RITA DE CÁSSIA TOQUETTI

Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*)

São Paulo
2006

Rita de Cássia Toquetti

Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr.

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1814
FMVZ

Toquetti, Rita de Cássia

Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) / Rita de Cássia Toquetti. – São Paulo: R. C. Toquetti, 2006.
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr.

1. Proteína surfactante. 2. Pneumócito tipo I. 3. Pneumócito tipo II.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II correlacionado com idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*)", protocolado sob o nº886/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos (peças de matedouro), sob a responsabilidade do Dr. José Manuel dos Santos (Pós-Doutorando do Departamento de Cirurgia), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Morphologic and function studies of pneumocito type II cells correlated with gestational age in bovine (*Bos taurus* e *Bos indicus*)", protocol number 886/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility of Dr. José Manuel dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TOQUETTI, Rita de Cássia

Título: Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATORIA

A Deus:

Pela força e coragem para enfrentar tantos momentos difíceis.

Aos meus Pais Valdemar e Arceli:

Pelo apoio, sempre incondicional, em todos os momentos da minha vida, por compartilharem meus melhores e meus piores momentos sempre com uma palavra de conforto e de estímulo. Devo a vocês tudo o que sou, porque sei que sempre procuraram fazer o que era melhor pra mim, mesmo que muitas vezes eu não os compreendesse. Amo muito vocês e serei eternamente grata!

A minha filha Laura:

Peço-lhe perdão pelos minutos, horas e dias de ausência, e agradeço pelo sorriso e brilho nos olhos na minha chegada. Você é a luz da minha vida! Te amo muito!

Ao meu marido Ricardo:

Obrigada pelo seu amor, apoio e incentivo nessa jornada. Obrigada pelas vezes em que você, tão gentilmente, carregou meus fetos, me auxiliou, foi acima de tudo um companheiro, amigo, namorado!

Te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha grande amiga Celina:

Pelo ter se mostrado sempre presente nos momentos importantes da minha vida, pela sua solidariedade, apoio, mão amiga e força. “É no momento difícil de nossas vidas que reconhecemos os verdadeiros amigos”.

Ao meu orientador Professor Doutor José Manoel dos Santos:

Obrigada por sua amizade, paciência, dedicação, calma, incentivo, conselhos e principalmente por ter sido um orientador no sentido mais puro da palavra. Toda minha gratidão e admiração.

A Professora Doutora. Flavia Kubrusly

Por ter me acolhido tão bem em sua casa, o instituto Butantan, por sua paciência e pela tolerância com as minhas dificuldades.

A Professora Doutora Maria Angélica Miglino

Obrigada pela oportunidade de estar realizando o sonho de voltar para a universidade.

AGRADECIMENTOS

- Professores Doutores do Departamento de Cirurgia da FMVZ / USP – São Paulo José Roberto Kfoury Jr.; Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro; Francisco Henandez – Blazquez; Pedro Primo Bombonato e Paula de Carvalho Papa pelos ensinamentos e convivência;
- A aluna do Instituto Butantan Sandra Dias por sua paciência, atenção e ajuda;
- Aos funcionários do Instituto Butantan Lucila; Dirce; Filipe; Sergio pela convivência e ajuda;
- Aos funcionários do Departamento de Cirurgia da FMVZ / USP - São Paulo Maicon, Jaqueline, Ronaldo, Índio, João, Raimundo, Cauê pela ajuda e amizade;
- A Sandra pela sua dedicação, paciência, boa vontade e amizade;
- As minhas amigas Myrian e Daniela pela amizade, convivência e companheirismo;
- A todos os colegas da pós – graduação pela convivência e troca de experiência.
- Ao Frigorífico Mantiqueira de São José dos Campos – São Paulo pela colaboração na obtenção do material.

RESUMO

RESUMO

TOQUETTI, R. C. **Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*).** [Morphologic and functional studies of the alveolar type II cells correlated to the gestational age in bovines (*Bos taurus* and *Bos indicus*)]. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Esse estudo tem como objetivo caracterizar a presença de células globosas alveolares ou pneumócitos tipo II e o início da produção de lipoproteína surfactante, em bovinos, correlacionado com a idade gestacional. Para tanto, foram utilizados 28 fetos em idades gestacionais compreendidas entre quatro e oito meses de gestação e dois animais recém – nascido. Após a coleta os fetos foram dissecados, pesados e medidos, utilizando-se o método de Crow – Rump (CR). Para a descrição morfológica, foram coletados fragmentos pulmonares com cerca de 2 cm² cada e, em seguida, foram fixados em Líquido de Bouin e formalina a 10% para microscopia de luz e em glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de transmissão. Para o estudo bioquímico, foram feitas incisões na região da traquéia e introdução de cateter e, através deste, solução fisiológica 0,9% e assim obter o lavado pulmonar. O pulmão de fetos com idade gestacional de 4 meses encontravam-se em fase canalicular do desenvolvimento, sem presença de células globosas e nem aparecimento de bandas eletroforéticas compatíveis com presença de proteínas surfactantes. Nos fetos com 5 meses de idade gestacional, foi observado que o pulmão encontra-se em fase de saco terminal, com aparecimento de alvéolo primitivo formado por epitélio cúbico, com áreas formada por células pavimentosas e células globosas. Nas análises de eletroforese não foram identificadas proteínas surfactantes. No pulmão de fetos com 6 meses de idade gestacional, foram observados desenvolvimento na fase de saco terminal com a presença de pneumócitos tipo I e pneumócito tipo II, nesta fase foi possível observar, na análise eletroforética, o aparecimento de bandas em torno de 28 kDa, demonstrando a presença de SP – A, que é a proteína surfactante encontrada em maior quantidade. A partir dos 7 meses de idade gestacional a fase de saco terminal desenvolve-se ainda mais no pulmão fetal com o surgimento de uma vascularização mais intensa, os pneumócitos tipo I estão com aspecto mais pavimentoso e os pneumócitos tipo

II, mais globosos. Na análise eletroforética do lavado brônquio - alveolar foram observadas bandas de proteínas surfactantes, com perfil eletroforético semelhante ao animal recém - nascido. No recém - nascido observou-se o pulmão na fase alveolar, com os pneumócitos tipo I e tipo II bem definidos. O perfil eletroforético do lavado brônquio - alveolar desse animal foi igual ao perfil do lavado de um animal adulto, apresentando as mesmas bandas no triplet.

Palavras-chave: Proteína surfactante. Pneumócito tipo I. Pneumócito tipo II.

ABSTRACT

ABSTRACT

TOQUETTI, R. C. **Morphologic and functional study of the alveolar type II related with the gestacional age in bovines (*Bos taurus* and *Bos indicus*)**. [Estudo morfológico e funcional do pneumócito tipo II relacionado com a idade gestacional em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*)]. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The objective of this study is to characterize the presence of alveolar type II and the beginning of the surfactant lipoprotein production, in bovines, correlated with the gestacional age. For that to happen, 28 embryos in gestacional age, between four and eight months, and two newborn animals had been used. After the collection, the embryos were dismembered, weighed and measured, using the method of Crow - Rump (CR). For the morphologic description, pulmonary fragments of about 2cm² each were collected. After that, they had been set in Bouin Liquid for light microscopy and in glutaraldehyde 2.5% for electronic microscopy transmission. For the biochemist study, incisions and the introduction of catheter were made in trachea area and, through this, physiological solution 0.9% were introduced, in order to obtain a pulmonary wash. The lung of embryos with gestacional age of 4 months, were found in the canalicular development phase, without presence of globule cells, nor appearance of compatible eletroforetic bands compatible with the presence of surfactant protein. In the 5 months gestacional age embryos, were observed that the lung was in the terminal sac fase, with the presence of primitive alveolus formed by cubical epithelium, with areas formed by pavimented cells and globule cells. In the analyses of eletroforese surfactants, proteins had not been identified. In the lung of embryos at 6 months of gestacional age, was observed development in the phase of terminal sac, with the presence of type I and alveolar type II. In this phase, was possible to observe, in the SDS –PAGE analysis, the appearance of bands around 28 kDa, demonstrating the SP-A presence -, which is the surfactant protein found in greater amount. From 7 months of gestacional age and up, the phase of terminal sac developed even more in the fetal lung, with the sprouting of a more intense vascularization. The alveolar type I had a more pavimented aspect and the alveolar type II, were globules. In the SDS-PAGE analysis of the bronchial – alveolar wash,

surfactant protein bands had been observed, with similar profile from the newborn. In the newborn animal, lung in the alveolar phase was observed, with the alveolar type I and II well defined. The profile of the bronchial-alveolar wash of this animal was the same as the profile of the washed one of an adult animal, presenting the same bands in the triplet.

