JULIETA ESPERANZA OCHOA-AMAYA

**Efeitos da hiperprolactinemia
sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar**

São Paulo

2015

JULIETA ESPERANZA OCHOA-AMAYA

Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

Coorientador:

Profa. Dra. Ana Paula Ligueiro de Oliveira

São Paulo

2015

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.3249
FMVZ

Ochoa-Amaya, Julieta Esperanza
Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar /
Julieta Esperanza Ochoa-Amaya. -- 2015.
172 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio.

Coorientador: Profa. Dra. Ana Paula Ligueiro de Oliveira.

1. Asma. 2. Prolactina. 3. Domperidona. 4. Pulmão. I. Título.

ERRATA

OCHOA-AMAYA, J. E. **Effects of hyperprolactinemia and pulmonary allergic inflammation in rats.** 2015. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	3º parágrafo	2016	2015
	4º parágrafo	2015	2016
Abstract	3º parágrafo	2016	2015
	4º parágrafo	2015	2016
Resumen	3º parágrafo	2016	2015
	5º parágrafo	2015	2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar", protocolado sob o nº 2689/2012, utilizando 175 (cento e setenta e cinco) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Effects of hyperprolactinemia on the allergic pulmonary inflammation", protocol number 2689/2012, utilizing 175 (one hundred seventy-five) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OCHOA-AMAYA, Julieta Esperanza

Título: **Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, digno de receber toda a honra, a glória, a força e o louvor

AGRADECIMENTOS

A Deus, quem cumpre o que promete..."Saia da sua terra, do meio dos seus parentes e da casa de seu pai, e vai para a terra que eu lhe mostrarei"...Obrigada meu amado Deus, por uma vez mais, ter me trazido à terra onde há leite e mel com fartura.

Meus sinceros agradecimentos a todas aquelas pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por abrir as portas permitindo meu ingresso no doutorado.

A Universidad de los Llanos pelo apoio financiero e por dar-me a oportunidade de fazer o doutorado como capacitação docente.

Ao Professor Doutor Luciano Freitas Felício, meu orientador e amigo, por ser o instrumento e canal de benção que Deus usou para que isto fosse uma realidade. Obrigada Doutor Luciano Freitas Felício, que estendeu suas mãos e fez possível estar aqui no Brasil, na Universidade de São Paulo. Sem sua ajuda isto não tivesse acontecido. Obrigada por me receber e acolher-me como orientada em seu laboratório, em sua equipe de pesquisa e em suas reuniões de laboratório. Obrigada pela oportunidade que me ofereceu de ser sua orientada na execução deste trabalho e por acreditar que era possível desenvolver o mesmo, dando-me o apoio necessário para a elaboração dele. Obrigada pelo carinho de sempre, fazer-me sentir em meu segundo lar, sentir seu país como meu país. Obrigada pela orientação, direcionamento, dedicação contínua e constante, horas e horas revisando meu português, corrigindo, acrescentando, ensinando, por estar sempre presente no momento certo. Aprendi muito do doutor, na convivência destes quatro anos de doutorado, tanto no âmbito acadêmico como no olhar da vida, pelo seu exemplo de vida e seu profissionalismo, seus ensinamentos e dedicação. Minha gratidão, afeto e sincero apreço.

Ao Professor Doutor João Palermo Neto, por ser o gestor da ideia da pesquisa inicial. Por acreditar em mim e dar-me a oportunidade de executar em seu laboratório parte de meus experimentos. Obrigada Doutor João Palermo Neto por ser meu parecerista avaliador de todos os relatórios. Por todas as sugestões que sempre o Doutor Palermo fez para melhorar o meu trabalho, pelas conversas e sugestões que o doutor fez com meu orientador, e pela orientação e direcionamento do doutor na pesquisa para que tudo desse certo. Obrigada pela contribuição em todas as etapas deste trabalho, e pela acolhida em seu grupo de neuroimunomodulação, em suas *referatas*.

A minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Paula Ligeiro de Oliveira, do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil. Meus agradecimentos por aceitar-me como coorientada, pelo carinho, pelo exemplo de profissionalismo, por ensinar-me a desenvolver o modelo experimental de alergia pulmonar, pela sua ajuda na realização dos experimentos, horas e horas de trabalho, pela sugestões e orientação na pesquisa e por dosar citocinas, dos experimentos no seu laboratório. Obrigada Doutora Ana Paula simplesmente por tudo.

Meus agradecimentos à Professora Doutora Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, porque graças a carta de recomendação e sua referencia consegui vir aqui para o Brasil pelo Programa de Estudantes-Convenio de Pós-Graduação. Obrigada pela orientação e acolhida nas *referatas* do grupo de neuroimunomodulação sob a direção do Professor Doutor João Palermo, Professor Doutor Frederico Costa Pinto e da Doutora Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes. Obrigada pelo carinho de sempre, a confiança, a orientação e a contribuição em todas as etapas deste trabalho. Por permitir-me usar seu laboratório de Farmacologia para a execução de experimentos de citometria, ELISA, HPLC. Obrigada por seu apoio, hospitalidade e generosidade.

Ao Professor Doutor Paulo César Maiorka, porque graças a carta de recomendação que deu para o PEC-PG e sua referencia consegui vir aqui para o Brasil pelo Programa de Estudantes-Convenio de Pós-Graduação. Obrigada Doutor pela

amizade e exemplo de profissionalismo como patologista e docente. Obrigada por seu apoio, hospitalidade e generosidade.

Ao Professor Doutor Rodolfo de Paula Vieira, Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil. Obrigada pela orientação na parte de morfometria pulmonar e por seus ensinamentos no uso do programa Image-Pro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Também agradeço pela contribuição em todas as etapas desta pesquisa.

A Doutora Nicolle Queiroz-Hazarbassanov, obrigada pela ajuda na realização dos experimentos, pela orientação na estatística, pela ajuda na tradução de alguns dos muitos artigos que discutimos, pelas conversas de amigas que tivemos. Obrigada por seu carinho e por estar presente sempre disposta a ajudar, a explicar, a ouvir. Obrigada pela amizade e pela convivência nesses quatro anos.

Aos professores do Departamento de Patologia por seus ensinamentos e colaboração constantes, e por permitirme fazer o PAE na Patologia Geral e Patologia Animal. Aprendi muito do profissionalismo da equipe de patologistas do VPT.

A professora Doutora Janete Aparecida Anselmo Franci pelas dosagens da prolactina no Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, SP.

Ao Doutor Jorge Camilo Flório, pela colaboração constante no Laboratório de Farmacologia nas dosagens das catecolaminas plasmáticas no HPLC e pela orientação na parte estatística deste trabalho. Também obrigada pelas conversas amigas e seu assessoramento, disponibilidade e prontidão para estender sua mão e ajudar no momento preciso.

A Vagner Gonçalves Junior, técnico no Laboratório de Farmacologia Aplicada, obrigada pela colaboração constante no laboratório na preparação dos fármacos. E

pela ajuda na sala de cultura com os explantes do pulmão. Obrigada pela amizade e as conversas amigas.

A Magali Caetano de Souza e Regina Vidal, técnicas do laboratório do Doutor Luciano Freitas Felicio, por sua ajuda na execução dos experimentos.

A meus colegas de pós-graduação Eduardo Kenji Hamasato, Carla Nappo Tobaruela, Lilian Namazu, Marianne O. Klein, Rafael Margato, Atilio Calefi, Larissa Marino como estudante de iniciação científica, a Ana Paula Lima, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

A todos os funcionários do Biotério e dos laboratórios de Farmacologia Aplicada e dos Departamentos de Patologia do VPT, pela ajuda e cooperativismo na realização deste trabalho.

A todos os funcionários da Biblioteca da FMVZ USP, em especial a dona Elza Faquim, pessoa especial, colaboradora. Às secretarias do VPT, a Adri Margarido e Milena Oliveira, por sua amizade e companherismo, agradável convívio e momentos de descontração no VPT.

Ao PEC-PG-Programa de Estudantes-Convenio de Pós-graduação pelo apoio financeiro para meu sustento no Brasil.

Aos meus amados irmãos da Igreja Batista, sob o pastoreio do Pastor Helton Cumming e sua senhora esposa Eliaci Cumming. Muito obrigada porque eles me deram a acolhida na Igreja e nunca senti estar só aqui no Brasil. Conteí sempre com sua ajuda e seu respaldo, formando parte de uma grande família na Fé aqui em São Paulo, Brasil. Fui muito abençoada no estudo da Palavra de forma fiel e verdadeira tal como está nas Escrituras. Sempre tive a cobertura espiritual e o apoio em todo momento, sempre prestos para ouvir e para me aconselhar. Amo muito a vocês e agradeço a Deus por me permitir formar parte da comunidade. Sempre estarão em meu coração.

A minhas irmãs na Fe, Enit Nuñez, Eulalia Rojas, Margarita Mina e FerNelly Quivano pela cobertura espiritual e suas orações desde Colombia, para mim e para minha família.

A Pablo Emilio Cruz, obrigada por tudo o respaldo que me deu ante a Universidad de los Llanos e pelo cuidado de nossos filhos, para poder ter a tranquilidade suficiente para estudar e desenvolver esta pesquisa.

A meus amados filhos por estar continuamente perto do meu coração apesar da distância, sempre comigo. Por poder compreender minhas ausências e meu desejo de superação. Amo vocês Ana Maria Cruz Ochoa, Natalia Andrea Cruz Ochoa e Pablo Felipe Cruz Ochoa.

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores. Se não houver flores, valeu a sombra das folhas. Se não houver folhas, valeu a intenção da semente” Henfil

RESUMO

OCHOA-AMAYA, J. E. **Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar.** [Effects of hyperprolactinemia and Pulmonary allergic inflammation in rats]. 2016. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Objetivo: Foi investigada a hipótese da hiperprolactinemia modular a resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratos machos e em fêmeas lactantes sem tratamento de domperidona. **Métodos:** Em ratos machos, a hiperprolactinemia foi de curta duração (5 dias) induzida pela domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ por dia, *i.p.*). A resposta alérgica foi gerada por sensibilização e desafios inalatórios com ovoalbumina. Foi feita contagem de leucócitos totais e diferenciados do lavado bronco alveolar (BAL), lavado medular femoral (BFL) e sangue; a percentagem de produção de muco e colagênio no pulmão, níveis de corticosterona e prolactina e citocinas TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, em explantes de pulmão e IFN γ no BAL, foram medidos. Pela citometria foram avaliados os receptores de prolactina; **Resultados:** Hiperprolactinemia de curta duração feita antes do desafio inalatório diminuiu a resposta alérgica pulmonar na contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar. Esse tratamento reduziu a celularidade no BFL e a percentagem de muco e aumentou a expressão de citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF α e da expressão do IFN γ . Níveis altos de prolactina diminuíram o número de eosinófilos ao pulmão no BAL. Pela citometria revelou-se que além de ter menor número de granulócitos migrados ao pulmão, estes apresentaram maior expressão do número de receptores por granulócito para prolactina no grupo tratado com domperidona. Alterações similares foram reveladas em fêmeas lactantes como foi a diminuição nos leucócitos do BAL, e no número de células do BFL. O tratamento profilático diminuiu a resposta alérgica tanto no grupo hiperprolactinêmico como no grupo veículo. O tratamento feito após o desafio inalatório não evidenciou alterações relevantes nas variáveis medidas. **Conclusões:** A hiperprolactinemia de curta duração, feita após a sensibilização e antes da inalação diminui a resposta inflamatória no pulmão em ratos. Os resultados deste estudo demonstram que a hiperprolactinemia induzida antes do desafio antigênico diminui a inflamação alérgica pulmonar. Assim, é provável que a prolactina endógena tenha um papel relevante como um imunomodulador da asma. Este estudo aponta a possibilidade futura do uso da

domperidona para pacientes asmáticos. Durante a primavera muitas espécies de mamíferos têm seus filhotes e ocorre abundância de fatores alérgenos no ar. Logo, um fator endógeno que favoreça a proteção de fêmeas durante a lactação, tal como a hiperprolactinemia, tem elevado valor adaptativo.

Palavras-chave: Asma. Prolactina. Domperidona. Pulmão.

ABSTRACT

OCHOA-AMAYA, J. E. **Effects of hyperprolactinemia and pulmonary allergic inflammation in rats.** [Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar]. 2016. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Objective: It was investigated if hyperprolactinemia has modulatory actions on lung allergic inflammatory response in male rats. Lactating female rats were tested for pulmonary allergy as well. **Methods:** In male rats, short-term (5 days) hyperprolactinemia was induced by domperidone (5.1 mg.kg⁻¹ per day, ip). Allergic response was generated by sensitization and inhalation challenge with ovalbumin. Total and differential leukocytes bronchoalveolar lavage (BAL), femoral medullary lavage (BFL) and blood; the percentage of collagen and mucus production in the lungs, plasma levels of corticosterone and prolactin cytokines and TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ explants lung and BAL, were measured. Flow cytometry was used to evaluate prolactin receptor; **Results:** Short-term hyperprolactinemia made before the inhaled challenge reduced the pulmonary allergic response in white blood cell counts in BAL. This treatment reduced the cellularity in BFL and the percentage of mucus and increased expression of cytokines IL-4, IL-6, IL-10, TNF α and IFN γ expression. High prolactin levels decreased the number of eosinophils to the lung in BAL. There were fewer granulocytes migrated to the lung. These granulocytes showed higher expression prolactin receptors in hyperprolactinemia animals. Similar changes were revealed in lactating females. In these animals, there was a reduction in BAL leukocyte, and the number of cells BFL. Prophylactic treatment decreased the allergic response in both hyperprolactinemic and vehicle groups. The treatment made after inhalational challenge did not induce significant changes in the variables measured in this study. **Conclusions:** Short-term hyperprolactinemia, made after sensitization and before inhalation, decreases the inflammatory response in the lung of rats. The results of this study demonstrate that hyperprolactinemia, induced before antigen challenge, decreases pulmonary allergic inflammation. Thus, it is probable that the endogenous prolactin has an important role as an immunomodulator of asthma. This study points out the prospect of a future use of domperidone for asthmatic patients. For various mammalian species, parturition

occurs during springtime. Pollen in the air might be an abundant allergic factor during springtime. Thus, protecting lactating females against this type allergy might have high adaptive value.

Keywords: Asthma. Prolactin. Domperidone. Lung

RESUMEN

OCHOA-AMAYA, J. E. **Efectos de la hiperprolactinemia sobre la inflamación alérgica pulmonar en ratas Wistar.** [Efeitos da hiperprolactinemia sobre a inflamação alérgica pulmonar em ratos Wistar]. 2016. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Objetivo: Fue investigada la hipótesis de que la hiperprolactinemia modula la respuesta inflamatoria alérgica pulmonar en ratas machos y en hembras lactantes sin tratamiento de domperidona. **Métodos:** En ratas machos, la hiperprolactinemia fue de corta duración (5 días) inducida por la domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ por día, i.p). La respuesta alérgica fue generada por sensibilización y desafíos inhalatorios con ovoalbumina. Fue hecho conteo total de leucocitos y diferencial del lavado bronco alveolar (BAL), lavado medular femoral (BFL) y sangre; el porcentaje de producción de moco y colágeno en el pulmón, niveles de corticosterona, prolactina y citocinas TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, en explantes de pulmón e IFNg en BAL, fueron medidos. Por la citometria fueron evaluados los receptores de prolactina; **Resultados:** Hiperprolactinemia de corta duración hecha antes del desafío inhalatorio disminuyó la respuesta alérgica pulmonar en el conteo de leucocitos en el lavado broncoalveolar. Ese tratamiento redujo la celularidad en el BFL y el porcentaje de moco y aumentó la expresión de citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF α y de la expresión del IFNg. Niveles altos de prolactina disminuyeran el número de eosinófilos al pulmón en el BAL. Por la citometria se reveló que además de tener menor número de granulócitos migrados al pulmón, éstos presentaron mayor expresión del número de receptores por granulocito para prolactina en el grupo tratado con domperidona. Alteraciones similares fueron reveladas en hembras lactantes como fue la disminución en los leucocitos del BAL, y el número de células del BFL. El tratamiento profiláctico disminuyó la respuesta alérgica tanto en el grupo hiperprolactinéxico como en el grupo vehículo. El tratamiento hecho después del desafío inhalatorio no evidencio alteraciones relevantes en las variables medidas. **Conclusiones:** La hiperprolactinemia de corta duración, hecha después de la sensibilización y antes de la inhalación disminuye la respuesta inflamatoria en el pulmón en ratas. Los resultados de este estudio demuestran que la hiperprolactinemia inducida antes del desafío antigénico disminuye la inflamación alérgica pulmonar. Así, es probable que la prolactina endógena tenga un papel relevante como un inmunomodulador del

asma. Este estudio apunta la posibilidad futura del uso de la domperidona para pacientes asmáticos. Durante la primavera muchas especies de mamíferos tienen sus hijos y ocurre abundancia de factores alérgenos en el aire. Luego, un factor endógeno que favorezca la protección de hembras durante la lactación, tal como la hiperprolactinemia, tiene elevado valor adaptativo.

