **Am. J. Pathol**, v. 85, p. 210-222, Oct. 1976.

KLETZKY, O. A. et al. Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 151, p. 878, Apr. 1985.

KOBAYASHI, A. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. **Chest**, Kyoto, v. 113, p.1632-1639, June 1998.

KOOIJMAN, R.; HOOGHE PETERS, E. L.; HOOGHE, R. Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-1 in the immune system. **Adv Immunol**, Brussels, v. 63, p. 377-454, 1996.

LANDRY, D. W.; LEVIN, H. R.; GALLANT, E. M. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, New York, v. 95, p. 1122-1125, Mar. 1997.

MARTIN, G. S.; BERNARD, G. R. Airway and lung in sepsis. **Intensive Care Med**, (Suppl. 1). Nashville, v. 27, p. 63-79, 2001.

MATERA, L.; GALETTO, A.; MORI, M. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. **Lupus**, Turin, v.10, p. 728-734, 2001.

MATERA, L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. **Neuroimmunomodulation**, Turin, v. 4, p. 171-180, 1997.

MEDURI, G.U.; CHROUSOS, G.P. Effectiveness of prolonged glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome: The right drug, the right way? **Crit. Care Med**, v. 34, p. 236-238, Jan. 2006.

MELTZER, H. Y.; FANG, V. S. The effect of neuroleptics on serum prolactin in schizophrenic patients. **Arch Gen Psychiatry**, v.33, p. 279-86, Mar. 1976.

MICHAEL, A. M.; RACHEL, L. Z. The Cardiovascular Research Institute and the Departments of Medicine and Anesthesiology. San Francisco, v. 94, p.143, 2010.

MILENKOVIC, L.; PARLOW, A. F.; MCCANN, S. M. Physiological significance of the negative short-loop feedback of prolactin. **Neuroendocrinology**, Beograd, v. 52, p. 389–392, Oct. 1990.

MORRIS, J. A.; MACKENZIE, E. J.; DAMIANO, A. M.; BASS, S. M.. Mortality in trauma patients: the interaction between host factors and severity. **J Trauma**, Nashville, v. 30, p.1476–1482, Dec. 1990.

NEIL, D. J. Effect of “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 6, n. 87 p.1192-7, Dec. 1970.

NITSOS, I.; WALKER, D. W. The distribution of FOS - immunoreactive neurons in the brainstem, midbrain and diencephalons of fetal sheep in response to acute hypoxia in mid and late gestation. **Brain Res Dev Brain Res**, Victoria, v. 114, p. 9–26, Apr. 1999.

OFFNER, P. J.; MOORE, E. E.; BIFFI, W. L. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. **Arch Surg**, Colorado, v. 134, p. 935–940, Sept. 1999.

PAPE, H. C. et al. Levels of anti-bodies to endotoxin and cytokine release in patients with severe trauma. **J. Trauma**, Hannover, v. 46, p. 07, May 1999.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N. Engl. J. Med.**, Chicago, v. 328, p. 1471–1477, May 1993.

PAVEL, M. O. et al. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. **Laboratory Investigation**, Queretaro, v. 85, p. 633–642, May 2005.

PELOSI, P.; CAIRONI, P.; GATTINONI, L. Pulmonary and extrapulmonary forms of acute respiratory distress syndrome. **Semin Respir Crit Care Med**, Varese, v. 22, p. 259-268, May 2001.

POLLOCK, A.; MCLAREN, E. H. Serum prolactin concentration in patients taking neuroleptic drugs. **Clin Enocrinol (Oxf)**, Glasgow, UK, v. 49, p.513, 1998.

REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, Ann Arbor, v. 13, p. 110-116, 2000.

REINER OBERBECK, M. D. et al. Prolactin Modulates Survival and Cellular Immune Functions in Septic Mice. **Journal of Surgical Research**, Essen, v. 113, p. 248-56, Aug. 2003.

REN-FENG, G. et al. Divergent Signaling Pathways in Phagocytic Cells during Sepsis. **The Journal of Immunology**, Ann Arbor, v. 177, p. 1306-1313, July 2006.

RICHTER, D. W. ; SPYER, K. M. Cardiorespiratory control. In: Loewy, A.D., Spyer, K.M. (Eds.), Central Regulation of Autonomic Functions. **Oxford University Press**, New York, p. 189–207, 1990.

ROCCO, P. R. ; ZIN, W. A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality ? **Curr Opin Crit**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 10-17, Feb. 2005.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N. Engl. J. Med.**, Seattle, v. 353, p.1685–93, Oct. 2005.

SALKOWSKI, C.A. et .al. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. **Infect. Immun**, Bethesda, v. 66, p. 3569–3578, Aug. 1998.