Key words: Surfactante protein. Pneumócito type I. Pneumócito type II.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação 51
- Figura 2 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação 52
- Figura 3 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação 53
- Figura 4 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação 54
- Figura 5 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação 55
- Figura 6 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação 56
- Figura 7 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação 57
- Figura 8 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação 58
- Figura 9 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação 59
- Figura 10 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação 60
- Figura 11 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com sete meses de gestação 61

Figura 12 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação....	62
Figura 13 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar.....	63
Figura 14 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar.....	64
Figura 15 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar.....	65
Figura 16 - Eletromicrografia mostrando pulmão de feto bovino com quatro meses de gestação em fase canalicular.....	67
Figura 17 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com cinco meses de gestação	68
Figura 18 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação	69
Figura 19 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação	70
Figura 20 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo do pulmão de feto bovino com recém nascido em fase alveolar.....	71
Figura 21 - Fotografia de gel SDS-PAGE 12,50% com perfil eletroforético das amostras de lavado bronco – alveolar de fetos bovinos com 4, 5 e 6 meses	76
Figura 22 - Perfis eletroforéticos de amostras de lavado bronco – alveolar em gel SDS – PAGE 12,5% de bovino recém nascido, adulto e fetos com 4 , 5 , 7 e 8 meses de gestação	77

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Os dados dos fetos coletados foram inseridos no gráfico de crescimento preconizado por Evans, Sack (1973); Noden, Lahunta (1990)	47
Gráfico 2 - Curva padrão para bovino adulto, recém – nascido e fetos com 8, 7 e 5 meses de gestação.....	73
Gráfico 3 - Curva padrão para fetos com 4, 5, 7 e 8 meses de gestação	73
Gráfico 4 - Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação	74
Gráfico 5 - Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação	74
Gráfico 6 - Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação	75

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fetos coletados e período gestacional estimado conforme as medidas de “Crown – Rump” e seus respectivos pesos.....	46
---	----

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA	Bovino Adulto
CR	Crow Rump
°C	Grau Celcius
DPPC	Dipalmituilfosfatidilglicerol
ml	mililitro
mA	miliampere
NM	nanômetro
µg	micro litro
µl	micro grama
kDa	quilodalton
M	molar
RDS	Síndrome da Dificuldade Respiratória
SP – A	surfactant protein – A
SP – B	surfactant protein – B
SP – C	surfactant protein – C
SP – D	surfactant protein – D
SDS-PAGE	Poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de Sódio
RN	Recém Nascido
%	Porcentagem

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL NA ESPÉCIE BOVINA	31
3.2	DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO NO FETO BOVINO	32
3.3	PROTEINAS SURFACTANTES SP-A, SP-B, SP-C E SP-D	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COLETA DE MATERIAL	40
4.2	ESTUDO MACROSCÓPICO E MORFOMÉTRICO	41
4.3	ESTUDO MICROSCÓPICO	41
4.3.1	Processamento Microscopia de Luz	41
4.3.2	Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão	42
4.4	DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA DO SURFACTANTE DE FETO BOVINO	43
4.4.1	BCA	44
4.4.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de Sódio (SDS – PAGE)	45
5	RESULTADOS	48
5.1	MICROSCOPIA DE LUZ	49
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	66
5.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	72
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com a globalização da economia, o setor pecuário de bovino de corte vem sofrendo grandes modificações em suas atividades, visando inovações tecnológicas que possam aumentar seu desempenho reprodutivo e produtivo, a fim de prover tanto o mercado interno como externo.

Novas técnicas vêm sendo utilizadas visando o nascimento de animais saudáveis e com capacidade de crescimento adequado.

Em bovinos, o tempo de gestação é de 280 dias (NODEN; LAHUNTA, 1990), por volta do 45^o dia de gestação, inicia-se o período fetal, que se estende até o nascimento e caracteriza-se pelo rápido crescimento, maturação fisiológica dos órgãos e modificações morfológicas no concepto (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo esse mesmo autor, o crescimento do feto é mais rápido nos estágios iniciais e diminui à medida que a gestação progride, porém o ganho de peso é maior no final da gestação, sendo que mais da metade do aumento do peso fetal ocorre nos dois últimos meses de gestação.

Para que ocorra a sobrevivência do feto ao nascer, é necessário, entre outros fatores, que haja um perfeito desenvolvimento e amadurecimento do sistema respiratório que envolve a transformação dos pulmões de órgãos secretores em órgãos de trocas gasosas e a produção de surfactante, uma lipoproteína sintetizada e secretada por células alveolares, os pneumócitos tipo II (JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MULLER, 2005).

O surfactante pulmonar tem por função reduzir a tensão superficial na interface ar – líquido dos alvéolos (GOERKE; CLEMENTS, 1986; NOTTER, 1984), estabilizando-os quando o pulmão está com seu volume bem reduzido. Esta propriedade reduz o trabalho respiratório e previne a transudação dos fluídos para o espaço alveolar (MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MULLER, 2005). Na literatura científica nacional e internacional por nós compulsada não encontramos referências sobre a cronologia do aparecimento do surfactante em bovinos, o que nos despertou o interesse por esse assunto.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar o pulmão em feto bovino correlacionado a idade gestacional com a síntese de surfactante.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar a idade gestacional com:

- aspectos morfológicos microscópicos, em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão do pulmão fetal;
- caracterizar, em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, os pneumócitos tipo II;
- cinética de produção e evolução da substância surfactante, por meio de extração e identificação bioquímica;
- estabelecimento de parâmetros morfométricos que correlacionem o tamanho à idade gestacional.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, descreveremos o desenvolvimento pulmonar fetal e suas diferentes fases, dando ênfase ao surgimento das células alveolares e da síntese das proteínas surfactantes. Para tanto, optamos por dividir este capítulo em tópicos.

3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL NA ESPÉCIE BOVINA

O desenvolvimento gestacional tem seu início com a formação do zigoto à partir da fecundação, e o tempo de gestação é calculado como sendo o intervalo entre o período fértil e o parto, a medida que a gestação progride, o útero aumenta gradativamente para permitir a expansão do embrião e do feto, porém o miométrio permanece quiescente prevenindo uma expulsão prematura. O período embrionário, em bovinos, ocorre do 15^o ao 45^o dia gestacional com rápido crescimento e diferenciação, durante o qual os principais tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas. O período fetal se estende a partir do 45^o dia, esse período caracteriza-se pelo crescimento e modificações da forma do feto (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

À medida que cresce, desde zigoto até o feto a termo, o conceito não apenas aumenta de tamanho e peso, como também sofre sucessivas modificações morfológicas. O padrão de crescimento, isto é, o aumento percentual em peso e dimensões por unidade de tempo é muito mais rápido nos estágios iniciais e diminuem à medida que a gestação progride, enquanto que o crescimento absoluto por unidade de peso aumenta exponencialmente atingindo o máximo no final da gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MÜLLER, 2005).

3.2 DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO NO FETO BOVINO

O aparelho respiratório compreende os pulmões e um sistema de tubos que comunicam o parênquima pulmonar com o meio exterior. É costume distinguir no sistema respiratório uma porção condutora, formada pelas fossas nasais, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos, e, uma porção respiratória, representada pelas porções terminais da árvore brônquica e que contém os alvéolos, único local onde se dão as trocas gasosas. Entre estas duas existe uma porção curta, chamada de transição (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; DYCE et al., 2004).

Em mamíferos o desenvolvimento do pulmão tem seu início com a formação do divertículo respiratório a partir do intestino primitivo e em seguida o crescimento do mesmo para formar o tubo laringotraqueal, na extremidade caudal do tubo laringotraqueal ocorre a formação da traquéia que se bifurca para dar origem aos brotos pulmonares (MOORE; PERSAUD, T.V.N., 2004; O'RAHILLY, R., MÜLLER, F. 2005). Os brotos pulmonares crescem no mesênquima adjacente e através de ramificações dicotômicas, ocorre a formação da árvore brônquica, essas ramificações resultam no estabelecimento de tubos com diâmetros decrescentes formando sucessivos brônquios. Esse processo é chamado centrífugo porque as ramificações tendem para o centro, em direção radial (HILFER, 1996; MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MÜLLER, 2005).