Palabras-clave: Asma. Prolactina. Domperidona. Pulmón.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental do efeito da hiperprolactinemia de curta duração, antes do desafio ao antígeno, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina	67
Figura 2 -	Delineamento experimental do efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina	69
Figura 3 -	Delineamento experimental do efeito da hiperprolactinemia de curta duração, antes da sensibilização, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina	71
Figura 4 -	Delineamento experimental da hiperprolactinemia de curta duração na resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pelo ovo albumina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato	73
Figura 5 -	Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes do desafio da OVA-inalações sobre o numero total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL).....	77
Figura 6 -	Efeitos de cinco dias de tratamento com Domperidona antes da OVA-inalações sobre o número total de células presentes no sangue	78
Figura 7 -	Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.....	78
Figura 8 -	Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número total de células presentes na medula óssea	79

Figura 9 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos.....	80
Figura 10 - Peso absoluto (mg) das glândulas adrenais em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes das OVA-inalações	81
Figura 11 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes das OVA-inalações	82
Figura 12 - Efeitos do tratamento com domperidona antes das inalações com ovoalbúmina (OVA) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.....	83
Figura 13 - Efeitos da domperidona antes das inalações com ovoalbumina (OVA) sobre os níveis plasmáticos da prolactina.....	84
Figura 14 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar. Carência do efeito da domperidona sobre o aumento da deposição de colágeno peribronquiolar.....	85
Figura 15 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar	86
Figura 16 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar. Domperidona inibe o aumento inducido pela ovoalbumina na deposição de muco peribronquiolar	87

Figura 17 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar.....	87
Figura 18 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre a geração de IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α nos sobrenadantes do pulmão em cultura e IFN γ no lavado broncoalveolar em ratos alérgicos. A domperidona aumenta a IL-4, IL-6, IL-10 nos sobrenadantes dos explantes do pulmão.....	89
Figura 19 - Correlação entre níveis de prolactina e eosinófilos migrados ao pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA.....	90
Figura 20 - Níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovoalbúmina, sobre a resposta alérgica pulmonar.....	91
Figura 21 - Correlação entre níveis de adrenalina e corticosterona ao pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA.....	93
Figura 22 - Imunohistoquímica receptor P2X7 em pulmão de ratos sensibilizados e desafiados com OVA	94
Figura 23 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) sobre o diferencial morfométrico do pulmão de ratos	95
Figura 24 - Citometria de fluxo para o receptor de prolactina e intensidade de fluorescência média da expressão do receptor de prolactina (MFI) nas diferentes populações de células no lavado broncoalveolar em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg ⁻¹) antes das OVA-inalações	98

Figura 25 - Citometria de fluxo para o receptor de prolactina e intensidade de fluorescência média da expressão do receptor de prolactina (MFI) nas diferentes populações de células no lavado medular femoral em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes das OVA-inalações	99
Figura 26 - Efeitos da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL).....	101
Figura 27 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes no sangue.....	102
Figura 28 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do recuento diferencial de células no sangue	102
Figura 29 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes na medula óssea	103
Figura 30 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do recuento diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos	104
Figura 31 - Peso absoluto (mg) das glândulas adrenais em ratas naive, alérgicas virgens e lactantes após o desafio inalatório com a OVA.....	105
Figura 32 - Quantificação de citocinas TNF- α e IFN γ presente no lavado bronco-alveolar (BAL), geradas após o desafio inalatório com ovoalbúmina (OVA) em ratas naive e alérgicas virgens e lactantes.....	106

Figura 33 - Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) de ratas naive e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar	107
Figura 34 - Níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina (ng/ml) de ratas naive e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar.....	108
Figura 35 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o numero total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL)	110
Figura 36 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número total de células presentes no sangue	111
Figura 37 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.....	111
Figura 38 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número total de células presentes na medula óssea.....	112
Figura 39 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos	113
Figura 40 - Peso absoluto das glândulas adrenais (mg) em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes da OVA-imunização	114
Figura 41 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes da OVA-imunização	115

Figura 42 - Níveis plasmáticos de corticosterona (pg/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbúmina, sobre a resposta alérgica pulmonar.....	116
Figura 43 - Níveis plasmáticos de prolactina (ng/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbúmina, sobre a resposta alérgica pulmonar	117
Figura 44 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar	118
Figura 45 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar	118
Figura 46 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de moco na resposta alérgica pulmonar	119
Figura 47 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar	120
Figura 48 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da imunização (OVA) sobre a geração de IL-4, IL-6, IL-10 TNF α e IFN γ em ratos alérgicos.....	121
Figura 49 - Correlação entre níveis de prolactina e número de eosinófilos no pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA.....	122

Figura 50 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina de ratos desafiados com OVA.....	123
Figura 51 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre o número total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL)	125
Figura 52 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre o número total de células presentes no sangue.....	125
Figura 53 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos	126
Figura 54 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar sobre o número total de células presentes na medula óssea	126
Figura 55 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar	128
Figura 56 - Peso absoluto das glândulas adrenais (mg) em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg ⁻¹) após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato	129
Figura 57 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica <i>tween</i> 80 (1 ml.Kg ⁻¹) após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato	130

Figura 58 - Efeitos do tratamento de domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato, sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.....	131
Figura 59 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato.	132
Figura 60 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a geração de IL-6, IL-10, TNF-a e IFNg em ratos alérgicos.....	134
Figura 61 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre os níveis de adrenalina e noradrenalina de ratos desafiados com OVA	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes do desafio ao antígeno sobre a celularidade leucocitária.....	76
Tabela 2 -	Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes do desafio ao antígeno sobre a celularidade leucocitaria diferencial no lavado bronco-alveolar (BAL).....	80
Tabela 3 -	Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina antes das ova- inalações	81
Tabela 4 -	Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar	83
Tabela 5 -	Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar	84
Tabela 6 -	Efeitos da lactação sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar (BAL), sangue circulante e lavado medular femoral (FML) durante a inflamação alérgica pulmonar.....	101
Tabela 7 -	Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do reconto diferencial no BAL, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos	104
Tabela 8 -	Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais, naive, virgens e lactantes antes das OVA-inalações.....	105
Tabela 9 -	Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) de ratas naive e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar	107
Tabela 10 -	Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária.....	110

Tabela 11 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos	113
Tabela 12 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina antes da ova-imunização	114
Tabela 13 - Níveis plasmáticos de corticosterona (pg/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar.....	116
Tabela 14 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da ova-imunização, sobre a resposta alérgica pulmonar	117
Tabela 15 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária.....	124
Tabela 16 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar	127
Tabela 17 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato.....	129
Tabela 18 - Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato	130
Tabela 19 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato	132

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	PROLACTINA.....	33
2.1.1	Regulação da Liberação de Prolactina	37
2.1.2	Prolactina e Resposta Imune.....	39
2.1.3	Asma ou Inflamação Alérgica Pulmonar (IAP)	45
2.1.4	Prolactina e Resposta Inflamatória	49
2.1.5	Asma e lactação: um papel para a prolactina?	51
3	PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS	55
3.1	OBJETIVO GERAL.....	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	ANIMAIS.....	57
4.2	FÁRMACOS	57
4.2.1	Ovoalbumina (OVA).....	58
4.2.2	Domperidona	58
4.2.3	Cloridrato de Xilazina 2%.....	58
4.2.4	Cloridrato de Quetamina 5%.....	59
4.3	MODELOS DE HIPERPROLACTINEMIA.....	59
4.4	DOSAGENS DE PROLACTINA.....	59
4.5	DOSAGENS DE CORTICOSTERONA.....	60
4.6	MODELO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.	60
4.7	COLETA DO SANGUE PERIFÉRICO	61
4.8	LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO PULMÃO	61

4.9	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA.....	62
4.10	AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES PARA PROLACTINA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	62
4.11	DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS EM EXPLANTES DE PULMÃO.....	63
4.12	DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS NO LAVADO BRONCO- ALVEOLAR (BAL).....	63
4.13	QUANTIFICAÇÃO DE MUCO E COLÁGENO NO PULMÃO	64
4.14	PADRONIZAÇÃO DE DOSAGEM DE NOR E ADRENALINA EM PLASMA DE RATO	65
4.15	MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE RECEPTOR P2X7R.....	65
4.15	EXPERIMENTO 1: EFEITO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DO DESAFIO COM O ANTÍGENO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA	66
4.15.1	Delineamento Experimental.....	66
4.15.2	Coleção das Amostras	67
4.16	EXPERIMENTO 2: EFEITO DA LACTAÇÃO SOBRE A RESPOSTA ALÉRGICA PULMONAR	68
4.16.1	Delineamento Experimental.....	68
4.17	EXPERIMENTO 3. HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DA SENSIBILIZAÇÃO, E RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA	70
4.17.1	Delineamento Experimental.....	70
4.17.2	Coleção das Amostras	70
4.18	EXPERIMENTO 4: HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELO OVO ALBUMINA APÓS DE ESTABELECID A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.....	72

4.18.1	Delineamento experimental	72
4.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5	RESULTADOS.....	75
5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DO DESAFIO AO ANTÍGENO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA	75
5.2	EXPERIMENTO 2: RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR EM RATAS LACTANTES	100
5.3	EXPERIMENTO 3: ESTUDO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DA SENSIBILIZAÇÃO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA.	108
5.4	EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA APÓS ESTABELECID A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.....	123
5	DISCUSSÃO	136
6	CONCLUSÕES	159
	REFERÊNCIAS.....	161

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença multifatorial, caracterizada por infiltração celular pulmonar, exsudação plasmática, hiper-responsividade das vias aéreas, que causa perda parcial e irreversível da função respiratória. A domperidona, usada principalmente para o tratamento de enfermidades do trato gastrointestinal, aumenta os níveis de prolactina ao bloquear os receptores D_2 da dopamina da hipófise sem cruzar a barreira hemato-encefálica. O presente estudo foi planejado com vistas a elucidar os mecanismos pelos quais a prolactina influencia a expressão da resposta alérgica pulmonar. O estudo visou um melhor entendimento das ações desse hormônio na regulação de processos imunes e inflamatórios. Vários estudos têm descrito ações da prolactina. Particularmente, têm sido encontradas evidências sobre sua ação no sistema imune. A prolactina promove o crescimento celular e diferenciação de vários tipos de tecidos e, além disso, tem efeito imunoestimulante. Concentrações séricas elevadas da prolactina se correlacionam com alterações na resposta imune. Em função disso, a prolactina tem sido considerada como um modulador da função imune. A prolactina tem ações modulatórias em processos inflamatórios. Trabalhos anteriores avaliando o efeito da prolactina sobre a resposta inflamatória aguda no modelo do edema da pata do rato induzida pela carragenina demonstraram que a prolactina pode exercer ambos os efeitos como anti-inflamatório e pró-inflamatório, dependendo do tipo celular, o tecido e estado fisiológico do órgão e a duração da hiperprolactinemia. Assim, em hiperprolactinemia aguda moderada (5 dias) em animais tratados com domperidona ou com hipófise ectópica, um modelo clássico para hiperprolactinemia, aumenta a resposta inflamatória, enquanto que estado de hiperprolactinemia crônica moderada (30 dias) tem efeitos anti-inflamatórios sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo do edema da pata do rato. Poucos estudos têm sido conduzidos sobre o tratamento da asma em humanos com antagonistas da dopamina. A literatura cita unicamente o uso da domperidona em pacientes com refluxo gastroesofágico associado à asma, o que justifica o interesse de pesquisar o tema, e o uso possível terapêutico da prolactina como modulador durante a doença. Procurou-se elucidar mecanismos pelos quais a

prolactina afeta a resposta alérgica pulmonar bem como a função da prolactina na regulação dos processos imunes e inflamatórios.

São conhecidos relatos verbais de mulheres asmáticas que durante a lactação apresentam melhoras na resposta alérgica pulmonar. Isso faz com que elas apresentem menos crises asmáticas. Durante a lactação ocorrem várias adaptações fisiológicas, como por exemplo, a atenuação às respostas imunes e ao estresse. Seja em relação a estressores tanto fisiológicos ou físicos. Um dos melhores exemplos de resposta atenuada ao estresse é visto nas ratas durante a prenhez tardia e a lactação. No presente estudo foi avaliada, a influência da hiperprolactinemia na expressão da asma experimental. Para tal, foram medidos parâmetros funcionais e bioquímicos num modelo de asma experimental. Inicialmente, a hiperprolactinemia induzida farmacologicamente antes do desafio inalatório, se mostrou efetiva em reduzir a alergia pulmonar. A seguir, fenômeno similar foi observado em fêmeas lactantes. Esses resultados demonstram a relevância fisiológica dessa interação e apontam a possibilidade de um significado clínico dessa ação da prolactina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROLACTINA

Os hormônios produzidos pela hipófise anterior ou adeno-hipófise, estimulam uma grande variedade de processos fisiológicos e/ou bioquímicos nos seus tecidos alvos. A prolactina, é sintetizada nos lactotrofos hipofisários (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; NEILL, 2006; ORBACH et al., 2012; COSTANZA et al., 2015) e também fora da hipófise (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; BRAND et al., 2004) incluindo células do sistema nervoso e imune (MONTES DE OCA et al., 2005). Esse hormônio é também um importante mediador da rede neuroendócrina, (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013) e atua em vários órgãos do sistema imunológico, como o timo, o baço, os nodos linfoides, a medula óssea, e também os neurônios, epitélio mamário, próstata, endotélio, pele e as células mononucleares (principalmente linfócitos), onde atua como citocina (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; ORBACH et al., 2012).

A prolactina foi descoberta por Stricker e Grueter (1928¹ apud LARREA et al., 1993, p. 375; NASELLO; FELICIO, 1991, p. 432), quando demonstraram que extratos de hipófise de bovino injetados em coelhas em pseudo-gestação induziam lactação (CARIÑO et al., 1993). A seguir foram demonstradas outras ações da PRL tanto em mamíferos quanto em não mamíferos, sendo considerado um dos hormônios filogeneticamente mais antigos (ADÁN et al., 2014). Algumas dessas ações incluem a estimulação da secreção do leite do papo de pombos (ADÁN et al., 2014), ações proliferativas nas glândulas sexuais acessórias masculinas e femininas (NEILL, 2006; ORBACH et al., 2012), efeitos luteotróficos e luteolíticos (NEILL, 2006), regulação da metamorfose em anfíbios (NEILL, 2006; ADÁN et al., 2014), regulação do comportamento maternal (SILVA; BERNARDI; FELICIO, 2001; FERRARIS et al.,

¹ STRICKER, P.; GRUETER, R. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. **Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie**, (Paris), v. 99, p. 1978 - 1980, 1928.

2013; MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013) e do comportamento sexual (SVARE et al., 1979; DRAGO et al., 1981; DRAGO, 1984; CRUZ-CASALLAS et al., 1999), ações anti-angiogênese, vasoconstrictoras, e anti-vasopermeabilidade (ORBACH et al., 2012).