SAIR, M. P. et al. Tissue oxygenation and perfusion in endotoxemia. **Am.J. Physiol.** v. 271, p. 1620–1625, 1996.

SAIARDI, A. et al. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. **Neuron**, v. 19, p.115-126, 1997.

SCHALLY, A.V. et al. Isolation of thyrotropin releasing factor (TRF) from porcine hypothalamus. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 25, p.165–169, 1966.

SCHMIDT, H. B.; WERDAN, K.; MULLER-W. U. Autonomic dysfunction in the ICU patient. **Curr. Opin. Crit. Care**, Klinikum Kröllwitz, v. 7, p. 314–322, Oct. 2001.

SHARSHAR, T. et al. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit. Care Med.**, Garches, June v. 31, p.1752–1758, 2003.

SULIMAN, A. M. et al. Hyperprolactinaemia: analysis of pre-sentation, diagnosis and treatment in the endocrine service of a general hospital. **Ir Med J**, v. 93, p. 74, 2000.

SIMMONDS, S. H. Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. **Neurosci Lett.** v. 60, p. 267–272, 1985.

SCHROEDER, S.; WICHERS, M.; KLINGMÜLLER, D. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of patients with severe sepsis: altered response to corticotropin-releasing hormone. **Crit. Care Med**, v. 29, p. 310–316, 2001.

SNYDER, L. S. et al. Failure of lung repair following acute lung injury: regulation of the fibroproliferative response. **Chest**, v. 98, p.733-738, 1990.

SNAPPER, J. R. et al. Effects of alveolar hypoxia during partial mitral valve obstruction in unanesthetized sheep. **Am Rev Respir Dis**, v. 131, p. 65-68, 1985.

STAUB, N. C. Pulmonary edema. **Physiol. Rev**, v. 54, p. 678–811, 1974.

STAUB, N.C. Pulmonary edema due to increased microvascular permeability. **Annu. Rev. Med.**, v. 32, p. 291–312, 1981.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 64, p. 263–288, 2002.

TAVARES, L. W. et al. Lipid mediators tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. **Eur J Pharmacol** , São Paulo, v.25, p.69-75, Sept. 1998.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiol. Rev.**, Birmingham, July v. 79, p. 855–916, 1999.

TEPLITZ, C. The core pathobiology and integrated medical science of adult acute respiratory insufficiency. **Surg. Clin. North.**, v. 56, p. 1091-1133, Oct.1976.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen. Pharmacol.**, London, v. 29, p. 159–166, Aug. 1997.

TORRES- D. D. et.al, Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. **Shock**, Ribeirão Preto, v.25, p.267–276, Mar. 2006.

TOWEILL, D. et al. Linear and nonlinear analysis of hemodynamic signals during sepsis and septic shock. **Crit. Care Med**, Portland, v. 28, p. 2051–2057, June 2000.

VIDALLER, A. et al. Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function *in vivo* and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient. **J Clin Immunol**, Salvador Zubirán, v. 2, p. 210–215, May 1992.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **New Engl. J. Med.**, San Francisco, v. 342, p.1334-1349, May 2000.

WAYDHAS, C.; et al. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. **Arch. Surg**, Munich, Apr. v.127, p.460-7, 1992.

WEILAND, J. E.; et al. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome: clinical and pathophysiologic significance. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p.218–225, 1986.

WEIBEL, E. R.; “Morphometry: stereological theory and practical methods”, In: Gil, J. (editor), Models of lung disease-microscopy and structural methods, **Marcel Dekker**, New York, p. 199–247, 1990.

WITCHTERMAN, K. A.; BAUE, A.E.; Chaudruy, I.H. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposal: **J Surg Res**, Yale University USA v. 29, p.189-201, Aug.1980.

WIECK, A.; HADDAD, P. M. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia in women: pathophysiology, severity and consequences. **Selective literature review. Br J Psychiatry**, Manchester, v.182, p.199–204, 2003.

WRIGHT, P.E.; BERNERD, G.R. The role of airflow resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, Nashville, v.139, p. 1169-1174, May 1989.

YEH, C. L. et al. Dietary glutamtokine supplementation modulates Th1/Th2 and interleukin-6 expressions in sepsis mice. **Cytokine**, Taipei, Taiwan, v. 231, p. 329-334, Sept. 2005.

YU-LEE, L.Y. et al. Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. **Mol Cell Biol**, Houston, v. 10, p.3087–3094, June 1990.

ZEMANS, R. L.; COLGAN, S.P.; DOWNEY, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 40, p. 519–35, 2009.

ZELLWEGER, R. et al. Prolactin: A Novel and Safe Immunomodulation Hormone for the Treatment of Immunodepression Following Severe Hemorrhage **Journal of Surgical Research**, Lansing , v. 63, p. 56-58, 1996.