Durante o desenvolvimento embrionário, o broto traqueal ramifica-se formando os brotos dos brônquios primários, esses, junto com o mesênquima esplâncnico circundante, diferenciam-se para formar os brônquios principais. Os brônquios principais se dividem em secundários que formam ramos lobares, segmentares e intra-segmentares, cada brônquio segmentar com seu mesênquima circundante passa a ser o primórdio do segmento broncopulmonar, a partir desses surgem os bronquíolos respiratórios (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLEER, 2005). Segundo esses autores, as pleuras parietal e visceral surgem a partir do mesênquima, sendo a visceral do mesênquima esplâncnico e a parietal, do mesênquima somático.

Moore e Persaud (2004), descrevem a formação da traquéia no embrião a partir do endoderma do tubo laringotraqueal que dará origem ao epitélio e às glândulas da traquéia, enquanto o mesênquima que envolve o tubo formará o tecido conjuntivo, os músculos e as cartilagens.

Segundo Burri (1984), o desenvolvimento do pulmão pode ser dividido em três períodos cronológicos: período embrionário, período fetal próprio e período pós – natal. Durante o desenvolvimento intra-uterino, o mesmo autor divide a formação e a maturação pulmonar em três fases diferentes, sendo a primeira a fase pseudoglândular, a segunda a fase canalicular e a terceira a fase sacular, ressalta ainda que o desenvolvimento pulmonar continua após o nascimento, onde ocorre a fase alveolar.

Moore e Persaud (2004), Sadler (2005), O’Rahilly e Muller (2005); classificam a maturação pulmonar em quatro períodos ou fases com eventos morfológicos e fisiológicos característicos.

Pringle (1986) também descreve essas fases, sendo a primeira pseudoglandular, onde ocorre a formação de todos os elementos pulmonares, exceto os envolvidos com as trocas gasosas; nesta fase os tubos de ar estão pautados pela proximidade das células colunares altas e distalmente pelo epitélio cuboidal. A diferenciação das vias aéreas ocorre na direção centrifuga, deste modo as células ciliadas típicas, as não ciliadas, as globosas e as células basais aparecem primeiro na porção proximal das vias aéreas. Neste período as glândulas mucosas também encontram – se presentes. Simultaneamente a organogênese pulmonar, ocorre o desenvolvimento das conexões vasculares. Os capilares estão fundidos, contendo tecido intersticial (PRINGLE, 1986). Também no final do estágio pseudoglandular o aumento dos túbulos periférico junto com seu tecido circundante, representa os futuros ácinos de gás que expandem o parênquima (BURRI, 1984).

A segunda fase é conhecida como período canalicular onde a luz dos brônquios e dos bronquíolos terminais tornam-se mais amplas e o tecido pulmonar altamente vascularizado, nessa fase os bronquíolos terminais originam os bronquíolos respiratórios, marcando a transição para a porção respiratória. Esses bronquíolos respiratórios dividem-se formando os ductos alveolares e sua principal característica é a presença de inúmeros alvéolos e sacos alveolares em suas paredes; por isso é apropriado definir essas novas vias aéreas como canalicular.

Este crescimento periférico é acompanhado pelo aumento na capilarização, no início os capilares formam uma rede solta no parênquima, arranjando-se ao redor do espaço aéreo, subseqüentemente estabelecem muitos pontos de contato com o epitélio cuboidal. Esses pontos de contato são os lugares onde as células epiteliais diminuem em altura, desenvolvem processo citoplasmático atenuado, e tornam-se visíveis à microscopia de luz como células pavimentosas. A microscopia eletrônica, dessas células epiteliais demonstrou de forma confiável que estas células se diferenciaram em pneumócitos tipo I. Juntamente com a diferenciação dos pneumócitos tipo I, ocorre o aparecimento de células globosas ou pneumócitos tipo II que se apresentam acidófilas quando vistas a microscopia de luz. Com a diferenciação de células tipo I, em células cuboidais ricas em glicogênio vai aumentando a quantidade de corpos lamelares. Esses corpos representam o estoque intracelular na forma de material ativo de superfície (BURRI, 1984).

A terceira fase é chamada de período do saco terminal, pois neste período desenvolvem-se muito mais sacos terminais, cujo epitélio se torna muito delgado. A produção sacular vai a termo na última reprodução dos canais respiratórios: alguns provavelmente formarão os ductos alveolares enquanto outros migrarão para a periferia formando os sacos alveolares. Essa seqüência de desenvolvimento forma o caminho para as primeiras ramificações, com exceção dos últimos ramos, que vão direto para o início do estágio sacular, onde os canais da parede são aplainados (BURRI, 1984; O'RAHILLY; MÜLLER, 2005).

Há ainda, a formação da barreira hematoaérea que permite trocas gasosas, caso o feto nasça prematuramente, esta barreira é formada pelo contato íntimo entre as células endoteliais pavimentosas, ou pneumócitos tipo I, dispersas entre essas células, encontramos as células epiteliais secretoras, chamadas células alveolares ou pneumócitos tipo II (MOORE; PERSAUD, 2004; NODEN; LAHUNTA, 1990; SADLEER, 2005). Os pneumócitos tipo I possuem forma plana e formam linhas que se expandem pela região pulmonar formando ninhos que contém os pneumócitos tipo II, que possuem forma arredondada (HILFER, 1996).

A maior distinção que ocorre na formação dos sacos terminais é a diferenciação das células especializadas os pneumócitos tipo I e tipo II. Os pneumócitos tipo II participam da síntese de surfactante e fosfatidilcolina disaturada,

estes produtos são encontrados nos corpos lamelares vistos na microscopia eletrônica (MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MÜLLER, 2005).

A expansão que ocorre na área respiratória durante o período sacular precede a marcante diminuição do tecido intersticial, que tem consequências importantes para a arregimentação capilar. A rede de capilares que circundam o espaço aéreo provê o grupo através dos canais respiratórios, os capilares são formados por camadas duplas no septo intersacular. (BURRI, 1984; MOORE; PERSAUD, 2004;).

Comparando a maturação pulmonar, os capilares estão embebidos em ampla camada intersticial com muitas células, mas com baixo conteúdo de fibras extracelulares. Todavia há a deposição de elastina no epitélio das células endoteliais, a formação dessa elastina tem papel importante mais a diante, no desenvolvimento morfológico do pulmão e durante o início da formação alveolar. (BURRI, 1984; MOORE; PERSAUD, 2004;).

Após a formação dos pneumócitos tipo I e tipo II, há um aumento na quantidade de mielina tubular no espaço aéreo devido ao crescimento da atividade secretória dos pneumócitos tipo II. A mielina tubular tem sido mostrada dentro dos corpos lamelares e é considerada como uma reserva pobre de material ativo de superfície. Com o desenvolvimento e maturação do sistema de surfactante durante o estágio sacular, as chances de um feto prematuro sobreviver são maiores (BURRI, 1984).

A quarta e última fase é conhecida como período alveolar e ocorre ao final do período fetal, quando os pulmões são capazes de realizarem as trocas gasosas de forma eficiente porque a membrana alvéolo-capilar (barreira de difusão pulmonar ou membrana respiratória) é suficientemente delgada para permitir essas trocas gasosas. Apesar de os pulmões começarem a desempenhar esta função vital após o nascimento, eles têm que estar bem desenvolvidos para serem capazes de funcionar assim (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLEER, 2004). Em humanos somente 10% dos alvéolos são formados até o nascimento, sendo que uma pessoa adulta possui cerca de 300 milhões de alvéolos, enquanto um recém nascido possui 20 milhões (BURRI, 1984).

3.3 PROTEÍNAS SURFACTANTE: SP – A, SP – B, SP – C e SP – D

A presença do surfactante é, particularmente crítica no nascimento, quando o recém – nascido precisa desobstruir as vias aéreas do fluido fetal e estabelecer uma respiração regular (JOBE; IKEGAMI, 1987; ROBERTSON, 1983).

O surfactante consiste em 90% de lipídios e 10% de proteínas, incluindo as proteínas surfactantes A, B, C e D (HAWGOOD, 1997; WRIGHT, 1997). Ele recobre toda superfície alveolar na interface ar – líquido e é sintetizado, estocado e secretado pelos pneumócitos tipo II, depois de secretado o surfactante é armazenado nos corpos lamelares dentro do espaço alveolar e o conteúdo sofre uma transformação estrutural dentro da mielina tubular (BRASCH et al., 2004; OCHS et al., 2002).

O surfactante intra - alveolar pode ser “recuperado” através de lavado brônquio - alveolar, após centrifugações diferenciais, em duas frações, consideradas subtipos pesados e leves (GOERKE, 1998; POULAIN et al.; 1996).