Atualmente, se conhecem mais de 300 ações diferentes biológicas da prolactina (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; BLANCO-FAVELA et al., 2012) que não estão relacionadas com a lactação ou área reprodutiva, mas sim com o equilíbrio dinâmico do organismo (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; NEILL, 2006; ORBACH; SHOENFELD, 2007; BLANCO-FAVELA et al., 2012; ORBACH et al., 2012) tais como a modulação do transporte de água e eletrólitos (BARRON; LINDHEIMER, 1988; MACOTELA et al., 2002; ORBACH et al., 2012), o metabolismo do cálcio (ORBACH et al., 2012), as funções imunes (BRAND et al., 2004; MONTES DE OCA et al., 2005). A prolactina tem ações autócrinas e parácrinas em diversos tipos de células do sistema imunológico (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005), participando na resposta inata e adaptativa (JARA et al., 2011). Sua funcionalidade depende do tipo de células que expressam seu receptor (ORBACH; SHOENFELD, 2007).

A prolactina apresenta considerável homologia estrutural com o hormônio do crescimento (GH) e os lactogênios placentários (LPI e LPII) e participa com eles algumas atividades biológicas (WALLIS, 1975; TRIEBEL et al., 2015). Essas proteínas são originárias de uma família comum de genes (CARIÑO et al., 1993) e compartilham características relacionadas com suas propriedades funcionais (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; TRIEBEL et al., 2015). Apresentam cadeias de 190 a 199 aminoácidos dependendo da espécie, com um único resíduo de triptofano e duas pontes dissulfetos homólogos (CARIÑO et al., 1993). A prolactina humana (hPRL) contém 199 aminoácidos, correspondendo a uma isoforma com peso molecular de 23 KDa. Todas as prolactinas identificadas são de 197-199 aminoácidos e contêm 6 cisteínas formando 3 ligações dissulfeto intramoleculares (Cys 4-11, 58-174 e 191-199 na hPRL). A estrutura primária é altamente conservada entre diversas espécies, por exemplo, as prolactinas bovina e humana compartilham 74% de identidade (PEREIRA et al., 2015).

Em vista disto, esses hormônios mostram determinantes antigênicos comuns e têm atividades promotoras do crescimento e lactogênicas (CARIÑO et al., 1993). Tendo em vista estas semelhanças, foi postulado que a origem destes hormônios envolveria a duplicação de um único gene ancestral (LARREA et al., 1993). Um único gene é encontrado no cromossoma 6 nos humanos (LARREA et al., 1993; PEREIRA et al., 2015) e contém em sua estrutura 900 pares de bases. Em roedores, muitos grupos de genes relacionados à prolactina são expressos a partir dos cromossomos 13 e 17 em camundongos e ratos, respectivamente (PEREIRA et al., 2015). O gene da prolactina é composto por 5 exons e 4 introns com um total de longitude de 10 Kb (PEREIRA et al., 2015). Da análise da sequência de nucleótidos das uniões exón-intron é possível identificar, por exemplo no gene da prolactina do rato, sítios para a possível geração de leituras alternativas e a factibilidade para a geração de múltiplas variantes secundárias da prolactina, bem como modificações pós-transcricionais do mRNA (CARIÑO et al., 1993). A expressão do gene de prolactina tem sido encontrada em várias regiões do cérebro, decídua, miométrio, timo, baço, pele, fibroblastos, células epiteliais mamárias e tumores, glândulas lacrimais e sudoríparas, bem como células linfoides da medula óssea, e linfócitos circulantes (PEREIRA et al., 2015).

A prolactina é um hormônio polimórfico com múltiplas ações biológicas. A versatilidade (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005) na participação desse hormônio em diversos sistemas, depende da sua estrutura química, e da susceptibilidade de ser convertida em estruturas com diferentes funções (MACOTELA et al., 2002; TRIEBEL et al., 2015). A prolactina caracteriza-se por ser de natureza heterogênea pois existem várias formas moleculares (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005). A principal isoforma de prolactina é a hipofisária sendo uma molécula monomérica livre pequena de 23 Kda, é a variante predominante, representando cerca de 90 % do hormônio secretado (CARIÑO et al., 1993). As outras isoformas incluem uma prolactina maior que 56 kDa e uma macroprolactina de 150–160 kDa. A macroprolactina é principalmente constituída por um complexo de prolactina monomérica (LARREA et al., 1993; ORBACH et al., 2012; COSTANZA et al., 2015). Essas variantes de pesos moleculares maiores tem menor atividade biológica que a prolactina monomérica de 23 KDa (COSTANZA et al., 2015). As diferentes isoformas

que são secretadas das células do sistema imune têm uma atividade biológica diferente (ORBACH et al., 2012). Três principais formas de prolactina, 24, 21 e 11 KDa foram sintetizadas e liberadas por cultura de timócitos humanos. A prolactina de 27 KDa é sintetizada por células mononucleares e uma prolactina de 25 KDa foi encontrada nas células T Jurkat (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002). A prolactina extra pituitária pode atuar diretamente, como fator de crescimento, neurotransmissor ou imunomodulador, em uma via autocrina ou paracrina (PEREIRA et al., 2015).

A molécula como prolactina é secretada pelas células mononucleares (PBMCs), e o receptor de prolactina pode ser encontrado em muitos tipos celulares, incluindo monócitos e linfócitos. A prolactina e a expressão do receptor para prolactina sugerem a possibilidade de atuação tanto autocrina quanto o paracrina (PEREIRA et al., 2015). Níveis fisiológicos de PRL hipofisária podem ser necessários para manter a função basal dos linfócitos ativados (MATERA et al., 1992). Durante a resposta imune, a prolactina estimula as células T, células B, células natural killer, macrófagos, neutrófilos, células CD34-hematopoiéticas, e células dendríticas apresentadoras de antígeno (YU-LEE, 2002; PEREIRA et al., 2015). Todos esses efeitos podem ser conduzidos pela PRL pituitária e extra pituitária (PEREIRA et al., 2015).

No rato, a clivagem proteolítica da prolactina de 23 KDa origina fragmentos N-terminais. A proteólise induzida pela catepsina D gera uma única vasoinibina de 16 KDa (MACOTELO et al., 2002; COSTANZA et al., 2015; TRIEBEL et al., 2015), esses peptídeos atuam sobre as células endoteliais para inibir sua proliferação, e migração, diminuir a vasodilatação e a vaso permeabilidade e promover a apoptose mediada pela regressão vascular (MACOTELO et al., 2002; TRIEBEL et al., 2015). As variantes de prolactina poderiam alterar sua atividade biológica (PEREIRA et al., 2015). A fração de prolactina de 16 KDa promove a expressão de óxido nítrico sintetase inducível (iNOS) e a produção de NO pelos fibroblastos pulmonares, atuando como citocina pró-inflamatória. Os efeitos únicos da prolactina de 16 KDa parecem ocorrer por meio de um receptor distinto dos receptores conhecidos de prolactina. Haja vista que um sítio de ligação saturável para prolactina de 16 KDa de

alta afinidade e específico foi descrito tanto nas células endoteliais como em fibroblastos (MACOTELA et al., 2002; TRIEBEL et al., 2015).

Tem-se sugerido que os hormônios lactogênicos e do crescimento são necessários para o desenvolvimento e função do sistema imune, atuando como primeiro sinal que prepara as células do sistema imune para a proliferação, diferenciação e função (BERCZI, 1994; COSTANZA et al., 2015). O hormônio do crescimento e a prolactina mantêm a imunidade adaptativa, a qual inclui a imunidade mediada por células, reações de anticorpo e autoimunes, manutenção do timo e função medular óssea. O fator de crescimento 1 relacionado com a insulina participa na ação regulatória do GH e da prolactina (BERCZI et al., 2014). A ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) antagoniza o efeito imune estimulante dos hormônios lactogênicos (BERCZI, 1994). O eixo HPA estimula a imunidade natural ou inata e suprime o sistema imune adaptativo (BERCZI et al., 2014). A prolactina pode ser uma pedra angular na rede de imunoneuroendocrinologia (PEREIRA et al., 2015). As catecolaminas e os corticosteroides suportam a imunidade inata e estimulam as células T supressoras/regulatórias, as quais inibem a imunidade adaptativa (BERCZI et al., 2014).

2.1.1 Regulação da Liberação de Prolactina

A secreção de prolactina pela hipófise é regulada por inibição tônica hipotalâmica (BEN-JONATHAN; ARBOGAST, 1989; LARREA et al., 1993; ORBACH; SHOENFELD, 2007). O hipotálamo contém os principais fatores de inibição (PIF) e de liberação (PRF). As identidades químicas dos PIFs e PRFs já foram elucidadas, sendo a dopamina aceita como o principal PIF (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; ORBACH et al., 2012; FERRARIS et al., 2013; FARON-GÓRECKA et al., 2014), atuando via o receptor de dopamina D₂ (D₂R) expresso nos lactotrofos pituitários (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; FERRARIS et al., 2013); enquanto o hormônio liberador de tirotrófina (TRH) (COSTANZA et al., 2015), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (CARIÑO et al., 1993), a β_1 -endorfina e o peptídeo isoleucina histidina, atuam como as principais substâncias que estimulam

sua liberação. A prolactina também controla sua própria secreção por atuar a nível hipotalâmico. Assim, a prolactina participa de um *feedback* curto negativo por estimulação da atividade dos neurônios hipotalâmicos neuroendócrinos dopaminérgicos, aumentando a liberação de dopamina, regulando o *turnover* de dopamina (LARREA et al., 1993; FERRARIS et al., 2013; FARON-GÓRECKA et al., 2014). Além disso, a dopamina inibe a imunidade adaptativa e regula a imunidade inata (BERCZI et al., 2014).

Existem outros sistemas implicados na regulação da secreção de prolactina, como o sistema gabaérgico e serotoninérgico. Outros fatores que modificam a secreção da prolactina são os produtos da síntese das células esteroideogênicas do testículo, do ovário, das glândulas suprarrenais. Os estrogênios atuam tanto a nível hipotalâmico como a nível hipofisário a atividade dos neurônios e células intimamente envolvidas no fenómeno reprodutivo. Estes compostos hormonais estimulam a secreção e liberação da prolactina, assim como, o crescimento das células produtoras desse hormônio (CARIÑO et al., 1993). O hipotireoidismo e a insuficiência da adrenal estimulam a secreção de prolactina por inibir a dopamina (ORBACH et al., 2012).

O mecanismo da ação dos corticosteroides na supressão da inflamação na asma envolve a desativação de múltiplos genes inflamatórios que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, e receptores (ZHOU et al., 2015). Entre a proteína anti-inflamatória incrementada pelos GCs é a IL-10, que está reduzida nos macrófagos alveolares dos pacientes com asma, e ela aumenta sua síntese com o tratamento esteroide (COSÍO; TORREGO; ADCOCK, 2005). Assim mesmo como os GCs a vitamina D aumenta o desenvolvimento da IL-10 (CORREALE; YSRRAELIT; GAITN, 2009). Os corticosteroides suportam a imunidade inata e estimulam às células T supressoras-regulatórias (BERCZI et al., 2014).

Os glucocorticoides a concentrações muito baixas reduzem a transcrição do gene inflamatório pelo fator nuclear Kappa B (NFK β) ou a proteína ativadora 1 (AP-1) via uma associação entre esses fatores e o receptor de glucocorticoides (GR) (ZHOU et al., 2015). Recentes estudos têm mostrado que mudanças no perfil epigenético

regulam a expressão e ativação do NFK β para mediar a ação esteroide na asma (ZHOU et al., 2015).

O tratamento com vitamina D, na resposta alérgica pulmonar, induz a expressão de deacetilasa histona (HDAC2) e reduz a expressão do NFK β p65 no modelo de asma induzida pela OVA, nos pulmões dos animais estudados e tratados com vitamina D. Além disso, a combinação dos tratamentos de vitamina D e dexametasona resulta em sinergismo na diminuição do lavado broncoalveolar total com supressão da infusão celular total, liberação de citocinas, e expressão do NFK β , e aumento da HDAC2 e atividade nos ratos controle positivos (ZHOU et al., 2015).

Existe um antagonismo entre ACTH e corticosteroides versus a prolactina em situações do estresse (OCHOA-AMAYA et al., 2010). Nesse sentido, a administração de prolactina após a hemorragia, melhora a função dos macrófagos e esplenócitos, e reduz os níveis de corticosterona e mortalidade (MONTES DE OCA et al., 2005).

2.1.2 Prolactina e Resposta Imune

Os sistemas imune e neuroendócrino estão intimamente unidos e relacionados em comunicações bidirecionais. A imunocompetência inata e adaptativa são mantidas pelos hormônios do eixo HPA, como prolactina, vasopressina, citocinas e catecolaminas (PEREIRA et al., 2015). Diferentes estudos têm revelado novas ações da prolactina. Têm sido evidenciados mecanismos de sua ação no sistema imune. A prolactina promove o crescimento celular e diferenciação de vários tipos de tecidos, além disso, tem efeitos imunoestimulantes (BERNTON; MELTZER; HOLADAY, 1988). A presença do mRNA de prolactina em tecido linfóide humano normal (JARA et al., 2011) e anormal foi observada em timo, baço, amígdala, nodos linfóides, tumores linfóides, também como em linfócitos, células epiteliais e vasculares (PEREIRA et al., 2015), permite inferir que a prolactina promova uma importante função na imune competência (JARA et al., 2011). Assim, em função de suas características moleculares e funcionais, bem como na sua participação nas

respostas inatas e adaptativas imunes, a prolactina é considerada uma citocina (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002; JARA et al., 2011).

Observações clínicas e estudos experimentais sugerem que a PRL seja importante na patogênese de algumas enfermidades autoimunes (JARA et al., 1991). A hiperprolactinemia está envolvida com a artrite reumatoide, esclerose sistêmica cutânea, síndrome de Sjögren, artrite reativa, diabetes mellitus, tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, hipofisitis linfocítica, doença celíaca, esclerose múltipla (MS), uveítes e rejeição do transplante do coração entre outras (JARA et al., 2011; ORBACH et al., 2012; COSTANZA et al., 2015). Assim, a maior parte dos autores descrevem a hiperprolactinemia como um fator correlacionado à autoimunidade (COSTANZA et al., 2015).

Concentrações séricas elevadas da prolactina se correlacionam com anormalidades na resposta imune. A prolactina promove respostas imunes pró-inflamatórias via fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NFK β) e fator regulatório de interferon-1 (IRF-1). Estes fatores são conhecidos por promover o aumento do TNF- α e a secreção da interleucina 12 (IL-12), considerados mediadores essenciais de inflamação (OCHOA-AMAYA et al., 2011), os quais podem afetar processos patofisiológicos em estados hiperprolactinêmicos (BRAND et al., 2004). Assim, a sequência desses eventos resulta no aumento da síntese do IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos Th1 cujo o responsável inicial é o aumento dos níveis de prolactina (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013).

A prolactina tem sido implicada como modulador da função imune, e algumas de suas ações podem ser ligados à síntese de óxido nítrico (NO). Sabe-se que o NO atua como mediador da inflamação e durante esta, a prolactina poderia afetar a sínteses do NO. As citocinas induzem a expressão de receptores para a prolactina nos fibroblastos pulmonares, permitindo a prolactina inibir a produção de NO e a expressão do óxido nítrico-sintetase induzida (iNOS). Revelaram-se mecanismos pelos quais a prolactina e os receptores podem ter funções modulatórias significantes durante processos imunes inflamatórios (CORBACHO et al., 2003). Nos pulmões a prolactina estimula a maturação celular e a produção de surfactante. Citocinas inflamatórias tais como TNF α , TGF β , IL-1 β e IFN γ , são principais

reguladores da produção de NO nas células epiteliais do pulmão, a prolactina endógena modula a produção basal de NO nas células epiteliais alveolares humanas (A549), sendo assim, os fibroblastos produzem prolactina e podem localmente processar a prolactina a uma fração de 16 KDa, reforçando sua função como um fator autocrino no pulmão (CORBACHO et al., 2003), a prolactina de 16 KDa ativa o NFK β nos fibroblastos pulmonares primários. Esse efeito pode conduzir a produção do gene iNOS (MACOTELA et al., 2002; TRIEBEL et al., 2015). Igualmente, (ZHOU et al., 2015) demonstraram experimentalmente, que a administração de 1,25 (OH)2D3 aliviou os sintomas da resposta inflamatória e diminuiu a expressão do iNOS no modelo da asma no rato.