As proteínas constituintes do surfactante pulmonar desempenham funções diferentes no pulmão. As proteínas surfactantes A e D (SP – A e SP – D), proteínas surfactante hidrofílicas, representam os dois subgrupos mais abundantes, enquanto as proteínas surfactantes B e C (SP – B e SP – C), são hidrofóbicas e possuem baixo peso molecular (POULAIN. et al.; 1996 ; PUTMAN, E et. Al.; 1996; YU; POSSMAYER ,1990).

As proteínas hidrofóbicas SP – B e SP – C são fundamentais para que ocorra um perfeito desempenho da função pulmonar por facilitarem uma rápida adsorção dos lipídeos na interface ar – líquido (GOERKE, 1998; HALL et al.; 1994), além disso possuem as funções específicas de constituição, estabilização e purificação da atividade do filme na superfície monomolecular do alvéolo (HAWGOOD; CLEMENTS, 1990).

Junto com SP – A, SP – B é essencial para a formação da mielina tubular. Mutações do gen SP – B podem levar a uma deficiência da proteína SP – B, a completa ausência de SP – B é letal para a espécie humana e a deficiência parcial pode estar associada com o enfraquecimento das funções respiratórias.

SP – B maduro é um amino-ácido homodímero com aproximadamente 18 kDa, que é sintetizado como uma pró – proteína com aproximadamente 40 kDa pelos pneumócitos tipo II, em direção ao Complexo de Golgi, compondo as multivesículas e corpos lamelares do pneumócito tipo II (Paschen; Griesse, 2005).

A proteína SP – B desenvolvida não se encontra distribuída uniformemente nos corpos lamelares do pneumócito tipo II, ficando restrita à projeção central do pulmão (BRASCH et al., 2004).

SP – A e SP – D, proteínas surfactantes hidrofílicas, apresentam uma morfologia rara, e podem ser vistas ajudando outras proteínas na promoção da adsorção de fosfolipídios, principalmente o dipalmitilfosfatidilcolina (HALL et al.; 1994; POULAIN et al., 1996;), além disso, SP – A e SP – D fazem parte de uma família de polipeptídios denominada colectinas, cuja principal função é opsonizar patógenos, inclusive vírus e bactérias, facilitando a fagocitose pelas células de resposta imune inata, os macrófagos e monócitos (WRIGHT et al.; 2003).

SP – A e SP – D são, elas próprias, bactericidas, pois danificam a membrana da parede celular bacteriana e inibem seu crescimento, portanto, SP – A e SP – D aumentam a depuração bacteriana, via aumento da fagocitose e via direta por efeitos antimicrobianos na bactéria (WU et al.; 2003).

A proteína surfactante SP - A é a maior constituinte do surfactante pulmonar (OSANAI et al., 1998) e sob condições desnaturantes e redutoras a massa molecular de SP - A é de 28 – 36 kDa (POSSMAYER, 1988). Possui múltiplas atividades no sistema “in vitro”, incluindo aumento de fosfatidilcolina adsorvida na interface ar – água (HAWGOOD et al, 1987; HAAGSMAN et al., 1987), formação extracelular da mielina tubular (KING; MACBETH, 1981; EFRATI et al., 1987), inibição da secreção de surfactantes (DOBBS et al., 1987; KUROKI et al., 1988), aumento de lipídios dentro das células alveolares tipo II (WRIGTH et al.; 1987) e aumento da fagocitose (TENNER et al., 1989; VAN IWAARDEN et al., 1990).

Quando SP – A é secretada o seu produto é primeiramente transportado para o lúmen do retículo endoplasmático. Subseqüentemente a proteína é transportada para o complexo de Golgi, onde ela passa pela maturação de oligossacarídeos e também outras modificações químicas. Existe um alto índice de concentração de

proteína SP-A dentro dos corpos lamelares comparado com o número total de células (OSANAI et al., 1998).

SP – D tem uma intrigante similaridade bioquímica com SP – A, e é secretado pelo pneumócito tipo II dentro do lúmen alveolar. A dinâmica de tensão de superfície do surfactante não é aparentemente afetada pela extração de SP – D (HAWGOOD; SHIFFER, 1991).

Na espécie humana, a deficiência de surfactante causada por parto prematuro é responsável pela síndrome da dificuldade respiratória (RDS). Os pulmões são pouco inflados e os alvéolos contêm um líquido de conteúdo protéico que se assemelha a uma membrana vítrea ou hialina (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLEIR, 2004). Goerke (1998), indica como uma das causas para a RDS é a predisposição genética que causa uma significativa diminuição de SP – B e nas frações pesadas de SP – A

A silicose em humanos causa uma diminuição de lipídeos e proteínas no lavado brônquio – alveolar, pois ocorre uma diminuição na síntese de lipídeos, diminuição na secreção de material surfactante, um aumento de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPC) liberado pelos pneumócitos tipo II e a diminuição da fagocitose pelos macrófagos alveolares (MOORE; PERSAUD, 2004; O'RAHILLY; MÜLLER, 2005).

O fumo também tem demonstrado interferir no sistema de síntese de surfactante. Experimentos feitos com ratos expostos a fumaça de cigarro, demonstraram que ocorre a diminuição significativa no total de SP – B (GOERKE, 1998).

A terapia de reposição do surfactante é a conduta clínica normalmente usada para as doenças respiratórias associadas com a deficiência de surfactante. Outros estudos demonstram que o uso de cortisol e da triiodotiroxina (T₃) tem ação no efeito do surfactante, pois, o cortisol aumenta a produção do surfactante associado a fosfatidilcolina saturada, enquanto o T₃ potencializa o efeito do cortisol (SMITH; SABRY, 1983).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia e Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ FMVZ – USP e no Laboratório do setor de Biotecnologia do Instituto Butantan com a colaboração da Profa. Dra. Flávia S. Kubrusly.

4.1 COLETA DE MATERIAL

Para o desenvolvimento do estudo, utilizamos fetos provenientes de úteros gestantes de animais abatidos no frigorífico e abatedouro da região de São José dos Campos – SP. Os animais abatidos eram de responsabilidade do abatedouro, não passando por nenhuma seleção prévia para diagnóstico de prenhes antes do abate. Os úteros foram abertos no local de origem, para tanto, realizamos uma incisão crânio – ventral no útero por onde foram retirados os fetos. Todo o material foi acondicionado em recipientes apropriados e posteriormente transportado para análises no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / FMVZ / USP - São Paulo /SP e no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan – São Paulo /SP.

Utilizamos 30 fetos, em diversos períodos de gestação os quais foram submetidos à metodologia preconizada por Evans e Sack (1973), Noden e Lahunta (1990) para a determinação da idade gestacional.

Para referência morfológica e bioquímica, utilizamos dois animais recém nascidos que vieram a óbito logo após seu nascimento e um animal adulto.

4.2 ESTUDO MACROSCÓPICO E MORFOMÉTRICO

Com o auxílio de uma fita métrica foram feitas medidas para a estimativa da idade gestacional tomando – se como referencia distância occipito-sacral, sendo a crista nuchal na extremidade cefálica e a última vértebra sacral na extremidade caudal, o Crow – Rump / CR (EVANS; SACK, 1973; NODEN, LAHUNTA, 1990). Em seguida, os fetos foram pesados em balança granatária com capacidade de 1 Kg a 100 Kg. Para os fetos que apresentaram idade gestacional igual ou superior a quatro meses, os valores obtidos na mensuração e pesagem foram registrados na tabela 1 e no gráfico 1 (anexos).

4.3 ESTUDO MICROSCÓPICO

Foram coletados fragmentos de pulmão de fetos avaliados em 4 meses de gestação até recém – nascido, todos foram avaliados pelo método de Crown – Rump, sendo que uma parte foi destinada à microscopia de luz e outra para microscopia eletrônica de transmissão.

4.3.1 Processamento Microscopia de Luz

A parte do material destinada à microscopia de luz foi fixada em líquido de Bouin por 12 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em bateria de álcoois em concentrações crescentes (de 70 – 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast®¹. Após a secagem dos blocos de parafina eles foram feitos cortes de 0,5 µm e colocados em lâminas. Após esses procedimentos, os cortes

foram submetidos à coloração pelo método de rotina utilizando os corantes hematoxilina e eosina. Após a montagem das lâminas procederam – se as fotomicrografias.

4.3.2 Processamento Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos do pulmão de fetos encaminhados para a microscopia eletrônica de transmissão foram fixados em glutaraldeído 2,5%² em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação o material foi lavado em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,4 três vezes seguidas por 10 minutos e, pós – fixados em tetróxido de ósmio 1%³ por 1 hora. Após consecutivas lavagens em tampão fosfato os materiais foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno⁴.