Estudos têm conduzido a resultados não conclusivos em doenças como a esclerose múltipla e a artrite reumatoide (COSTANZA et al., 2015) induzindo experimentalmente hiperprolactinemia no rato, no modelo de adjuvante de artrites inflamatória, diminuiu a apoptose dos condrócitos, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, a erosão do osso, o edema articular e a dor. Assim mesmo, altos níveis de prolactina circulante, protegem contra o dano articular permanente e inflamação na artrite experimental (ADÁN et al., 2014).

Chikanza et al. (1993) relataram que pacientes com artrite reumatoide apresentaram uma secreção excessiva de prolactina, a qual teria contribuído para o desenvolvimento da doença ao estimular a resposta imune. Portanto, a inibição da secreção ou da ação da prolactina poderia ter sucesso no tratamento da artrite reumatoide. Templ et al. (1996) observaram que pacientes com artrite reumatoide aguda não apresentavam diferenças nos níveis de ACTH, cortisol, prolactina e TSH. Por outro lado, estudos feitos por Orbach et al. (2012) apontaram o desenvolvimento da artrite reumatoide relacionado à estimulação imune pela prolactina. Nesse estudo, a resposta dinâmica do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal e a secreção de prolactina na hipófise de mulheres com menos de 40 anos com artrite reumatoide mostrou um aumento na expressão de prolactina enquanto os níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol não aumentaram após o teste com o hormônio corticotropina.

A imuno-competência inata ou natural e adaptativa é mantida por hormônios do eixo HPA, hormônio do crescimento, prolactina, vasopressina, e catecolaminas (JARA et al., 2011; PEREIRA et al., 2015). A prolactina pode mediar ou alterar a resposta celular e humoral do sistema imune. Ela pode estimular e inibir as respostas imunes, de maneira dose dependente (PEREIRA et al., 2015). A prolactina mantém a função do timo e do sistema imune adaptativo dependente das células T. Já a presença de mRNA de prolactina nas células endoteliais vasculares, dos tecidos linfoides como timo, linfonodos e baço, sugere outras funções da prolactina, além da imunomodulação (JARA et al., 2011).

O receptor para a prolactina pertence à superfamília do receptor tipo 1 citocina/hematopoiética (ORBACH et al., 2012; FERRARIS et al., 2013; COSTANZA et al., 2015). O receptor para prolactina está composto de 3 maiores domínios; um domínio extracelular (ECD), uma região transmembranal (TM), e um domínio intracelular (ICD). Igualmente, é provável que a heterogeneidade do receptor de prolactina seja associada com pleiotropia (MACOTELA et al., 2002; PEREIRA et al., 2015; TRIEBEL et al., 2015). Receptores para a prolactina têm sido localizados em uma grande variedade de células (RUSSELL et al., 1984). O receptor pode ser ativado por 3 hormônios humanos em sequência diversa: prolactina, hormônio do crescimento, lactogênio placentário (COSTANZA et al., 2015). Os receptores para prolactina são distribuídos pelo sistema imune e pertencem à superfamília, os quais incluem prolactina, hormônio de crescimento, leptina, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, eritropoietina e fator inibidor de leucemia (JARA et al., 2011) e fator estimulante de colônias macrófago granulocíticas (GM-CSF) (COSTANZA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). A expressão do receptor de prolactina pode ser regulada por vários estímulos, entre os quais encontram-se os mediadores inflamatórios. Uma expressão diferencial do RNAm do receptor de prolactina foi observado no modelo murino de inflamação aguda. A expressão diferencial do receptor de prolactina poderia ser um mecanismo para orquestrar respostas anti-inflamatórias sobre processos inflamatórios crônicos (PEREIRA et al., 2015).

A síntese e liberação de prolactina são moduladas por fatores estimulatórios e inibitórios produzidos pelo hipotálamo. As principais citocinas que estimulam a liberação da secreção de prolactina são as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6; o interferon-

γ (IFN- γ) e endotelina 3 que são inibitórias (ORBACH et al., 2012). A interleucina 1 e provavelmente outras citocinas participam desta regulação (BERNTON; MELTZER; HOLADAY, 1988; ARISAWA et al., 1990) afetando funções autonômicas e endócrinas do cérebro. Além disso, mostrou-se que o fator de ativação plaquetária e a substância P (CAMORATTO; GRANDISON, 1989; ARISAWA et al., 1990) estimulam a liberação de prolactina; estas substâncias têm reconhecida ação sobre o sistema imune.

Estudos têm mostrado que os hormônios pituitários liberados durante o estresse podem afetar o funcionamento do sistema imune. Em particular, têm sido apontados receptores para a prolactina na membrana de linfócitos T, B e monócitos (RUSSELL et al., 1984). As propriedades imunoestimulantes da prolactina foram demonstradas em diferentes situações experimentais. A prolactina pode restabelecer a resposta imune normal em animais hipofisectomizados e estimular a produção de anticorpos. Além disso, a prolactina aumentou o peso do baço e do timo em animais intactos e hipofisectomizados (BERCZI et al., 1981). Tem-se mostrado que a prolactina acelera a recuperação da resposta imune após quimioterapia e transplante da medula óssea, aumentando assim a restauração da imunidade em indivíduos infectados com HIV e em indivíduos idosos saudáveis com sistema imune comprometido (JARA et al., 2011). A prolactina é conhecida por regular estresse e reprodução (NEILL, 2006). Esse hormônio também é produzido em vários sítios extra pituitários, incluindo células do sistema nervoso e imune, sendo um importante mediador da rede neuroendócrina. Os efeitos da prolactina sobre o sistema imune são complexos (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011; MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013; ADÁN et al., 2014). A prolactina é também capaz de modular a resposta das células Th1 para a IL12 e a resposta das células B e T a fatores de competência, tais como mitógenos. Essa ação moduladora pode ser tanto positiva ou negativa, dependendo da concentração do hormônio. Como quer que seja, o efeito estimulatório da prolactina foi diminuindo a altas concentrações (200 ng/ml) (MATERA et al., 1992).

Por outro lado, o ACTH é um potente inibidor da produção de anticorpos. Portanto, a prolactina pode exercer seu antagonismo fisiológico bloqueando o ACTH durante as modificações na resposta imune induzidas pelo estresse. Este antagonismo

parece ser exercido com a finalidade de proteger o organismo dos danos endógenos causados pelo estresse. Sob condições do estresse, a prolactina é requerida para equilibrar os possíveis efeitos negativos dos glucocorticoides e outros mediadores inflamatórios imunes. A hiperprolactinemia de curta duração tem efeitos pró-inflamatórios. Por outro lado, a prolactina pode exercer uma função protetora no organismo submetido a estresse agudo (OCHOA-AMAYA et al., 2010).

Em estudos do Lupus eritematoso sistêmico com o modelo murino tem-se mostrado que a prolactina induz a diminuição no apoptose das células transicionais B, contribuindo assim para a redução da tolerância das células B e para o desenvolvimento da autoimunidade. A prolactina induz a produção da IL-1 e do IFN γ e promove a expressão do receptor para a IL-2. Além disso, a hiperprolactinemia afeta a maturação das células dendríticas, a resposta das células dendríticas para a apresentação do antígeno com aumento da produção do IFN γ . A prolactina também aumenta a produção da imunoglobulina e regula a maturação dos timócitos CD4, CD8 para as células T CD4⁺ CD8⁺ via expressão receptor IL-2 e conduz ao aumento da geração de células B (ORBACH et al., 2012).

Em níveis elevados, acima de 200 ng.mL⁻¹ de prolactina, a síntese de IL-10 inibe as reações pró-inflamatórias por diminuir a produção de IL-12 e TNF- α . Essas citocinas são consideradas mediadores essenciais na inflamação. Assim mesmo, concentrações altas podem ativar o sistema de *feedback* por meio da IL-10, limitando assim, a reação inflamatória (OCHOA-AMAYA et al., 2011).

A prolactina pode mediar ou alterar o funcionamento do sistema imune tanto no aspecto celular como no humoral. Ela pode estimular e inibir a resposta imune, de maneira dose dependente. No mesmo contexto atividade celular aumentada dos linfócitos B é mediada por altas doses de prolactina. Também a supressão da função citotóxica mediada pelas células NK *in vivo*. A prolactina é conhecida por ter ações contraditórias sobre o sistema imune, as quais dependem da sua concentração plasmática. Ela pode inibir a proliferação de linfócitos a altas concentrações e pode aumentar sua proliferação a baixas concentrações (PEREIRA et al., 2015). Baixas concentrações de prolactina podem induzir respostas pró-inflamatórias e promover a produção de anticorpos, enquanto que, em altas

concentrações, a prolactina suprime essas respostas. Os efeitos imunes divergentes de baixas e altas concentrações de prolactina podem envolver modulação do T-bet, um fator de transcrição chave, direcionando aos tipos de células T helper 1 (Th1) nas respostas inflamatórias. O T-bet é também modulado pela linhagem celular T CD4⁺ por exposição à prolactina (JARA et al., 2011). A prolactina é uma molécula versátil e sua dependência é tanto de seu polimorfismo estrutural e a extensa distribuição dos seus receptores de membrana (MACOTELO et al., 2002; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; PEREIRA et al., 2015; TRIEBEL et al., 2015).

2.1.3 Asma ou Inflamação Alérgica Pulmonar (IAP)

A asma é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas (ZHOU et al., 2015), na qual várias células estruturais e inflamatórias (BARNES; FAN CHUNG; PAGE, 1998; TIAN et al., 2014), entre elas linfócitos do tipo T, eosinófilos e mastócitos exercem um importante papel. O processo inflamatório está associado à hiperresponsividade brônquica, exsudação plasmática e infiltração celular pulmonar (DE OLIVEIRA et al., 2011) e a vários estímulos, que são parcialmente reversíveis, espontaneamente ou após tratamento (MAUAD et al., 2000). A asma resulta de uma resposta Th2 inapropriada contra antígenos inócuos aerotransportados. A exposição ao alérgeno é necessária para o desenvolvimento da doença e aparecimento dos sintomas (VERHASSELT, 2010). A infiltração dos eosinófilos e linfócitos Th2 CD4⁺ nas vias aéreas é a característica principal dela (TIAN et al., 2014; CHOY et al., 2015). A hipersecreção de muco das paredes bronquiais também é característica da doença (ZHOU et al., 2015; TIAN et al., 2014). Na asma são liberados mediadores inflamatórios (BARNES; FAN CHUNG; PAGE, 1998) nos pulmões pelos macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (DE OLIVEIRA et al., 2011) que resultam em mudanças patofisiológicas típicas da asma (BARNES; FAN CHUNG; PAGE, 1998).

Pacientes com asma apresentam angiogênese exacerbada nos brônquios, mais vasos e maior percentual de área vascular, quando comparados aos não asmáticos. Indivíduos com asma severa apresentam um número significativamente maior de vasos do que portadores de asma leve ou moderada. Os capilares e vênulas apresentam edema de suas paredes e espessamento da membrana basal subendotelial, associados com intensa mobilização de eosinófilos e ativação intravascular, estes infiltram as paredes edemaciadas dos microvasos e tecidos perivasculares (SALVATO, 2001).

Na asma, a circulação brônquica não é apenas envolvida na formação de edema, mas também participa do recrutamento de leucócitos através da expressão de várias moléculas de adesão vascular. Na asma severa a neovascularização da mucosa, está associada à intensa expressão de selectinas endoteliais e moléculas de adesão pertencentes à superclasse das imunoglobulinas. De particular importância é a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) que está sob regulação, do TNF α (*fator de necrose tumoral - α*), IL-4 e IL-13. Por meio de sua interação com a β 2-integrina VLA-4 (*very late activation antigen-4*), o VCAM-1 torna-se o grande responsável pelo recrutamento seletivo para as vias aéreas de eosinófilos, basófilos e linfócitos T. Na asma crônica, o número de micro vasos na submucosa está aumentado como consequência da maior secreção de fatores de crescimento vascular, incluindo o NO, o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e a ET-1 (*endothelin-1*) que é expressa pelo epitélio brônquico em pacientes com asma, o que não ocorre em indivíduos não asmáticos (VRUGT et al., 2000).

Uma das características da asma é a hiperresponsividade das vias aéreas (AHR), que aumenta depois da exposição ao alérgeno. O nível da resposta é demonstrado pelo aumento da resposta aos bronco-constritores como a metacolina (Mch). Essa resposta aumentada é o resultado da ativação de uma cascata inflamatória complexa envolvendo vários tipos celulares, incluindo linfócitos T e eosinófilos. Os linfócitos T exercem muitos de seus efeitos por secretar uma série de citocinas. Na asma alérgica, os linfócitos T helper 2 (Th2), com suas citocinas Th2 dominam sobre as citocinas Th1 e vários estudos sugerem uma função crítica da IL-4, IL-5, e IL-13 no desenvolvimento da hiperresponsividade das vias aéreas (MÄKELÄ et al., 2000).

Um dos avanços notáveis na última década tem sido o reconhecimento de que as citocinas desempenham um papel fundamental na orquestração, perpetuando e amplificação da resposta inflamatória na asma. De acordo com isso, as citocinas Th2 podem ter uma importante função na patofisiologia das doenças alérgicas incluindo a asma (BARNES, 2001). As citocinas que são liberadas dos mastócitos ativados, basófilos e as células Th2 são principalmente responsáveis pela inflamação associada com a reação de fase tardia (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Entre as citocinas envolvidas nesses processos podemos citar as citocinas derivadas das células T helper tipo 2 (Th2), as quais têm sido reconhecidas como indutoras da asma bronquial pela produção das citocinas pró-inflamatórias (HAYASHI et al., 2007) que são específicas da inflamação alérgica pulmonar como a IL-4, IL-5 (ZHOU et al., 2015), IL-6, IL-9 e IL-13, IL-17 (CORREALE; YSRRAELIT; GAITN, 2009). A IL-13 é um importante regulador imune por ter uma função crítica na indução da hiperresposta das vias aéreas, infiltração eosinofílica, metaplasia das células caliciformes, fibrose pulmonar (HAYASHI et al., 2007), hipersecreção de muco, e síntese de IgE (MUNITZ et al., 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A IL-13 tem ações biológicas de superposição com a IL-4 tendo uma via de sinalização comum para ambos receptores. A IL-4 e IL-13 iniciam uma cascata de sinalização intracelular similar. Já, a IL-13 é capaz de exercer especificamente e independentemente da IL-4. A IL-4 pode induzir a doença pulmonar devido à ausência da IL-13 (MUNITZ et al., 2008). A IL-4 e IL-13 regulam a produção de Ig E, a IL-5 que é altamente implicada na eosinofilia, e as citocinas contra regulatórias IL-10 e fator de crescimento de transformação β (TGF- β) que suprimem a função das células T, mas ativa outras células que contribuem ao remodelamento das vias aéreas (RICH et al., 2008).

As células Th1 secretam IL-2 e interferon- γ (BARNES, 2001) cuja função é inibir a asma bronquial. Vários estudos revelaram a incapacidade das células Th1 para suprimir a hiperresponsividade bronquial induzida pelas células Th2. Uma combinação das células Th1 e Th2 e seus produtos aumentou inflamação das vias aéreas e a hiperresponsividade bronquial (HAYASHI et al., 2007). O recrutamento e migração de eosinófilos dentro da área inflamada após o desafio ao antígeno é

controlado por citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios. As respostas imunes alérgicas são unidas ao desbalance Th1/Th2 com um aumento no perfil de citocinas Th2 (HAMASATO et al., 2014).

A IL-10 é uma citocina regulatória que tem sido sugerida para o tratamento da asma por suas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (MÄKELÄ et al., 2000). Essa citocina é um regulador do sistema imune durante a doença alérgica que também suprime a atividade dos mastócitos e dos neutrófilos, assim como tem sido relacionada com a redução da síntese da IGE nas respostas alérgicas envolvendo a participação dos mastócitos (DE OLIVEIRA et al., 2011). Ratos deficientes em IL-10 desenvolveram uma resposta inflamatória, mas falharam em exibir hiperresponsividade nas vias aéreas tanto nos modelos *in vivo* como *in vitro* na taxa da função pulmonar. A reconstituição dos genes de ratos deficientes de IL-10 restaurou o desenvolvimento da hiperresponsividade das vias aéreas quando comparados com os ratos do grupo controle. Esses resultados revelaram uma importante função da IL-10, na diminuição da intensidade da resposta inflamatória, e na regulação do tônus das vias aéreas depois da sensibilização e o do desafio (MÄKELÄ et al., 2000).