Os fragmentos permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido e propileno e resina por um período de 12 à 16 horas. A seguir, essa mistura foi substituída por resina pura por 4 à 5 horas. Ao final desse período o material foi embebido em resina pura e colocado em moldes. Uma vez incluídos, os fragmentos permaneceram em estufa a 69° C por 72 horas, para consolidar a polimerização da resina.

Os blocos foram cortados usando-se um ultramicrotomo. Foram obtidos cortes semifinos de 1 µm de espessura que foram corados à quente com solução de borato a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos, com 60 nm de espessura, foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e, pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada por 10 minutos. As observações e eletromicrografias subcelulares foram realizadas em microscópio eletrônico.

4.4 DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA DO SURFACTANTE DE FETO BOVINO

Para a realizarmos a lavagem bronquioalveolar dos fetos bovinos, foi realizada uma incisão na traquéia, na qual se introduziu um cateter e, através deste, solução fisiológica 0,9% (KOGISHI et al.,1998). Em seguida realizou-se massagem para torácica para se obter o lavado pulmonar.

O lavado foi transportado para o laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan para ser centrifugado a 4.000 rpm⁸ por 30 minutos, à temperatura de 4° C. Após essa primeira centrifugação, o sobrenadante foi retirado e em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a 30.000 rpm⁹ por 120 minutos à temperatura de 4° C. O material obtido após a ultracentrifugação foi aliqüotado em amostras com 100 µl cada, colocadas em eppendorf e congeladas para posterior análise bioquímica.

¹ Parablant embedding media _Paraplast plus, Sigma, Oxford

² Glutaraldehyde grade I: 70% aquoso solution- Sigma chemical Co., USA

³ Osmium tetroxide 4 % w/w solutions in water – polyscience, Inc., USA

⁴ Propylene oxide EM grade, Polyciences, Inc, USA

⁵ Spurr Spurr's Kit- electron Microscopy Sciences, Co. USA

⁶ Leica ULTRACUT UCT®.

⁷ Morgagni - modelo 268D, Microscópio Eletrônico de Transmissão – Philips

⁸ Eppendorf Centrifuge 5804R

⁹ Beckman ultracentrifuge L 8-70M

¹⁰ BCA – Protein assay kit” (Pierce)

¹¹ Multiskan EX (Labsystems Uniscience

¹² Low Marker “LM “ (Amersham Biosciences

4.4.1 BCA

Essa análise foi feita utilizando o Kit reagente para ensaio de proteína, segundo as orientações do fabricante. O método utiliza ácido bicinchonínico para detecção colorimétrica e quantificação total de proteína. Esse método combina a conhecida redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} pela proteína em um meio alcalino (reação de biureto) com alta sensibilidade e seletividade de detecção colorimétrica dos cátions cuprosos (Cu^{1+}) usando o ácido bicinchonínico. A cor púrpura da análise é formada pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon Cu^{1+} . O complexo solúvel em água exibe uma forte absorvância a 562nm que é linear com o aumento da concentração de proteína numa faixa de 20 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Instructions BCA Protein Assay Reagent Kit).

Foi utilizado o microensaio que detecta de 5 a 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. Foram pipetados 25 μl de amostra ou padrão (solução de BSA) nos respectivos poços, a seguir foi adicionado 200 μl da mistura do reagente A e B, sendo 50 partes do reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinchonínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 M) com 1 parte do reagente B (4% de sulfato de cobre). A curva padrão de albumina foi preparada seguindo o procedimento descrito no manual Pierce para microensaio. As absorvâncias das amostras e curva padrão foram lidas a 562 NM utilizando um leitor de placas. As concentrações das amostras foram obtidas com base em curva padrão.

4.4.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de Sódio (SDS – PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica bastante utilizada para a análise e caracterização de misturas complexas de proteínas. Essa técnica consiste na separação das proteínas de acordo com o tamanho, a carga e a hidrofobicidade (DUNN, 1993). Esses géis podem ser corados por diferentes métodos e a proteína visualizada diretamente.

Com a finalidade de caracterizar o grau de pureza das amostras obtidas em cada etapa de purificação, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS (LAEMMLI, 1970). A concentração do gel, utilizada, foi de 12,5 %. A quantidade de proteína por amostra variou de 16 a 26 µg para as amostra, que foram diluídas em tampão de amostra contendo β – mercaptoetanol, glicerol, SDS , azul de bromofenol, solução tampão Tris – HCl 0,0625 M. A corrida foi feita em temperatura ambiente, 30 mA, por aproximadamente duas horas. Foi utilizado marcador de peso molecular, com massas moleculares 97 / 66 / 45 / 30 / 20,1 e 14,4 kDa. Após a corrida o gel foi corado pelo método de coloração de prata (BLUM et al, 1987).

Tabela 1 – Fetos coletados e período gestacional estimado conforme as medidas de “Crown – Rump” e seus respectivos pesos – São José dos Campos – SP – 2005-2006

nº amostra	Tamanho do feto (cm)	dias de gestação	Peso (Kg)
1	24,50	125	1,20
2	26,00	126	1,80
3	29,00	136	1,20
4	30,00	138	1,64
5	30,00	138	1,94
6	32,00	142	2,01
7	35,00	148	3,00
8	43,00	166	4,12
9	44,00	170	4,50
10	44,50	170	4,99
11	45,00	173	4,50
12	45,50	173	4,90
13	46,00	175	5,00
14	58,00	198	9,00
15	59,00	200	9,35
16	60,00	205	9,00
17	62,00	210	12,00
18	67,00	220	13,00
19	68,00	220	16,35
20	69,00	220	11,15
21	69,00	220	18,00
22	69,00	220	15,00
23	72,00	233	15,00
24	75,00	235	16,44
25	78,00	235	16,50
26	79,00	235	23,00
27	79,00	235	23,00
28	84,00	246	21,00
29	87,00	250	29,00

Gráfico 1 - Os dados dos fetos coletados foram inseridos no gráfico de crescimento preconizado por Evans e Sack (1973) e Noden e Lahunta (1990)

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Nos fetos com idade gestacional de quatro meses, apresentaram pulmão na fase canalicular onde os brônquios e os bronquíolos apresentam lumen amplo. Os bronquíolos apresentam-se formados por epitélio onde as células são colunares baixas e cílios ausentes, junto do tecido conjuntivo é possível observar nos bronquíolos maiores a presença de uma camada de tecido muscular liso e presença de capilares sanguíneos. (Figuras 1 a 3).

Em fetos com cinco meses de gestação, o pulmão está na fase canalicular, o septo conjuntivo é formado por tecido conjuntivo frouxo vascularizado, na extremidade dos bronquíolos respiratórios observa-se a presença de alvéolos primitivos formados por epitélio cúbico. Em alguns locais podemos notar a presença de células pavimentosas ou pneumócito tipo I e células globosas ou pneumócito tipo II. Observamos ainda que os capilares estão em contato com o epitélio (Figuras 4 a 6)

Aos seis meses gestacionais, o pulmão encontra-se na fase saco terminal, nesse período do desenvolvimento a vascularização pulmonar é mais intensa e já é possível observar na parede do alvéolo a presença de células pavimentosas ou pneumócitos tipo I, juntamente com células globosas os pneumócitos tipo II que estão em menor quantidade (Figuras 7 a 9).

Nos feto com sete meses de gestação o pulmão apresentava-se em fase de saco terminal “avançado” onde os sacos alveolares e os ductos alveolares são visíveis, e as células epiteliais de revestimento estão presentes. Os pneumócitos tipo I estão mais delgados ou com aspecto mais pavimentoso, os capilares alveolares são mais evidentes e estão mais próximos das células epiteliais. Na parede alveolar e no septo alveolar encontramos macrófagos. Notamos a presença de pneumócitos tipo II mais globosos e em algumas células pudemos visualizar a presença de acidofilia citoplasmática (Figuras 10 a 12).

Nos fetos recém nascidos, observamos o pulmão na fase alveolar, com alvéolos definidos, parede alveolar contendo pneumócitos tipo I característicos

(células pavimentosas) estando em contato com os capilares alveolares. Os pneumócitos tipos II também são característicos, com formato globoso. Em alguns macrófagos alveolares presentes no septo alveolar, observamos a presença de material fagocitado no seu interior (Figuras 13 a 15)

Legenda: Bronquíolo respiratório (BT) apresentando a camada muscular (CM) , bronquíolo terminal (BR) vaso sanguíneo (VS), septo conjuntivo (SC) e tecido conjuntivo (TC) contendo capilares (C).