Resumindo, têm sido observados em pacientes asmáticos, altos níveis de citocinas Th2 a IL-4, IL-5, IL-6, IL-17 e um baixo perfil de citocinas Th1 como o IFN γ (PACKARD; KHAN, 2003), e citocinas antiinflamatórias como IL-10 (TOMITA et al., 2002). Esses achados se relacionam com a causa da doença (TOMITA et al., 2002).

Muito do que agora conhecemos acerca da patogênese e patofisiologia da asma, tem sido derivado de estudos humanos e de animais para asma alérgica. Entretanto, alguma precaução é necessária, ao extrapolar os dados dos modelos animais para humanos. A asma não acontece em roedores e outros animais não humanos. Assim, dados provenientes de modelos animais de asma, podem ser descritos, com mais precisão, como modelos de inflamação das vias aéreas, causados por sensibilização alérgica (RICH et al., 2008).

O ATP, é uma molécula sinalizante no meio extracelular que ativa receptores de nucleotídeos. Tanto ATP como UTP se ligam a receptores purinérgicos 2. Esses receptores purinérgicos 2 são ionotrópicos. São canais de membrana plasmática seletiva para cátions monovalentes ativados por o ATP. Quando ocorre a ativação do receptor P2X7R, há entrada de Ca e Na, saída de K, com a consequente despolarização da membrana. O receptor P2X7R altera funcionalmente o canal catiônico para um extenso poro, permitindo fluxo transmembrana de pequenas moléculas hidrofílicas com uma massa aproximada de 900 Kda, tais com o ATP (IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014). O receptor P2X7R está aumentado durante a inflamação das vias aéreas asmáticas agudas e crônicas e é altamente expresso nas células imunes. Quando exposto a altas concentrações de ATP, pode formar um grande poro permeável a solutos hidrofílicos (MÜLLER et al., 2011).

2.1.4 Prolactina e Resposta Inflamatória

Dicarlo, Meli e Muccioli (1992), observaram que repetidas injeções de prolactina ovina bem como a hiperprolactinemia induzida por hipófises ectópicas, causavam um incremento evidente na reposta inflamatória induzida pela carragenina. A seguir, Meli et al. (1993) descreveram evidências adicionais do envolvimento da prolactina na resposta inflamatória aguda e crônica. Nesses trabalhos a duração da hiperprolactinemia não foi superior a sete dias, e o acompanhamento da evolução do processo inflamatório foi de no máximo cinco horas.

A prolactina pode exercer efeito anti-inflamatório e pro-inflamatório, dependendo do tipo celular, do tecido e do estado fisiológico do órgão e da duração da hiperprolactinemia. Assim, a hiperprolactinemia, de curta duração, com duração de 5 dias, induzida por domperidona, aumentara a resposta inflamatória. Enquanto, que a hiperprolactinemia de longa duração, 30 dias, obtida por meio da implantação de hipófise ectópica, tem efeitos anti-inflamatórios sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo do edema da pata do rato (OCHOA-AMAYA et al., 2011).

Em concentrações fisiológicas, 100 ng.ml^{-1} , a prolactina pode aumentar seletivamente a liberação do $\text{TNF}\alpha$ e da IL-12 por estimulação de lipopolissacarídeos. Por outro lado, a síntese de IL-10, poderia inibir as reações inflamatórias por diminuir a produção de IL-12 e $\text{TNF}\alpha$. Tem sido sugerido que, quando os níveis de prolactina encontram-se elevados, acima de 200 ng.ml^{-1} , algumas citocinas, tais como $\text{TNF}\alpha$ e IL-12, agem como mediadores da inflamação. Concentrações altas de prolactina, 300 ng.ml^{-1} , podem ativar um sistema de *feedback* intermediado por IL-10, limitando assim a reatividade pro-inflamatória (OCHOA-AMAYA et al., 2011).

A atividade da prolactina em outros modelos animais de inflamação aguda e crônica também vem sendo investigada. A administração repetida de prolactina ovina em ratos provocou um aumento significativo nos parâmetros inflamatórios, tais como número de leucócitos e prostaglandina E_2 , no exsudado na pleurisia experimental induzida pela carragenina. Um efeito pró-inflamatório também estava presente após a hiperprolactinemia induzida por enxerto de glândula pituitária. Além disso, a resposta inflamatória ao implante da esponja de poliéster foi significativamente potencializada pela prolactina ovina. Por outro lado, no teste do granuloma induzido pelo pellet de algodão, não foi evidenciado efeito da prolactina (MELI et al., 1993).

A prolactina tem uma potente ação antiangiogênica, vasoconstritora, e diminui a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Essas ações são mediadas pela fração 16-Kda de prolactina, uma vasoinibina que atua diretamente sobre as células endoteliais para bloquear o crescimento dos vasos e a dilatação, além de promover a regressão vascular mediada pelo apoptose. Esses achados podem ter uma função potencial na manutenção dos vasos sanguíneos normais com implicações terapêuticas (MACOTELA et al., 2002; JARA et al., 2011; TRIEBEL et al., 2015). Pacientes com asma apresentam angiogênese exacerbada nos brônquios, mais vasos e maior percentual de área vascular quando comparado aos não asmáticos. Aqueles com asma severa apresentam um número significativamente maior de vasos do que portadores de asma leve ou moderada (SALVATO, 2001). Poucos estudos de tratamento da asma em humanos com antagonista da dopamina têm sido conduzidos. Foi descrito que o uso da domperidona em pacientes com refluxo gastroesofágico associado à asma, teria um possível valor terapêutico como antiangiogênico e apoptótico sobre a microcirculação durante a doença. Assim, é

necessário elucidar os mecanismos pelos quais a prolactina afeta a atividade da resposta alérgica pulmonar.

2.1.5 Asma e lactação: um papel para a prolactina?

São conhecidos relatos verbais de que mulheres asmáticas durante a lactação apresentam melhoras na resposta alérgica pulmonar. Isso faz com que elas apresentem menos crises asmáticas. Durante a lactação ocorrem várias adaptações fisiológicas, como por exemplo, a atenuação às respostas imunes e ao estresse. Seja em relação a estressores tanto fisiológicos ou físicos. Um dos melhores exemplos de resposta atenuada ao estresse é visto nas ratas durante a prenhez tardia e a lactação. Durante essas fases reprodutivas, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), mantém respostas mínimas necessárias para fazer frente a alguma situação que possa ameaçar o equilíbrio dinâmico da rata. Refletido por uma secreção reduzida de ACTH e corticosterona. Essa resposta reduzida é observada ao longo do parto e da lactação até o desmame (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013).

As modificações do SNC podem influenciar o sistema imune (SI). O SI também pode alterar o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (BASSO et al., 2004). Essas interações bidirecionais têm uma importante função na modulação da susceptibilidade do organismo e à resistência dele às enfermidades infecciosas e inflamatórias (STERNBERG, 2001). Dessa maneira, produtos tidos como específicos do SI, ou do sistema neuro-endócrino, coexistem nos tecidos linfóides, endócrinos e nervosos. Mediadores endócrinos e neurais podem afetar o SI e mediadores imunes podem afetar estruturas neurais e endócrinas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Assim, os dois sistemas, SNC e SI, participam ativamente da resposta ao estressor, modulando o comportamento e a atividade imune de acordo, com o tipo, a duração e a intensidade do agente estressor. As respostas emitidas em consequência destes estímulos estressores são geralmente adaptativas em curto prazo (MCEWEN et al., 1997; DHABHAR, 2002; VISWANATHAN; DAUGHERTY; DHABHAR, 2005). No entanto, elas podem ser prejudiciais quando o

estímulo estressor se mantém por um período prolongado (MCEWEN et al., 1997; SAUL et al., 2005). Tanto excesso ou respostas inadequadas ao estresse são associados com enfermidades: os excessos com susceptibilidade aumentada à infecção, e respostas inadequadas do eixo HPA com susceptibilidade aumentada às enfermidades inflamatórias, alérgicas e autoimunes. Esses mecanismos são relevantes para enfermidades como asma alérgica, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e enfermidade atópica da pele, entre outras (STERNBERG, 2001).

As citocinas, peptídeos, neurotransmissores e seus receptores, são elementos endógenos que medeiam e influenciam o funcionamento e a comunicação entre os sistemas imune, endócrino e nervoso (CARR; BLALOCK, 1989; STERNBERG, 2001; BASSO et al., 2004; MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013). Além das respostas endócrinas alteradas durante a lactação, o estresse também modula o funcionamento do sistema imune de forma particular nas fêmeas lactantes em comparação com as fêmeas não lactantes. Possivelmente a comunicação bidirecional entre o sistema imune e o sistema endócrino esteja também alterada durante a lactação (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013). A prenhes e a lactação representam modelos experimentais que ilustram como os níveis elevados de corticosterona e as respostas ao estresse diminuídas afetam o sistema imune (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013).

Os esteroides gonadais também têm uma importante função na modulação imune e parecem contribuir para que fêmeas apresentem 2 a 10 vezes mais enfermidades autoimunes e inflamatórias que machos. Outros hormônios também regulam respostas imunes, entre eles a prolactina, hormônios da tireoide, hormônio do crescimento, fator 1 de crescimento relacionado com a insulina e andrógenos (STERNBERG, 2001).

A prolactina é um hormônio peptídico secretado pela hipófise anterior e é conhecida por regular estresse e reprodução além de uma extensa variedade de processos fisiológicos (NEILL, 2006). A prolactina é secretada de forma pulsátil durante os diferentes estados do ciclo reprodutivo. Além de um aumento durante a ovulação ocorre também um aumento grande da prolactina durante a lactação e no parto

(DÍAZ GONZÁLEZ; CERONI DA SILVA, 2006). Durante a prenhes, os níveis são altos na primeira metade, eles diminuem até o término, e logo aumentam outra vez no post parto e ao longo da lactação (BRIDGES et al., 1993). Tem-se estabelecido experimentalmente no modelo murino, que a pituitária secretou prolactina durante a primeira semana da prenhes, sendo capaz de sustentar o desenvolvimento luteal e manter os níveis normais da secreção de progesterona. Para o dia 7 a prolactina pituitária não é essencial devido à expressão de luteotrofinas como a prolactina da decídua e da placenta (NEILL, 2006). Esse hormônio proteico tem atividade similar à prolactina e ao GH, chamado lactogênio placentário (PL) ou somatomamotropina (DÍAZ GONZÁLEZ; CERONI DA SILVA, 2006), sua atividade biológica é idêntica à prolactina pituitária nos dias 7 ao dia 11 (NEILL, 2006). Finalmente ao dia 12 aparece a prolactina pituitária quando a produção da prolactina decidual declina. A prolactina pituitária não é essencial para o desenvolvimento da gestação (NEILL, 2006).

A lactação é um modelo natural de neuro-proteção no qual a prolactina pode participar (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013). A lactação é um estado de hiperprolactinemia fisiológica. O estresse emocional e físico pode estimular a secreção de prolactina, o que poderia ser uma adaptação para assegurar a competência do sistema imune e as respostas próprias fisiológicas e comportamentais ao estresse (ADÁN et al., 2014). A prenhes e a lactação são condições únicas nas quais o sistema imune é modulado ou ajustado, mas não totalmente suprimido (MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013).

A prolactina também é produzida em vários sítios extra pituitários, incluindo células do sistema nervoso e imune sendo um importante mediador da rede neuroendócrina. Os efeitos da prolactina sobre o sistema imune são complexos (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011; MONASTERIO; VERGARA; MORALES, 2013; ADÁN et al., 2014). Um dos aspectos curiosos da biologia da prolactina é a modulação das respostas autoimunes e a inflamação. Vários estudos têm documentado a habilidade da prolactina para estimular a proliferação e a atividade inflamatória das células imunes. Com a exceção do lúpus eritematoso, doenças como a esclerose múltipla e a artrite reumatoide. Esses estudos não têm conduzido

a resultados conclusivos (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011; ADÁN et al., 2014; COSTANZA et al., 2015).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual várias células, tais como os eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos T, têm papel fundamental (TIAN et al., 2014). A asma resulta de uma resposta Th2 inapropriada contra antígenos inócuos aerotransportados. É necessária para o desenvolvimento da doença e aparecimento dos sintomas, a exposição ao alérgeno (VERHASSELT, 2010). A infiltração dos eosinófilos e linfócitos Th2 CD4⁺ nas vias aéreas é a característica principal (TIAN et al., 2014; CHOY et al., 2015). A hipersecreção de muco nas paredes bronquiais também é característica da doença (TIAN et al., 2014; ZHOU et al., 2015).

Existem trabalhos feitos em modelos murinos para prevenção da asma na prole, com exposição deliberada da mãe a alérgenos em aerossol pela via oral durante o período de lactação ou amamentamento. Esses estudos sugerem que o leite materno pode ativamente modular a resposta imune da prole, pela transferência do alérgeno pelo leite e, ao longo do desenvolvimento da prole, indução da tolerância imune a enfermidades alérgicas como a resposta alérgica pulmonar (VERHASSELT, 2010).

3 PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

A proposta do presente estudo foi investigar os possíveis efeitos que níveis altos de prolactina teriam sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar em diferentes paradigmas tendo sempre como modelo o rato *Ratus norvergicus*. Uma vez revelado o efeito do aumento dos níveis plasmáticos de prolactina na reação alérgica, buscou-se identificar e compreender os processos de sinalização envolvidos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da hiperprolactinemia induzida pela domperidona antes do desafio inalatório, antes da apresentação do antígeno e após o desafio inalatório, bem como da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratos sensibilizados e desafiados com a ovoalbumina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da hiperprolactinemia de cinco dias antes do desafio inalatório, num modelo de resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratos sobre o influxo celular pulmonar, perfil de migração celular na medula óssea e no sangue, concentração das citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, TNF α) nos sobrenadantes dos explantes de pulmão e IFN γ no lavado broncoalveolar (BAL), produção de muco e colágeno em tecido pulmonar, níveis plasmáticos de corticosterona, adrenalina e noradrenalina, a presença do receptor purinérgico P2X7R no pulmão e do receptor de prolactina em granulócitos e de receptor CD3 em linfócitos T C4 positivos e CD8 positivos.

- Avaliar num modelo de resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratas fêmeas em lactação o influxo celular pulmonar, o perfil de migração celular na medula óssea e no sangue, a concentração das citocinas TNF α e IFN γ no lavado broncoalveolar (BAL) e os níveis plasmáticos de corticosterona, adrenalina e noradrenalina.
- Avaliar a influência da hiperprolactinemia de cinco dias feita antes da imunização, num modelo de resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratos sobre o influxo celular pulmonar, perfil de migração celular na medula óssea e no sangue, concentração das citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, TNF α) nos sobrenadantes dos explantes de pulmão e IFN γ no lavado broncoalveolar (BAL), produção de muco e colágeno em tecido pulmonar, níveis plasmáticos de corticosterona, adrenalina e noradrenalina.
- Avaliar a influência da hiperprolactinemia de cinco dias feita após de estabelecida a alergia pulmonar, sobre o influxo celular pulmonar, perfil de migração celular na medula óssea e no sangue, concentração das citocinas (IL-6, IL-10, TNF α e IFN γ) nos sobrenadantes dos explantes de pulmão, níveis plasmáticos de corticosterona, adrenalina e noradrenalina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos adultos divididos em 4 grupos experimentais: grupo N= *Naive*, ratos não sensibilizados; desafiados ou tratados, C= controle, ratos sensibilizados e desafiados por via inalatória com ovoalbumina; grupo V= veículo, ratos asmáticos, tratados por 5 dias com veículo da domperidona; grupo D= domperidona, ratos asmáticos, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ por dia) divididas em três injeções diárias: 06h30; 14h00 e 21h00, via *i.p.* para o tratamento da hiperprolactinemia de curta duração.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, geneticamente similares e provenientes de prole obtida no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em salas com ventilação, umidade e temperatura controladas (22°-23°C) e iluminadas artificialmente, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 7h00 horas. Água e comida foram fornecidas à vontade durante todo o experimento, sendo retiradas durante as observações experimentais.