Figura 1 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação

Legenda: Bronquíolo respiratório (BR), no bronquíolo terminal o aparecimento da camada muscular (CM), vaso sanguíneo (VS), septo conjuntivo (SC) e tecido conjuntivo (TC) contendo capilares (C).

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação

Legenda: Bronquíolo respiratório(BT), no bronquíolo o aparecimento da camada muscular (CM), vaso sanguíneo (VS), septo conjuntivo (SC) e tecido conjuntivo (TC).

Figura 3 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com quatro meses de gestação

Legenda: Bronquíolo (B), vaso sanguíneo (VS), septo conjuntivo (SC) e alvéolos primitivos (AP).

Figura 4 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação

Legenda: Alvéolo primitivo (AP), arteríola no estroma pulmonar (A), capilar alveolar (CA) e tecido conjuntivo (TC).

Figura 5 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação

Legenda: Alvéolo primitivo (AP), pneumócito tipo I (I), pneumócito tipo II (II), capilar alveolar (CA) e tecido conjuntivo (TC).

Figura 6 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase canalicular de feto bovino com cinco meses de gestação

Legenda: Septo conjuntivo (SP) contendo veias (V), arteríola no interior do parenquima pulmonar (A), bronquíolo (B) e alvéolo primitivo (AP).

Figura 7 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação

Legenda: Alvéolo primitivo (AP), arteríola no estroma pulmonar (A), capilar alveolar (CA) e tecido conjuntivo (TC).

Figura 8 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação

Legenda: Alvéolo primitivo (AP) contendo pneumócito tipo I (I) e pneumócito tipo II (II), capilar alveolar (CA) e tecido conjuntivo (TC).

Figura 9 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação

Legenda: Bronquíolo (B), ducto alveolar (DA), vênula (V) e arteríola (A)

Figura 10 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação

Legenda: Ducto alveolar (A), saco alveolar (SA), alvéolos primitivos (AP) e capilar alveolar (CA).

Figura 11- Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão
ênfase de saco terminal de feto bovino com sete meses
de gestação

Legenda: Saco alveolar (SA), alvéolos primitivos (AP) contendo pneumócito tipo I (I) e pneumócito tipo II (II), capilares alveolar (CA), macrófago (M) e plasmócito (P).

Figura 12 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação

Legenda: Sacos alveolares (SA) e alvéolos (A).

Figura 13 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar

Legenda: Sacos alveolares (SA), alvéolos (A) e septo alveolar

Figura 14 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar

Legenda: Alvéolos (A), septo alveolar *, pneumócito tipo I (I), pneumócito tipo II (II), macrófago alveolar (MA) e macrófago no septo alveolar (MS), capilar alveolar (CA).

Figura 15 - Fotomicrografia mostrando corte histológico de pulmão de feto bovino recém nascido em fase alveolar

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Em fetos com quatro meses de gestação, o bronquíolo respiratório é formado por um epitélio constituído por células colunares e núcleo localizado no pólo apical da célula. Abaixo do epitélio aparece uma camada de fibras musculares lisas organizadas de forma circular. Externamente a essa camada muscular, observamos o tecido conjuntivo no qual se contendo vários tipos celulares (Figura 16).

No pulmão de fetos com cinco meses de gestação observamos a presença do pneumócito tipo II na parede do alvéolo primitivo apresentando núcleo com aspecto esférico contendo cromatina agrupada no centro, se distribuindo de maneira uniforme até a periferia, em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear, com nucléolo evidente. No citoplasma desses pneumócitos observamos a presença de retículo endoplasmático e vesículas de secreção contendo substância estrolúcida no seu interior. Recobrimo o pneumócito tipo II notamos parte de citoplasma do pneumócito tipo I e separando as duas células uma membrana basal comum (Figura 17). O mesmo foi observado na parede do alvéolo primitivo do pulmão de fetos bovinos apresentando 6 meses de gestação (Figura 18).

Na parede do alvéolo primitivo do pulmão de fetos bovinos com sete meses de gestação observamos pneumócito tipo II contendo corpos lamelares e vesícula de secreção no citoplasma. O núcleo apresenta cromatina agrupada em pequenas áreas no centro e próximas ao envoltório nuclear, com nucléolo evidente. Junto ao pneumócito tipo II observamos o pneumócito tipo I e uma membrana basal comum as duas células, no septo alveolar, a presença de fibrilas de colágeno (Figura 19).

Em recém nascidos o pneumócito tipo II está presente na parede alveolar e possui corpos lamelares típicos, próximos ao pneumócito tipo I e em sua superfície livre. Observamos ainda a presença de microvilosidades na membrana plasmática. O núcleo possui cromatina uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear. Observamos ainda o retículo endoplasmático no citoplasma (Figura 20).

Legenda: Epitélio do bronquíolo respiratório (EP), fibras musculares lisas da camada muscular (FM) e células do tecido conjuntivo (TC).

Figura 16 - Eletromicrografia mostrando pulmão de feto bovino com quatro meses de gestação em fase canalicular

Legenda: Detalhe de um pneumócito tipo II contendo vesículas no seu interior (VS), a membrana plasmática (Mp), no citoplasma a presença do retículo endoplasmático (RE), o núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en), nucléolo (nc). Notar a presença de parte de citoplasma do pneumócito tipo I (*).

Figura 17 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com cinco meses de gestação

Legenda: Detalhe de um pneumócito tipo II contendo vesículas no seu interior (VS), a membrana plasmática (Mp), o núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en), nucléolo (nc). Notar a presença de parte de citoplasma do pneumócito tipo I (*) e a membrana basal comum ao pneumócito tipo I e ao pneumócito tipo II (Mb).

Figura 18 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão em fase de saco terminal de feto bovino com seis meses de gestação

Legenda: Detalhe de um pneumócito tipo II contendo corpos lamelares (CL), vesícula de secreção (VS), a membrana plasmática (Mp), o núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en), nucléolo (nc). Notar a presença da membrana basal (Mb) comum ao pneumócito tipo I e ao pneumócito tipo II e a presença de parte do citoplasma do pneumócito tipo I (*). No tecido conjuntivo do septo alveolar, fibras colágenas (fc).

Figura 19 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo primitivo do pulmão de feto bovino em fase de saco terminal com sete meses de gestação

Legenda: Detalhe de um pneumócito tipo II contendo corpos lamelares (CL), a membrana plasmática com microvilosidades (Mv), o núcleo (N) contendo cromatina (cr) uniformemente distribuída no centro e agrupada na periferia em pequenas zonas próximas ao envoltório nuclear (en), retículo endoplasmático (RE) . Notar a presença do núcleo de um pneumócito tipo I (PI).

Figura 20 - Eletromicrografia mostrando parede de um alvéolo do pulmão de feto bovino com recém nascido em fase alveolar

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A equação fornecida pela curva padrão de BSA para cada amostra de lavado bronco-alveolar analisada aparecem nos gráficos 2 a 6.

Em fetos que apresentaram idade gestacional de 4 meses não há produção de proteínas surfactantes. Pela técnica de eletroforese SDS - PAGE não foi possível a detecção de proteínas no lavado brônco-alveolar, uma vez que não ocorreram a formação de “bandas”, mostrando somente a presença de albumina (Figuras 21).

Lavado brônco-alveolar de fetos com idade gestacional de 5 meses foram analisados pela técnica de eletroforese SDS - PAGE, não sendo detectadas formações de “bandas” de proteínas surfactantes. Havendo somente formação de “bandas” de albumina (Figura 22).

Em fetos com idade gestacional de 6 meses o lavado brônco-alveolar, analisado em eletroforese, apresentou “banda” com massa molecular em torno de 28 kDa, quando visualizadas com coloração de prata, demonstrou presença de proteína surfactante SP – A, iniciando sua síntese pelas células alveolares pneumócitos tipo II (Figura 22)

Em lavado brônquio - alveolar de fetos acima de 7 meses encontramos forte presença de proteína surfactante SP – A, com “bandas” entre 26 e 36 kDa. E um perfil eletroforético muito semelhante ao de um animal recém – nascido (Figura 22).

Os resultados da eletroforese SDS – PAGE do lavado pulmonar do recém – nascido apresentou o mesmo perfil eletroforético de um animal adulto, possuindo as mesmas “bandas”, o que demonstra a presença de todas as proteínas surfactantes: SP - A, SP – B, SP – C e SP – D (Figura 22).