Todos os animais foram usados de conformidade com as normas e guias do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, que foram baseadas no “*Committees on Care and Use of Laboratory Animal Resources*”, *National Research Council, USA*.

4.2 FÁRMACOS

Entre os fármacos usados estão os seguintes Ovoalbumina, Domperidona, Cloridrato de Xilazina 2%, Cloridrato de Quetamina 5%, os que são explicados a continuação.

4.2.1 Ovoalbumina (OVA)²

Indutor de resposta inflamatória alérgica pulmonar. A OVA administrada na dose de 10 µg mais 10 mg de Hidróxido de Alumínio (EMS Pharmaceuticals, Brazil) e dissolvida em solução salina buferada (PBS), via subcutânea (s.c.) sensibiliza as ratas. A OVA de 10,0 µg dissolvida em solução de PBS via subcutânea (s.c.) em dose 0,1 mg.kg⁻¹, que atua como desafio (*booster*) da resposta alérgica pulmonar. A OVA em aerossol (1% em PBS) administrada em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico o qual gera uma neblina (tamanho médio 0,5 – 1,0 µm) (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004).

4.2.2 Domperidona³

É um fármaco procinético gástrico e antiemético que é antagonista dos receptores D₂ da dopamina, particularmente dentro do sistema dopaminérgico tuberoinfundibular e induz hiperprolactinemia (BAILEY; HERBERT, 1982; FELICIO; BRIDGES, 1992; NASELLO et al., 1997; CRUZ-CASALLAS et al., 1999; GÓMEZ-OCHOA et al., 2009; OCHOA-AMAYA et al., 2010). A domperidona foi dissolvida em solução salina fisiológica 0,9% *tween* 80, administrada na dose de 5,1 mg.kg⁻¹ divididos em três injeções diárias, via *i.p* (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011).

4.2.3 Cloridrato de Xilazina 2%⁴

É uma droga thiazole que é usada só ou em associação com outros fármacos para sedação, imobilização e anestesia. Analgesia induzida pela xilazina tem sido

² Egg Albumin Grade II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

³ Johnson & Johnson

⁴ Konig

demostrada em várias espécies incluindo a rata e o camundongo. O efeito da xilazina sob o sistema respiratório é mínimo. Administração *i.p.* 5 mg.kg⁻¹ do peso corporal (FISH, 1997).

4.2.4 Cloridrato de Quetamina 5%⁵

É um anestésico dissociativo, não barbitúrico de curta ação que produz boa analgesia inclusa a doses não anestésicas, mas não relaxa a musculatura esquelética. Administração *i.p.* 30 mg.Kg⁻¹ do peso corporal (HITNER; NAGLE, 2012).

4.3 MODELOS DE HIPERPROLACTINEMIA

A domperidona é um bloqueador dos receptores D₂ da dopamina que em doses baixas não ultrapassa a barreira hematoencefálica (MATERA et al., 2000) ela atua sobre a pituitária e aumenta a secreção de prolactina (CHAMPION, 1988; FELICIO; BRIDGES, 1992; OCHOA-AMAYA et al., 2010). Para a administração de domperidona, foram administrados 5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal, divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p* por 5 dias consecutivos (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011) do dia 10 ao dia 14 após a imunização. Este protocolo de tratamento tem sido efetivo para produzir hiperprolactinemia estável por mais de 30 dias (BAILEY; HERBERT, 1982). O grupo controle para este modelo foi constituído por machos tratados com 1 ml.kg⁻¹ de solução salina fisiológica *tween* 80.

4.4 DOSAGENS DE PROLACTINA

Para todos os experimentos, todos os animais foram sacrificados por exsanguinação através da aorta abdominal. O sangue foi colhido em tubos de vidro e deixado à

⁵ König

temperatura ambiente até a formação do coágulo. Em seguida, foi centrifugado para separar o plasma que foi guardado a -80°C até a realização da dosagem de prolactina. Todas as coletas de sangue foram realizadas num mesmo horário para evitar as variações rítmicas do hormônio.

Para a determinação dos níveis plasmáticos de prolactina foi empregada a técnica de radioimunoensaio, utilizando o protocolo de (NISWENDER et al., 1969), usando kits específicos. O antissoro para prolactina foi PRL-S9 anti-rato, a preparação de referência foi PRL-RP3. O limite menor de detecção de prolactina foi 0,19 ng/ml de sensibilidade e os coeficientes de variação inter e intra-ensaios foram de 11,5% e 4% respectivamente. Os níveis de prolactina são reportados como ng/ml (CARVALHO-FREITAS et al., 2007, 2011).

4.5 DOSAGENS DE CORTICOSTERONA

Alíquotas séricas do sangue tomadas na segunda coleção foram usadas para determinação de corticosterona, sendo guardadas a -80°C. A corticosterona sérica foi determinada por kits comerciais “enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Arbor Assays, #K014)” de acordo as instruções do fabricante, com uma diluição sérica de 1:300. As amostras sanguíneas foram coletadas sempre na mesma hora (9 - 12 m) para diminuir a variabilidade nos dados (DE OLIVEIRA et al., 2011).

4.6 MODELO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.

O protocolo para sensibilização animal da ovoalbumina e desafio do antígeno foi o seguinte a continuação.

Para fazer a sensibilização (dia 0) dos animais foram utilizados 10 µg ovoalbumina e 10 mg de hidróxido de alumínio que foram preparadas em NaCl 0,9% ou em solução salina (PBS) s.c. Após uma semana (dia 7) os ratos receberão 10 µg de OVA

dissolvido em solução salina ou PBS por via s.c. na dose de $0,1 \text{ ml.Kg}^{-1}$ (*booster*). Para o desafio com a OVA (1% em PBS) foi administrada em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico o qual gera uma neblina (tamanho médio $0,5 - 1,0 \mu\text{m}$) e os animais foram submetidos a uma única exposição diária de OVA via aerossol por 15 minutos por três dias consecutivos (dias 14, 15, 16) (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

4.7 COLETA DO SANGUE PERIFÉRICO

24 horas após o desafio com OVA os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal foi aberta, duas alíquotas de amostras de sangue foram tomadas da aorta abdominal dos ratos. Na primeira coleção do sangue para contagem total dos leucócitos circulantes, seringas plásticas contendo $50 \mu\text{l}$ de EDTA 8% foram usadas. Essas amostras foram subsequentemente diluídas 1:20 em líquido de Turk (3% de ácido acético). Sobre um esfregaço sanguíneo corado com May-Gruwald-Giemsa foi feita contagem diferencial das células no sangue no microscópio de luz (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

4.8 LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO PULMÃO

O lavado broncoalveolar (BAL) foi feito de acordo a técnica de (DE LIMA; SIROIS; JANCAR, 1992). 24 horas após o desafio os animais foram anestesiados profundamente por Cloridrato de Xilazina 2% (5 mg.Kg^{-1}) *i.p.* e Cloridrato de Quetamina 5% (30 mg.Kg^{-1}) *i.p.* e posteriormente sacrificados por exsanguinação da Aorta abdominal. Os pulmões foram lavados com $4,0 \times 5,0 \text{ ml}$ de PBS heparinizado e/ou RPMI-1640 (20 ml) através de uma cânula de polietileno (1 mm de diâmetro interno) inserida por traqueotomia. O líquido coletado da cavidade pleural foi utilizado para a avaliação do volume de exsudado (volume de líquido retirado - volume de PBS injetado) e para a contagem de células inflamatórias contidas no

exsudado pleural. Para tanto, este foi centrifugado a 170 x g por 10 minutos a 20 °C em centrífuga clínica e o resultado do pellet celular foi resuspendido em RPMI - 1640 (1ml). O sobrenadante foi desprezado. Alíquotas da suspensão celular foram diluídas 1:20 com solução de Turk e a contagem total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer. A contagem de leucócitos diferencial foi feita em esfregaços corados pelo método de Giemsa (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

4.9 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA

O número total das células da medula óssea (MO) foi quantificado no fluido de lavado medular (FML) obtido imediatamente após de realizado o BAL e de fazer as coletas do sangue periférico, os fêmures dos ratos foram removidos. Uma agulha conectada a uma seringa de plástico contendo PBS (5ml) foi inserida na medula femoral para permitir a o lavado celular. O fluido medular (FML) foi centrifugado (170 g x 10 min).

O pellet celular remanente foi ressuspenso, processado, e analisado para contagem de leucócitos total como descrito para o BAL (OLIVEIRA et al., 2008).

4.10 AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES PARA PROLACTINA POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células do BAL e medula foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos, lavadas e mantidas em PBS a 4°C. No dia seguinte, foi realizado um bloqueio para ligações inespecíficas com soro de camundongo 1:10 em PBS. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e marcadas com anticorpo monoclonal anti-PRLR de ratos conjugado ao fluorocromo aloficocianina (APC) (Novus biologicals), na concentração recomendada pelo fabricante para imunocitoquímica, 5µg/ml. Após incubação de uma hora foi feita nova lavagem com PBS e as células foram ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo, modelo FACScalibur (BD Biosciences). As células do BAL e da medula óssea foram identificadas

primeiramente em gráfico de tamanho e complexidade interna (FSC x SSC) e em seguida cada população foi avaliada em relação à expressão dos receptores de prolactina em razão da positividade de APC. Foram considerados o percentual de células positivas para PRLR (% APC positivas) e a quantidade de receptores expressos por célula (média geométrica de fluorescência).

4.11 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS EM EXPLANTES DE PULMÃO

Foram determinadas as (IL-4, IL-6, IL-10 e TNF α) em amostras de sobrenadantes de explantes de pulmão mantidos em cultivo (DE OLIVEIRA et al., 2011) dos seguintes grupos experimentais *naïve* (N), controle (C), veículo (V), domperidona (D). O pulmão restante foi cortado ao acaso dentro de 4 pequenas partes e depois foram distribuídas dentro de 24 placas que foram cheias com 1 ml do meio de Eagle's modificado de Dulbecco's (DMEM) contendo 0,5% de penicilina estreptomicina (10.000 UI – 10 mg.ml⁻¹) com ou sem 1 mg/ml de tratamento de OVA, e incubadas por 24 horas a 37°C com 53% de CO₂. Os resultados foram expressos como picogramas (pg) de citocina produzida por mg de peso seco de tecido pulmonar. As citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF α , IFN γ foram quantificadas usando os kits de ELISA (BD OptEIA rat cytokine ELISA kits, BD Biosciences). Determinações foram feitas em duplicata para cada amostra usando curvas standard de acordo com as especificações dos kits.

4.12 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS NO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (BAL)

As concentrações de citocinas e quimiocinas no BAL dos seguintes grupos experimentais *naïve* (N), controle (C), veículo (V), domperidona (D) foram medidas com ELISA (ELISA; R&D Systems, USA). O rango da curva foi: 39.10 – 2500 pg/ml.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DE MUCO E COLÁGENO NO PULMÃO

Amostras de pulmão foram fixadas em formol a 10 % e foram processadas pelos métodos de rotina para microscopia de luz, e secções histológicas (3-4 mm de grosso) foram coradas com hematoxilina & eosina (HE) para observar as mudanças patológicas. Nos cortes foram levadas a cabo colorações com ácido periódico de Schiff (PAS) para detectar produção de muco, e nas outras secções foi feita a coloração picrossirius para observar a presença de fibras de colágeno. Para determinar a quantidade de muco produzido pelas células caliciformes, as áreas foram estimadas entre a capa mais interna da mucosa e a muscular externa da mucosa de 5 bronquíolos em cada animal, foi usada uma magnificação de 100X usando um microscópio Nikon Eclipse 80i, camera infinity e o software ImagePro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), que usou fotografias tiradas dos micro preparados feitos. Também o programa computacional permitiu determinar a área positiva para a coloração do PAS, com a diferenciação e quantificação das áreas de matizes apresentadas (PAS positivo roxo) dando a percentagem de muco/bronquíolo/animal. Com o processamento da informação no Microsoft Excel, a percentagem da produção de muco foi obtida, media por animal por grupo e análise estatística foi feita. Da mesma forma para estimar a percentagem de colágeno gerado e pelo Image Pro Plus 5,0 software (Media cybernetics, Silver Spring, MD USA), que usou fotografias do pulmão, foram selecionados 5 bronquíolos por animal, foi determinada a área tomando como referente a muscular da mucosa ate o inicio dos alvéolos circundantes ao bronquíolo (SILVA et al., 2014). Esse programa permitiu determinar a porcentagem de fibras positivas para o colágeno coradas nos tecidos de cor roxa. Com o processamento desta informação pelo Microsoft Excel, se obteve a percentagem de colágeno produzido pelos animais, se tirou a media por animal e se fez a respectiva análise estatística.

4.14 PADRONIZAÇÃO DE DOSAGEM DE NOR E ADRENALINA EM PLASMA DE RATO

De acordo ao o Método com alumina (FOTI et al., 1987) e fazendo as modificações pertinentes para dosagem das catecolaminas, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a detector eletroquímico (CLAE-DE; Shimadzu Modelo 20A) em fase reversa com pareamento iônico (heptano sulfônico). O CLAE-DE possui injetor automático sendo injetado 70 µL por amostra. O sistema foi mantido num fluxo isocrático de 1 mL/min e a temperatura do forno foi mantida em 50°C. Utilizou-se uma coluna de 15 x 4,6 mm, partícula de 5 µm (C-18 Shimpack®). O potencial elétrico no detector eletroquímico (Altec-Decade) foi de 800 mV. A fase móvel foi constituída por tampão fosfato-citrato (ácido heptanossulfônico 3mM, fosfato de sódio anidro 20 mM, citrato de sódio 23 mM, ácido etilendiamino tetra 0,1 mM, 3% de metanol v/v e 1% de acetonitrila v/v) pH 3,18. A fase móvel foi filtrada através de membrana com porosidade de 0,45 µm e deaerada com auxílio de banho ultrassônico. Para extração das catecolaminas em plasma, utilizou-se a técnica de extração líquido-líquido e o 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) como padrão interno (PI). Para este procedimento, transferiu-se 500 µL de plasma para um microtubo com capacidade de 2,0 mL, contendo solução de ácido perclórico 0,2 M, 30 mg de alumina e PI. Essa solução foi submetida à 30 min de agitação em plataforma orbital e centrifugada, sob refrigeração, por 10 min 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o restante foi lavado três vezes com 1 mL de água gelada deionizada e centrifugado por mais 10 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e os analitos foram eluídos com 150 µL de solução de ácido perclórico, posteriormente agitado em vórtex por 5 min e submetido ao mesmo processo de centrifugação. O sobrenadante foi retirado e analisado.

4.15 MÉTODO DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE RECEPTOR P2X7R

Os pulmões foram removidos em bloco, fixados em formalina e embebidos em parafina. Secções de espessura de 5 µm foram cortadas do tecido pulmonar. A

imuno-histoquímica foi realizada com anticorpo para receptor purinérgico 7 (P2X7R) (Santa Cruz, CA , EUA). Um kit ABC Vectastin (Vector Elite PK - 6105 ou PK - 6101) foi usado como o anticorpo secundário e 3,3- diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St Louis , MO, EUA) foi usada como o cromogênio. As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). A área do epitélio foi medida, tal como foi a área positiva para o anticorpo descrito acima, utilizando um programa de análise de imagens (Image-Pro Plus ; Media Cybernetics, Silver Spring , MD , EUA). Os resultados foram expressos como a percentagem de área positiva imunocoradas em relação à área total do epitélio. As medições foram realizadas para o epitélio completo das 5 vias respiratórias por cada animal com uma ampliação de 400 x (VIEIRA et al., 2011).

4.15 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DO DESAFIO COM O ANTÍGENO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA

4.15.1 Delineamento Experimental

Ratos machos de 60 a 90 dias de idade foram divididos ao acaso em quatro grupos, um grupo *naïve* (N), um grupo controle (C), um grupo veículo (V) e um grupo experimental tratado com domperidona (D). O grupo N não recebeu nenhum tratamento.