Gráfico 2 - Curva padrão para bovino adulto, recém-nascido e fetos com 8, 7 e 5 meses de gestação

Gráfico 3 - Curva padrão para fetos com 4, 5, 7 e 8 meses de gestação

Gráfico 4- Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação

Gráfico 5 - Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação

Gráfico 6 - Curva padrão para fetos com 4 e 5 meses de gestação

Figura 21- Fotografia de gel SDS-PAGE 12,5% com perfil eletroforético das amostras de lavado bronco – alveolar de fetos bovinos com 4, 5 e 6 meses
Canaletas (1) marcador (2) feto 4 meses (3) feto 4 meses (4) feto 6 meses (5) feto 5 meses (6) feto 5 meses

A **B**

Figura 22 - Perfis eletroforéticos de amostras de lavado bronco – alveolar em gel SDS – PAGE 12,5% de bovino recém nascido, adulto e fetos com 4 , 5 , 7 e 8 meses de gestação (A) Canaletas (1) marcador (2) RN – 30,52 µg (3) RN -15,26 µg (B) Canaletas (1) marcador (2) BA (3) RN (4) feto 5 meses (5) feto 4 meses (6) feto 7 meses (7) feto 8 meses (8) feto 7 meses (9) feto 7 meses

Discussão

6 DISCUSSÃO

O surfactante pulmonar, sintetizado pelo pneumócito tipo II é constituído por glicerofósforolipídeos, proteínas específicas, lipídeos neutros e colesterol. Sua produção é regulada por hormônios e outros fatores, incluindo o ácido retinóico. O início da produção de surfactante ocorre ainda na vida fetal, acredita-se que o surfactante seja imunorregulador, mas sua principal função é a de reduzir a tensão superficial alveolar, facilitando os movimentos respiratórios (O'RAHILLY; MULLER, 2005).

É importante ressaltar que a maturação pulmonar fetal está na dependência da adaptação pulmonar em se transformar de órgão secretor em um de trocas gasosas e na produção adequada de surfactante. Moore e Persaud (2004), Sadler (2005), O'Rahilly e Muller (2005), classificam a maturação pulmonar em quatro fases, sendo a primeira delas a fase pseudoglandular, onde ocorre a diferenciação das vias aéreas, o surgimento das células ciliadas típicas, não ciliadas, globosas e basais na primeira porção proximal. As glândulas mucosas estão presentes juntamente ao desenvolvimento das conexões vasculares, estando os capilares fundidos, contendo tecido intersticial.

Iniciamos nossos estudos com fetos em idade gestacional de 4 meses, visto que em idade inferior a essa não tínhamos estruturas pulmonares relacionadas com a síntese de surfactante, objetivando assim obter referências morfológicas e bioquímicas antes do início da síntese. Nesses fetos visualizamos um pulmão na fase canalicular contendo brônquios e bronquíolos com lúmen amplo e epitélio contendo células colunares baixas e ausência de cílios. Junto do tecido conjuntivo observamos a presença de uma camada de tecido muscular liso e capilares sanguíneos. Nossos achados diferem-se dos descritos pelos autores acima, uma vez que estes se encontram em períodos diferentes, no entanto a fase canalicular em bovinos mostra-se com características primárias quando comparadas ao período pseudoglandular, com ausência de células ciliadas, característica esta que deveria estar presente durante esta fase do desenvolvimento.

Já, fetos com 5 meses de gestação apresentavam pulmão em fase canalicular, onde verificamos rápida diferenciação celular, a fim de tornar a luz

bronquial mais ampla e presença de alvéolos primitivos na extremidade, constituídos por epitélio cúbico. Acreditamos ser estas características marcantes para o surgimento de células alveolares (pneumócitos tipo II), futuros responsáveis pela síntese de proteínas. No entanto Burri (1984), complementa nossos achados quando descreve que nesta fase os bronquíolos terminais originam os bronquíolos respiratórios, os quais dividem-se formando os ductos alveolares e sacos alveolares em suas paredes.

Ao observarmos capilares em íntimo contato com epitélio concordamos com os achados de Burri (1984) ao relatar que o crescimento periférico das vias aéreas é acompanhado pelo aumento da capilarização, onde no início os capilares formam uma rede solta no parênquima e a seguir estabelecem pontos de contato com o epitélio cuboidal.

O pulmão de feto com 6 meses de gestação foi por nós classificado em fase de saco terminal, pois a vascularização se tornou mais intensa, sendo possível observar na parede células pavimentosas (pneumócitos tipo I) e células globosas (pneumócitos tipo II). Apesar das características acima citadas já estarem presentes na fase canicular, insistimos por classificar em período de saco terminal devido aos resultados de análise bioquímica, pois demonstram a presença de proteína surfactante (SP-A), o que indica o início de síntese de proteínas pelos pneumócitos tipo II.

Tal processo responsável pela síntese de proteínas em pulmão de feto bovinos com idade gestacional de 6 meses provavelmente, deve-se a presença do retículo endoplasmático e vesículas de secreção encontradas no citoplasma dos pneumócitos tipo II.

Classificamos como fase saco terminal “avançado” feto com idade gestacional de 7 meses, contendo sacos e ductos alveolares visíveis e células epiteliais de revestimento. Os pneumócitos tipo I estão mais delgados e capilares alveolares estão mais evidentes e próximos das células epiteliais, o que talvez promova uma maior nutrição do tecido em desenvolvimento (GOERKE, 1998), confirmam nossos achados; no entanto acrescentamos ainda a presença de macrófagos e acidofilia citoplasmática presente no pneumócito tipo II.

Complementamos ainda, com presença de corpos lamelares e vesículas secretoras no citoplasma, núcleo com cromatina e nucléolo evidente. Tais informações nos levam a acreditar no aumento da síntese protéica, uma vez que o envoltório nuclear contém ribossomos e é contínua com o retículo endoplasmático rugoso. Comprovamos através de teste bioquímico com perfil eletroforético muito semelhante ao de um animal recém-nascido, o que provavelmente nos indica a presença de várias proteínas surfactantes. Moore e Persaud (2004) e O’Rahilly e Muller (2005) complementam discrevendo a participação do pneumócito tipo II na síntese de fosfatidilcolina disaturada, sendo este produto encontrado nos corpos lamelares.

Burri (1984) conclui que com o desenvolvimento e maturação do sistema de surfactante durante o estágio sacular as chances de sobrevivência de um feto prematuro são maiores.

A quarta e última fase é o período alveolar, que ocorre ao final do período fetal, quando os pulmões são capazes de realizar as trocas de forma eficiente (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLLER, 2005). Em nossos estudos com recém nascidos podemos observar pulmão em fase alveolar, contendo alvéolos definidos e presença de pneumócito tipo I em contato com capilares alveolares. Já pneumócitos tipo II apresentam formato globoso, contendo corpos lamelares, no pólo celular voltado para a luz do alvéolo, presença de microvilosidades na membrana plasmática e no citoplasma, presença do retículo endoplasmático e seu núcleo com cromatina frouxa, tais evidências indicam a atividade de síntese na célula)

Provavelmente essas microvilosidades são bicamadas lipídicas formadas principalmente por fosfolipídios contendo quantidade variável de moléculas protéicas, sendo mais numerosas nas membranas com maior atividade funcional; explicando a necessidade de constante renovação da camada surfactante, uma vez que o órgão entra em funcionamento contínuo.

Os testes bioquímicos concluíram ainda que o recém nascido apresenta proteínas surfactantes semelhante ao animal adulto.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1 - O pulmão de fetos com 4 meses de gestação encontram-se no estágio canalicular, com presença de brônquios e bronquíolos terminais.

2 - As análises bioquímicas demonstram que o pulmão desses fetos ainda não está apto para sintetizar proteínas surfactante.

3 - O pulmão de fetos com idade gestacional de 5 meses encontram-se no início da fase saco terminal, com presença de capilares e alvéolos primitivos.

4 - Nas análises bioquímicas do lavado bronquioalveolar dos fetos de 5 meses, não houve formação de “bandas” que indicasse a presença de proteínas surfactantes.

5 – Em pulmão de fetos com idade gestacional de 6 meses, encontramos uma vascularização mais intensa, com presença de células pavimentosas ou pneumócitos tipo I e células globosas ou pneumócitos tipo II.

6 – Os resultados da análise bioquímica indicaram a presença de proteína surfactante, mais precisamente SP – A.

7 – Os fetos com idade gestacional de 7 meses, possuem pulmão em estágio de saco terminal mais adiantado, com capilares alveolares mais evidentes e mais próximos do epitélio, presença de macrófagos, os pneumócito tipo I estão mais definidos e os pneumócitos tipo II encontram-se mais globosos.

8 - Na microscopia eletrônica de transmissão encontramos a presença de pneumócitos tipo II com corpos lamelares, indicando a presença de surfactante.