No dia 0, todos os animais do grupo C, V e D receberam injeção de ovoalbumina mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ sc para sensibilizar ativamente os animais conforme descrito em (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011). No dia 7, todos os animais do grupo C, V e D foram submetidos ao *booster* s.c. com 10 µg de OVA mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$. No dia 10 até o dia 14, o grupo D foi tratado durante 5 dias com a domperidona como descrito anteriormente por (BAILEY; HERBERT, 1982; CHAMPION M. C., 1988; FELICIO; BRIDGES, 1992;

NASELLO et al., 1997; CRUZ-CASALLAS et al., 1999; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011) e igualmente o grupo V foi administrado NaCl 0,9% do dia 10 ao dia 14 após a imunização. Nos dias 15, 16 e 17, todos os animais dos grupos C, V e D foram colocados individualmente em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico onde receberam OVA em aerossol (1%) por 15 minutos por dia como descrito por (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011). O desenho experimental é ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1 - Delineamento experimental do efeito da hiperprolactinemia de curta duração, antes do desafio ao antígeno, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

4.15.2 Coleção das Amostras

No dia 18, após o desafio com a OVA, todos os animais tiveram o sangue coletado através da aorta abdominal para obtenção de soro e dosagem de prolactina, e corticosterona. Finalizada a instauração da inflamação alérgica pulmonar os ratos foram submetidos aos seguintes procedimentos, de acordo com o descrito anteriormente, coleta de sangue periférica, o BAL seguida de contagem de leucócitos totais e diferenciados tanto no BAL como no sangue periférico e na medula óssea (MO). A seguir, foi efetuada necropsia para retirar e pesar as glândulas adrenais. A relação peso úmido das duas glândulas adrenais (em mg) e o

peso corporal (em g), foram também analisadas calculadas e comparadas entre os grupos (peso dia 18 - peso dia 0). A determinação das citocinas nos explantes de pulmão foi determinada por meio de kits de Elisa. Para a análise histopatológica as mostras foram fixadas em formol a 10% e logo a seguir foi feito o preparo das lâminas para avaliar a infiltração celular ao pulmão, e com o ácido periódico de Schiff (PAS) para detectar produção de muco; e a técnica de Picrosirius para a marcação do colágeno tipo I e tipo II.

4.16 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA LACTAÇÃO SOBRE A RESPOSTA ALÉRGICA PULMONAR

4.16.1 Delineamento Experimental

Ratas fêmeas de 60-90 dias de idade foram divididas ao acaso em três grupos, um composto de ratas virgens, grupo *naïve*, sem tratamento e sem alergia pulmonar (grupo N), um grupo de ratas virgens com tratamento de imunização e sensibilização ao ovoalbumina (grupo V) e um grupo de ratas lactantes com tratamento de imunização e sensibilização ao ovoalbumina (grupo L). Após um mês de habituação, as ratas do grupo L foram acasaladas, emprenharam e geraram suas proles. Quando foi confirmada a prenhes, cada fêmea foi separada individualmente em uma caixa. As virgens foram deixadas em mesmo número por gaiola que as prenhes.

No dia 10 de gestação do grupo L, os animais dos grupos L e V receberam injeção de ovoalbumina mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ sc para sensibilizar ativamente os animais. No dia 17 de gestação do grupo L, os animais dos grupos L e V foram submetidos ao *booster* s.c. com 10 µg de OVA mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Dois dias após o parto, foi feita a padronização das ninhadas (8 animais, sendo 4 fêmeas e 4 machos o ideal, na medida do possível). Nos dias 3, 4 e 5 após o parto, todos os animais adultos dos grupos L e V foram colocados em grupos de 4

animais em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico onde receberam OVA em aerossol (1%) por 15 minutos por dia.

No dia 6 após o parto, 24 horas após o último desafio com a OVA, os animais foram pesados para fazer a anestesia. Logo após todos os animais tiveram o sangue coletado através da aorta abdominal para obtenção de plasma e dosagem de prolactina, catecolaminas e corticosterona. As ratas foram submetidas aos seguintes procedimentos, de acordo com o descrito anteriormente, coleta de sangue periférico, do lavado broncoalveolar (BAL) seguida de contagem de leucócitos totais e diferenciados tanto no BAL como no sangue periférico e na medula óssea (MO). A seguir, foi efetuada necropsia para retirar e pesar as glândulas adrenais. Foi calculada a relação peso úmido das duas glândulas adrenais (em mg) e o peso corporal (em g).

Figura 2 - Delineamento experimental do efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Os experimentos que se seguem, experimento3 e experimento 4, foram desenhados com vistas a avaliar a relevância do momento em que ocorre a hiperprolactinemia em relação à sua possível modulação da expressão da alergia pulmonar.

4.17 EXPERIMENTO 3. HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DA SENSIBILIZAÇÃO, E RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA

4.17.1 Delineamento Experimental

Ratos machos de 80 a 100 dias de idade ou com peso entre de 270- 370 g foram divididos ao acaso em quatro grupos, um grupo *naïve* (N), um grupo controle (C), um grupo veículo (V) e um grupo experimental tratado com domperidona (D). O grupo N não recebera tratamento nenhum. Um grupo *naïve* (N), um grupo controle (C), um grupo veículo (V) e um grupo domperidona (D). O grupo D foi tratado durante 5 dias com a domperidona. No grupo V foi administrado NaCl 0,9%. O tratamento destes grupos iniciou-se 5 dias antes do dia da sensibilização.

No sexto dia, todos os animais do grupo C, V e D foram injetados com a ovoalbumina mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de 0,1 mg.Kg⁻¹ sc (dia 0) para sensibilizar ativamente os animais. No dia 13, todos os animais do grupo C, V e D foram submetidos ao *booster* s.c. com 10 µg de OVA mais 10 mg de hidróxido de alumínio dissolvida em PBS na dose de 0,1 mg.Kg⁻¹. Nos dias 20, 21 e 22, todos os animais dos grupos C, V e D foram colocados individualmente em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico onde receberam OVA em aerossol (1%) por 15 minutos por dia conforme descrito por (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

O desenho experimental é ilustrado na **Figura 3**.

4.17.2 Coleção das Amostras

No dia 23, após do desafio com a OVA, todos os animais tiveram o sangue coletado através da aorta abdominal para obtenção de soro e dosagem de prolactina e corticosterona.

Finalizada a instauração da inflamação alérgica pulmonar os ratos foram submetidos aos seguintes procedimentos, de acordo com o descrito anteriormente por (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011), onde foi realizada a coleta de sangue periférica, o BAL e a contagem de leucócitos totais e diferenciados tanto no BAL, no sangue periférica e na MO. A determinação das citocinas nos explantes de pulmão e do BAL foi determinada através dos kits de Elisa e para a histopatologia as amostras foram imersas em formol a 10 % para logo ser feita a histotecnica para determinar a infiltração celular ao pulmão, a avaliação com o acido periódico de Schiff (PAS) para detectar produção de muco e a técnica de picrosirius para detecção de colágeno.

Figura 3 - Delineamento experimental do efeito da hiperprolactinemia de curta duração, antes da sensibilização, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

4.18 EXPERIMENTO 4: HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELO OVO ALBUMINA APÓS DE ESTABELECID A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.

4.18.1 Delineamento experimental

Ratos machos de 80 a 100 dias de idade foram divididos ao acaso em quatro grupos, um grupo *naive* (N), um grupo controle (C), um grupo veículo (V) e um grupo domperidona (D). O grupo Naive (N) não recebeu tratamento nenhum.

No dia 0, todos os animais do grupo C, V, D foram injetados com a ovoalbumina s.c. para sensibilizar ativamente os animais conforme descrito em (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

No dia 7, todos os animais dos grupos C, V, e D foram submetidos ao *booster* s.c. com 10 µg de OVA dissolvida em NaCl 0.9% na dose de 0,1 mg.Kg⁻¹.

Nos dias 14, 15 e 16, todos os animais dos grupos C, V e D foram colocados individualmente em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico onde receberam OVA em aerossol (1%) por 15 minutos por dia como descrito em (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011).

No dia 17 até o dia 21, o grupo D foi tratado durante 5 dias com a domperidona como descrito anteriormente e igualmente o grupo V foi administrado NaCl 0,9% como foi indicado anteriormente por 5 dias consecutivos.

No dia 22, após do desafio com a OVA e dos 5 dias do tratamento com a Domperidona todos os animais foram exsanguinados através da aorta abdominal e seu sangue colhido para obtenção de soro e dosagem de PRL, corticosterona, adrenalina e noradrenalina.

Finalizada a instauração da inflamação alérgica pulmonar os ratos foram submetidos aos seguintes procedimentos de acordo com o descrito anteriormente, onde foi realizada a coleta do sangue periférica, o BAL e a contagem de leucócitos totais e diferenciados tanto no BAL, como no sangue periférica e na MO. A determinação das citocinas nos explantes de pulmão foi determinada através dos kits de Elisa e para a histopatologia as amostras foram fixadas em formol buferado ao 10% para ser feita a histotecnia para determinar a infiltração celular ao pulmão com hematoxilina e eosina, e com o ácido periódico de Schiff (PAS) para detectar produção de muco e picrossirius para observar a presença de fibras de colágeno.

O desenho experimental é ilustrado na **Figura 4**.

Figura 4 - Delineamento experimental da hiperprolactinemia de curta duração na resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pelo ovo albumina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

4.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O primeiro teste que se fez foi o teste da normalidade que é o "*D'Agostino and Pearson omnibus and normality test*" para avaliar: o lavado bronco-alveolar (BAL), a contagem total e diferencial do BAL, o lavado medular femoral, a celularidade sanguínea total e diferencial, a contagem celular e o peso absoluto das glândulas adrenais (mg), a relação peso adrenais/peso corporal (mg/g), e o peso corporal (g).

Uma vez constatado um padrão de normalidade para esses fenômenos, o resultado da prova de *Bartlett's test* foi usado para verificar se as variâncias eram equivalentes. A seguir foi utilizada a ANOVA para comparar as médias de todos os grupos, seguida do teste de *Newman-Keuls Multiple Comparison Test* para comparar os diferentes grupos entre si. Quando os dados que não mostraram distribuição normal dentro de cada momento de avaliação, foram analisados utilizando provas não paramétricas como a prova "t" para amostras não pareadas e foi utilizada a análise de variância de "*Kruskall Wallis*" seguida da prova "U" de *Mann-Whitney*. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o software *GraphPad InStat*®, versão 5.01 (1992-2007) e o grau de significância capaz de revelar diferença foi considerado a partir de $p < 0,05$. Foi medido o coeficiente de correlação de Pearson quando relevante, como no caso das concentrações de prolactina em relação à migração de eosinófilos ao pulmão no grupo domperidona.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DO DESAFIO AO ANTÍGENO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA

A **Tabela 1** mostra que com relação ao Lavado Bronco-alveolar (BAL), a Anova acusou diferença estatística ($F=6,138$). A seguir, o Newman-Keuls multiple comparasion test revelou que o grupo controle apresentou um maior ($p<0,05$) número de células no lavado Bronco-alveolar (BAL) quando comparado com o grupo *naïve*, mas quando é comparado com o veículo não se revela diferença estatisticamente significativa. O grupo controle apresentou maior celularidade do BAL em relação ao grupo domperidona ($p<0,05$). O número de células totais do BAL foi significativamente maior no grupo veículo que o *naïve* ($p<0,05$). Não houve diferenças estatísticas ($p>0,05$) na comparação do BAL dos grupos *naïve* e domperidona. A quantidade de células totais do BAL no grupo veículo com relação ao grupo controle não difere estatisticamente ($p>0,05$), e o grupo veículo foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) aos grupos domperidona e *naïve*, sendo maior a migração ao pulmão no grupo controle.

Quando comparada a celularidade leucocitária total sanguínea, a ANOVA não revelou diferenças estatísticas ($p>0,05$, $F=0,6946$).

Com relação ao reconto diferencial sanguíneo, a ANOVA acusou diferença ($p<0,01$; $F=3,335$). A seguir, o Newman-Keuls multiple comparasion test, revelou que na contagem dos neutrófilos, houve diferenças estatísticas para o grupo controle, tendo este apresentado maior número de neutrófilos em relação aos grupos *naïve* e domperidona ($p=0,0007$). Com relação aos linfócitos e monócitos, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). Também em relação aos eosinófilos sanguíneos, não houve diferenças estatísticas ($p>0,05$).

Com relação à contagem das células da medula óssea, a ANOVA-Newman-Keuls multiple comparison test revelou ($p < 0,05$, $F = 10,35$). A contagem de células totais da medula óssea dos grupos controle, veículo e domperidona foi significativamente menor que a do grupo *naïve* ($p < 0,05$). Os valores do grupo controle não foram significativamente diferentes do grupo domperidona e do veículo ($p > 0,05$). O grupo domperidona comparado com os grupos veículo, controle não apresentou diferenças estatísticas no lavado medular femoral ($p > 0,05$). Entretanto, comparando o grupo domperidona com o *naïve*, o grupo domperidona ($p < 0,05$) teve o menor número de células do lavado medular femoral (BFL).

Tabela 1 Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes do desafio ao antígeno sobre a celularidade leucocitária

Parâmetro	GRUPOS			
	<i>Naïve</i>	Controle	Veículo	DOMP
BAL. Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	$14,00^{ad} \pm 3,69$	$69,00^{bc} \pm 9,95$	$53,88^c \pm 5,02$	$17,00^d \pm 3,74$
Sangue ($\times 10^4 \cdot \text{mm}^3$)	$50,80 \pm 7,80$	$76,60 \pm 8,93$	$52,50 \pm 5,09$	$62,29 \pm 11,73$
Linfócitos	$44,62 \pm 7,71$	$54,20 \pm 8,36$	$42,17 \pm 7,48$	$46,12 \pm 10,58$
Neutrófilos	$7,46^a \pm 1,45$	$15,52^b \pm 1,56$	$7,81^a \pm 1,16$	$6,69^a \pm 2,45$
Eosinófilos	$0,37 \pm 0,25$	$1,998 \pm 1,47$	$0,37 \pm 0,13$	$0,0 \pm 0,0$
Monócitos	$0,996 \pm 0,249$	$4,02 \pm 1,25$	$3,18 \pm 0,94$	$4,12 \pm 1,39$
BFL Número total de células ($\times 10^6$)	$152,2^a \pm 24,63$	$82,60^{bdc} \pm 24,24$	$63,44^{dc} \pm 5,242$	$52,56^d \pm 4,476$

Legenda: DOMP = Domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h30; 14h00; 21h00 horas) durante cinco dias.

^{a,b,c,d} $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão.

As Figuras 5, 6, 7, 8 contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 5 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes do desafio da OVA-inalações sobre o numero total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL)

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 mL.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,005$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA

Figura 6 - Efeitos de cinco dias de tratamento com Domperidona antes da OVA-inalações sobre o número total de células presentes no sangue

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $p > 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Figura 7 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; Controle= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $p < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Notas. A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA.

Figura 8 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número total de células presentes na medula óssea

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média ± SE. P<0,005 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA.

Com relação à contagem diferencial de células no BAL, a ANOVA -Newman-Keuls multiple comparasion test revelou que comparando os quatro grupos entre si, somente a contagem dos macrófagos do grupo controle apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $F = 3,185$) sendo que o grupo controle apresentou maior migração dos macrófagos quando comparado ao grupo *naive*. Da mesma forma, com relação aos linfócitos, a maior migração ao pulmão é do grupo controle ($p < 0,05$) comparado com o *naive* ($p = 0,0159$). O grupo *naive* apresentou diferenças estatísticas quando foi comparado com os grupos veículo ($p = 0,0193$). Com referência à migração dos eosinófilos ao pulmão, a ANOVA acusou diferença significativa ($p < 0,05$, $F = 24,41$). Especificamente, o Newman-Keuls multiple comparasion test revelou que houve aumento significativo no grupo controle em relação aos grupos *naive*, veículo e domperidona. A **Tabela 2** mostra os resultados.