10 – As análises bioquímicas indicaram a presença de proteínas surfactantes, sendo que o perfil eletroforético das amostras mostrou-se semelhante ao perfil de um animal adulto.

11 – Os animais recém – nascidos possuem o pulmão em fase alveolar, com pneumócitos tipo I bem definidos e em contato com os capilares alveolares, os pneumócitos tipo II estão bem globosos e definidos.

12 – Na microscopia eletrônica de transmissão do pulmão de um animal recém – nascido, encontramos pneumócitos tipo II com corpos lamelares, complexos de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo grande e definido.

13 – Nas análises bioquímicas encontramos um perfil eletroforético igual ao de um animal adulto

14 - Para um animal nascido precocemente, a partir dos 7 meses de gestação, é viável sua sobrevivência, pois o pulmão possui todas as características necessárias para a síntese de proteínas surfactantes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93 -99, 1987.

BRASCH, F.; JOHNEN, G.; WINN – BRASCH, A. ; GUTTENTAG, S. H.; SCHMIEDL, A.; KAPP, N; SUZUKI, Y.; MÜLLER, K. M.; RICHTER, J.; HAWGOOD, S. E OCHS, M.: Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra – alveolar surfactant forms of human lungs **American Journal Respiration Cellular Molecular Biology**, v. 30,p. 449-458, 2004.

Burri, P. H. : Fetal and postnatal development of the lung. **Annual Reviews Physiology**, v. 46, p 617 – 629, 1984.

Diretrizes para apresentação da dissertação e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 4 ed. São Paulo: Revista atualizada e ampliada, 2003, 84 p.

DUNN, M. J. Determination of total protein concentration. In: HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. Protein purification methods a practical approach. 4 ed. Oxford: **Oxford University Press**, p.10-16, 1993.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WESING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. [sn.] Elsevier, 813p, 2004.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal developmental of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External features and Selected References. **Anatomy, Histology, Embryology**, v. 2, p. 11 – 45, 1973.

GOERKE, J.: Lung surfactant. **Biochim Biophys Acta** v. 344, p. 241-61, 1974.

GOERKE, J. e CLEMENTS, J. A. :Alveolar surface tension and lung surfactant. **Handbook of Physiology**, section 3: The Respiratory system , vol III, Part I, American Physiology Society, p. 247 – 261,1986

GOERKE, J.: Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. **Biochimica and Biophysica Acta**, v 1408, p. 79 – 89, 1998.

HAFEZ, E.S.E. E HAFEZ, B.: **Reprodução Animal**, 7º edição, São Paulo,ed. Manole , 513 p, 2004.

HALL, S.B; WANG, Z.; NOTTER, R.H.: Separation of subfractions of the hydrophobic components of calf lung surfactant. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p.1386 – 1394, 1994

HAWGOOD S., BENSON B.J., SCILLING J., DAMM D. , CLEMENTS J.A., WHITE R.T.: Nucleotide and amino acid of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. **Proc Natl Acad Sci USA** ,v. 84, p. 66-70, 1987.

HAWGOOD, S.: Surfactant composition, structure and metabolism. **In the Lung: Scientific Foundations**, v. 2, p. 557–571, 1997.

HAWGOOD, S. E SHIFFER, K.: Structures and properties of the surfactant – associated proteins. **Annual Rev. Physiology**, v. 53, p. 375-394, 1991.

HILFER, S. R. : Morphogenesis of the lung: controlo f embryonic and fetal branching. **Annual Rev. Physiology**, v. 58, p. 93–113, 1996.

JUNQUEIRA, L.C. E CARNEIRO. J.: **Histologia Básica**, 10º edição (ed. Guanabara Koogan S.A.) 388 p, 2004

KING R. J., KLASS D. J., GIKAS, E, G., CLEMENTS J. A.: Isolation of apoproteins from canine surface active amterial . **American Journal of Physiology**, v. 224, p. 788 –795, 1973.

KOGISHI, K.; KUROZUMI, M.; FUJITA, Y.; MURAYAMA, T.; KUZE, F. AND SUZUKI, Y.: Isolation and partial characterization of human low molecular weight protein associated with pulmonary surfactant. **American Review Respiratory Disease**, v. 137, p. 1426-1437, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v.227, p. 680-685,1970

MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**, 7º edição (Elsevier Editora LTDA), 609 p, 2004.

NIJSSEN, J. G.; PROMES, L. W.; HARDEMAN, D.; VAN DEN BOSCH, H.: Phospholipid-protein interactions in rat lung lamellar bodies. **Biochim Biophys Acta**, v. 917, p. 140-9, 1987.

NODEN, D.M. E DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**, 1º edição (ed Acribia), 399 p, 1990.

NOTTER, R. H.: Pulmonary Surfactant. **Elsevier Science Publishers**, p17-65,1984

OSANAI, K.; MASON, R. J.; VOELKER, D. R. Trafficking of newly synthesized surfactant protein A in isolated rat alveolar type II cells. **American Journal Respiration Cellular Molecular Biology**, v. 19, p. 929 – 935, 1998.

OCHS, M.; JOHNEN, G; MÜLLER,K. M.; WAHLERS, T.; SAWGOOD, S.; RICHTER, J.; BRASCH, F. Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP – A) in the perenchymal region of the human lung. **American Journal Respiration Cellular Molecular Biology**, v. 26, p. 91–98, 2002.

PASCHEN, C.; GRIESE, M. Quantification of surfactant protein B by HPLC in bronchioalveolar lavage fluid. **Journal of Cromatography**, v. 814,p. 325-330, 2005.

PHELPS, D. S.; SMITH, L.M.; TACUSCH, H. W. Characterization and partial amino acid sequence of a low molecular weight surfactant protein . **American Review Respiratory Disease**, v.135, p.1112-7, 1987.

PHIZACKERLEY, P. J. R.; TOWN, M. H.; NEWMAN, G. E. Hydrophobic proteins of lamellated bodies isolated from pig lung. **Biochim Journal**, v.183, p. 731-6, 1979.

POSSMAYER, F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant – associated proteins. **American Review Respiratory Disease**, v.138, p. 990-998, 1988.

PRINGLE, K. C. Human fetal lung developmental and related animal models. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.3, p. 502-513, 1986.

SANDLER, T. W. **Jan Langman - Embriologia médica**. 9ª. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 347 p 2005.

SMITH, B. T. e SABRY, K. Glucocorticoid – tyreoid synergism in lung maturation: a mechanism involving epithelial – mesenchymal interation. **Developmental Biology**, v. 80, p. 1951- 1954. 1983.

SUZUKI, Y.; CURSTEDT, T. ; GROSSMANN, G. The role of the low molecular weght (≤ 15.000 daltons) apoproteins of pulmonary surfactant. **European Journal Respiratory Disease**, v. 69, p. 336-45. 1986.

SUZUKI, Y.; NAKAI E.; OHKAWA K. Experimaental studies on the pulmonary surfactant. Reconstitution of surface active material. **Journal Lipid Res**, v.23, p. 53-61, 1982.

TAKAHASHI, A.; FUJIWARA, T. Proteolipid in bovine surfactant:its role in surfactant function. **Biochim Biophys Res Común**, v. 135, p. 527-32, 1986.

YU, S. H.; POSSMAYER, F. Reconstitution of surfactant active by using the 6k Da apoprotein associated with pulmonary surfactant. **Biochem Journal**, v. 236, p. 85-9, 1986.

YU, S. H.; POSSMAYER, F. Role of bovine pulmonary surfactant- associated proteins in the surface – active property of phospholipids mixtures. **Biochim Biophys Acta**, v. 1046, p. 233–241, 1990.

WHITSEU J. A.; OHNING, B. L.; ROSS, G.: Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importante for biological activity in lung surfactant extracus used for replacement therapy. **Pediatric Respiratory**, v.20, p. 460-7, 1986.

WRIGHT, J. R.: Immunomodulatory functions of surfactant. **Physiology Review**, v. 77, p. 931 – 962, 1997.

WRIGHT, J. R.; WAGER, R. E ; HAWGOOD, S. ; DOBBS, L.; CLEMENTS, J. A. : Surfactant apoprotein Mr=26,000 – 36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. **Journal Biology Chem**, v. 266, p. 2888 – 2894, 1987.

WU, H.; KUSMENKO, A.; SCHAFFER, L.; WEISS, A.; FISHER, J. H.; KIM, K. S.; MCCORMACK, F. X. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of gram – negative bacteria by increasing membrane permeability. **Journal Clinical Investigation**,v. 111, p. 1589 – 1602, 2003.