Tabela 2 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes do desafio ao antígeno sobre a celularidade leucocitária diferencial no lavado bronco-alveolar (BAL)

Parâmetro	GRUPOS			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	14,00 ^{ad} $\pm$ 3.68	69,00 ^{bc} $\pm$ 9.94	53,88 ^c $\pm$ 5.016	17,00 ^d $\pm$ 3.738
Macrófagos	2,02 ^a $\pm$ 0,91	8,38 ^b $\pm$ 0,66	6,70 ^{ab} $\pm$ 1,56	3,57 ^{ab} $\pm$ 1,39
Linfócitos	3,64 ^a $\pm$ 0,98	13,25 ^{bc} $\pm$ 3,69	11,67 ^{bc} $\pm$ 2,17	7,60 ^{ab} $\pm$ 3,03
Neutrófilos	8,38 $\pm$ 2,49	16,97 $\pm$ 6,87	6,29 $\pm$ 2,01	7,81 $\pm$ 3,52
Eosinófilos	0.0 ^a $\pm$ 0.0	30,39 ^b $\pm$ 2,19	22,93 ^c $\pm$ 2,02	10,56 ^d $\pm$ 2,86

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: DOMP = Domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00 horas) durante cinco dias.

$p < 0,05$ ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test.

Nota: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=5, V=10; D=9).

A Figura 9 contribui para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 9 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-inalações sobre o número do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Domperidona inibe o aumento das células inflamatórias induzidas pela OVA na contagem diferencial do BAL. N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 ($1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA.

A ANOVA não revelou diferença entre os pesos absolutos das glândulas adrenais ($p > 0,05$, $F = 1,184$). Na Relação peso glândula / peso corporal ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), a ANOVA

não revelou diferenças estatísticas ($p>0,05$, $F=0,6373$). A **Tabela 3** mostra os resultados.

Tabela 3 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina antes das ova- inalações

Parâmetro	GRUPOS			
	Naïve	Controle	Veículo	DOMP
Peso glândulas adrenais (mg)	146,0 ± 23,58	144,0 ± 29,77	123,0 ± 6,83	155,0 ± 8,33
Relação peso glândula / peso corporal (mg.g^{-1})	0,38 ± 0,05	0,35 ± 0,07	0,34 ± 0,02	0,40 ± 0,02

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: DOMP = Domperidona ($1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00 horas) durante cinco dias.

$p>0,05$ ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Notas: São apresentadas médias ± erro padrão, (N= 5, C=5, V=8; D=8).

As **Figuras 10, 11** contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 10 - Peso absoluto (mg) das glândulas adrenais em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg^{-1}) antes das OVA-inalações

N=5; C=5; V=10; D=10

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naïve*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média ± SE. $P>0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Figura 11 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg⁻¹) antes das OVA-inalações

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média ± SE. P<0,05 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Com relação aos níveis plasmáticos de corticosterona (**Tabela 4**), a prova de Kruskal-Wallis (K=10,01), seguida da prova de "U" de Mann-Whitney revelou que nos animais tratados com veículo ou domperidona, os níveis de corticosterona mostraram-se estatisticamente mais baixos que nos grupos controle e *naive* (p<0,005; U=4,00). Os níveis plasmáticos de corticosterona dos ratos são representados na **Figura 12**.

Tabela 4 - Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP ²
N	5	5	8	10
Média	5991 ^a	6437 ^a	4163 ^b	3634 ^b
Erro padrão	1591	1041	754,1	202,1

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda:¹ a,b,c,d Dentro de cada linha, médias cujos sobrescritos não possuem nenhuma letra em comum, são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), Kruskal-Wallis, seguida da prova de "U" de Mann-Whitney.

² DOMP=domperidona (1,7 mg.kg⁻¹, i.p., três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00 horas).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 12 - Efeitos do tratamento com domperidona antes das inalações com ovoalbumina (OVA) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

Legenda: N= naive, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via i.p. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como mediana, amplitude inter-quartis e valores máximos e mínimos $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguida da prova de "U" de Mann-Whitney Test).

Com relação aos níveis plasmáticos de prolactina (**Tabela 5**) e ilustrados na **Figura 13**. A ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test ($p < 0,0001$, $F=19,16$) revelou que o grupo domperidona tem os maiores níveis de prolactina e é estatisticamente diferente dos grupos *naive*, controle e veículo.

Os resultados mostram que as concentrações séricas deste hormônio, nos animais tratados com domperidona, são aproximadamente nove vezes maiores que nos animais tratados com o veículo.

Tabela 5 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP ²
N	5	5	9	10
Média	45,87 ^a	35,39 ^a	51,16 ^a	324,7 ^b
Erro padrão	8,995	5,193	10,03	48,63

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda:¹ ^{a,b} Dentro de cada linha, médias cujos sobrescritos não possuem nenhuma letra em comum, são estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$), ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

² DOMP=domperidona (1,7 mg.kg⁻¹, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão

Figura 13 - Efeitos da domperidona antes das inalações com ovoalbumina (OVA) sobre os níveis plasmáticos da prolactina

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como mediana, amplitude inter-quartis e valores máximos e mínimos $P < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Com relação à percentagem de colágeno, a ANOVA- Newman-Keuls multiple comparasion test revelou diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $F = 7,899$) do grupo *naive*,

com relação aos grupos asmáticos, controle, veículo e domperidona, que apresentaram a maior deposição de colágeno. Quando se comparam os três grupos asmáticos entre si, controle, veículo e domperidona, não apresentaram diferenças estatísticas entre eles ($p>0,05$). Os resultados são ilustrados nas **Figuras 14 e 15**

Figura 14 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar. Carência do efeito da domperidona sobre o aumento da deposição de colágeno peribronquiolar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com Domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P<0,05$ ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 15 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Marcação para colágeno mediante a coloração de picosirius nos pulmões de ratos. (A) grupo *naive*. (B) grupo controle. (C) grupo veículo. (D) grupo domperidona. Marcação positiva para colágeno é cor roxa sinalizada com a seta.

Com relação à produção de muco, a ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test revelou ($p < 0,0001$, $F = 12,21$) que o grupo domperidona foi menor a produção de muco observada com relação ao grupo veículo. Entretanto, no grupo domperidona a produção de muco foi maior que no grupo *naive* ($p < 0,0001$). A produção de muco do grupo domperidona não difere estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$). Os grupos controle e veículo não diferem estatisticamente entre eles ($p > 0,05$). Já o grupo controle tem mais muco que o veículo, e o *naive* ($p < 0,0001$).

Os resultados são ilustrados nas **Figuras 16 e 17**.

Figura 16 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar. Domperidona inibe o aumento inducido pela ovoalbumina na deposição de muco peribronquiolar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Notas: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 17 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Marcação para muco mediante a tincção de PAS nos pulmões de ratos. (A) grupo *naive*. (B) grupo controle. (C) grupo veículo. (D) grupo domperidona. Marcação positiva para muco é color roxo no epitélio respiratório nas células caliciformes.

Para investigar as mudanças ocorridas no pulmão em relação à migração celular, foi avaliado o efeito da prolactina sobre a geração das citocinas IL4, IL-6, IL-10, TNF- α nos sobrenadantes dos explantes do pulmão em cultura e do INF γ nas suspensões celulares do lavado bronco alveolar em ratos alérgicos. As concentrações dessas citocinas foram medidas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão com 24 horas de cultura e corrigidos com relação ao peso do tecido pulmonar (mg). A ANOVA - Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que em relação as concentrações de IL-4 ($p=0,0290$, $F=1,578$), o grupo domperidona foi estatisticamente maior que o *naïve*. Em relação às IL-6 (ANOVA- Newman-Keuls multiple comparasion test; $p<0,0001$, $F=51,98$) e IL-10 (ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test; $p<0,0001$, $F=12,82$) medidos nos sobrenadantes dos explantes de pulmão de ratos do grupo domperidona foram estatisticamente maiores que naquelas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão dos grupos *naïve*, controle e veículo desafiados com OVA *in vitro*. Diferenças significantes foram encontradas no TNF- α ($p<0,05$, $K=6,882$). O Dunn's Multiple Comparison Test revelou que o grupo domperidona apresentou maior TNF- α que os grupos veículo e *naïve* sendo ($p=0,0129$). Quanto ao INF γ no BAL, houve diferença estatística na comparação geral dos grupos ($p<0,0001$, $K=29,41$). Segundo o Dunn's Multiple Comparison Test, o grupo domperidona exibiu maior concentração do INF γ no BAL quando comparado com o grupo veículo. Entretanto, a concentração de INF γ no BAL do grupo domperidona foi menor que aquela observada no grupo *naïve* ($p<0,0001$). Os resultados são ilustrados na **Figura 18**.

Figura 18 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre a geração de IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α nos sobrenadantes do pulmão em cultura e IFN γ no lavado broncoalveolar em ratos alérgicos. A domperidona aumenta a IL-4, IL-6, IL-10 nos sobrenadantes dos explantes do pulmão

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: Citocinas IL-4 (A), IL-6 (B), IL10 (C), TNF- α (D) foram medidas no sobrenadantes dos explantes de pulmão em cultura e IFN γ (E) foi medida no BAL. N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados, C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* As citocinas foram quantificadas 24 horas após o desafio com a OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE., IL-4: P<0,05 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). IL-6: P< 0,0001 (ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test). IL10: P< 0,0001 (ANOVA-Newman-Keuls multiple comparasion test). TNF α : p<0,05 (Kruskal-Wallis Test, seguido de Mann-Whitney Test). IFN γ : p<0,0001 (Kruskal-Wallis test, seguido de Dunn's Multiple Comparasion test).

Por serem os eosinófilos as células efetoras centrais na inflamação alérgica pulmonar e serem essas células as responsáveis pelo comportamento da inflamação nas vias aéreas, se procedeu a avaliar a correlação dos níveis plasmáticos da prolactina com o número de migração celular eosinofílica ao pulmão nos animais alérgicos. Observou-se os animais, com níveis altos de prolactina, apresentaram menor migração eosinofílica, revelando uma correlação negativa ($r = -0,4687$ com um intervalo de confiança de $-0,7393$ a $-0,06784$; $p = 0,0209$). Os resultados são ilustrados na **Figura 19**.

Figura 19 - Correlação entre níveis de prolactina e eosinófilos migrados ao pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* A migração foi calculada como descrito no protocolo experimental. Cada ponto representa as médias $\pm$ SE. Os níveis plasmáticos de prolactina foram feitos em duplicata por radioimunoensaio.

Com relação a neuroquímica plasmática a ANOVA revelou ($p < 0,0015$, $F = 7,103$). A seguir o Newman-Keuls Multiple Comparison Test, revelou que o grupo controle apresentou maior concentração plasmática de adrenalina em relação aos grupos, veículo, domperidona e *naïve*. A concentração plasmática de adrenalina do grupo veículo foi maior que a concentração plasmática dos grupos domperidona e *naïve*. A ANOVA revelou que o grupo domperidona, que é sabidamente hiperprolactinêmico, apresentou menor concentração de adrenalina plasmática não diferindo do grupo *naïve*.

A regulação neural das respostas imunes ocorre regionalmente por meio da ativação do sistema nervoso simpático e dos efeitos dos neurotransmissores, tais como noradrenalina e adrenalina, sobre as células imunes no baço e nodos linfáticos (STERNBERG, 2001). Em relação à noradrenalina, a ANOVA acusou diferença estatística ($p < 0,0004$, $F = 8,962$). A seguir, o Newman-Keuls multiple comparison test revelou que os grupos *naive* e controle apresentaram maior concentração plasmática que aquelas observadas nos grupos veículo e domperidona.

A **Figura 20** mostra os resultados da neuroquímica plasmática das dosagens da adrenalina e noradrenalina.

Figura 20 - Níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes das inalações com ovalbúmina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como mediana, amplitude inter-quartis e valores máximos e mínimos $P < 0,05$ (ANOVA, seguida e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

As catecolaminas interagem com esteroides da adrenal nos sistemas nervoso autônomo e central. Assim, foi investigada a possível correlação entre os níveis

plasmáticos da adrenalina e da corticosterona nos animais alérgicos e também do grupo *naïve*.

Observou-se nos animais do grupo controle tratados com ovoalbumina, que tiveram os maiores níveis de adrenalina e também apresentaram maiores concentrações de corticosterona. Nesse caso, o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,7715 (com um intervalo de confiança entre -0,3473 a 0,9840 e um valor de $p=0,1266$) revela uma correlação positiva forte. Assim, alergia pulmonar nos permitiu revelar uma alta intensidade de associação entre os níveis elevados de adrenalina e os de corticosterona plasmáticas.

Os animais do grupo domperidona possuem níveis menores de adrenalina e de corticosterona, sendo o valor calculado do coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,03224$ (intervalo de confiança de -0,6882 a 0,7206; $p= 0,9396$). Essa é considerada uma associação positiva fraca.

No grupo veículo o valor do coeficiente de correlação de Pearson é $r = -0,6609$ (intervalo de confiança de -0,9317 a 0,08214; $p=0,0744$). Essa correlação é negativa média. Concluindo, nestes animais do grupo veículo que apresentaram os níveis altos de adrenalina foram encontrados menores níveis de corticosterona sérica circulante. Os resultados são ilustrados na **Figura 21**.

Figura 21 - Correlação entre níveis de adrenalina e corticosterona ao pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* A migração foi calculada como descrito no protocolo experimental. Cada ponto representa as médias $\pm$ SE.

Com relação à imunohistoquímica para o receptor purínico P2X7R nos diferentes grupos experimentais, a ANOVA acusou diferenças ($p < 0,0003$, $F = 9,129$). A seguir, o Newman-Keuls multiple comparasion test revelou que os grupos que apresentaram maior expressão do receptor purínico foram os grupos controle e veículo, esses grupos foram estatisticamente diferentes dos grupos domperidona e *naive*.

A **Figura 22** mostra a Imunohistoquímica para a percentagem de expressão do receptor purínico.

Figura 22 - Imunohistoquímica receptor P2X7 em pulmão de ratos sensibilizados e desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; que dão os valores basais, C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0003$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Com relação ao diferencial da morfometria do pulmão, a ANOVA acusou a existência de diferenças nos eosinófilos ($p < 0,05$; $F = 4,342$), macrófagos ($p < 0,05$; $F = 5,010$) e linfócitos ($p < 0,05$; $F = 5,769$). A seguir, o Newman-Keuls multiple comparasion test revelou que o grupo que apresentou maior número de células presar no parênquima pulmonar, foi o grupo controle e foi estatisticamente diferente dos outros grupos, *naive*, veículo e domperidona.

A **Figura 23** ilustra os resultados anteriormente descritos.

Figura 23 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) sobre o diferencial morfométrico do pulmão de ratos

N=4, C=5, V=10, D=9

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; que dão os valores basais, C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média ± SE. P<0,0001 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Com relação à percentagem de granulócitos positivos para o receptor de prolactina no BAL, a ANOVA revelou a existência de diferença ($p=0,0079$; $F=8,244$). A seguir o Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que essa percentagem é mais alta no grupo controle com relação aos grupos veículo e domperidona. Em relação à intensidade média de fluorescência (MFI) para os receptores de prolactina nos granulócitos do grupo domperidona, a ANOVA acusou a existência de diferença estatística ($p=0,0005$; $F=19,63$). A seguir, o Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que no grupo domperidona houve mais receptores de prolactina em relação aos dois grupos asmáticos veículo e controle e também em relação ao grupo *naive* ($p=0,0005$). Isso sugere que o grupo domperidona apresenta maior expressão dos receptores para a prolactina nos granulócitos por célula. Os granulócitos,

embora tendo menor migração para o pulmão, expressam maior número de receptores por célula para a prolactina.

Com relação à percentagem de receptores para a prolactina nos linfócitos, a ANOVA acusou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0004$; $F=21,02$). A seguir, o Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que houve maior migração no grupo controle com relação aos outros grupos. Na intensidade média de fluorescência (MFI) para os receptores de prolactina para os linfócitos, não há diferenças estatísticas entre os quatro grupos avaliados ($p>0,05$).

Com relação à percentagem de macrófagos do BAL, a ANOVA acusou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0555$; $F=3,883$). A seguir o Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que o grupo controle apresenta maior migração de macrófagos que o grupo *naive*. Os três grupos asmáticos não foram estatisticamente diferentes entre si. Na MFI dos receptores expressos por macrófago para os grupos *naive*, controle, veículo e domperidona não há diferença estatística entre os quatro grupos avaliados ($p>0,05$). A **Figura 24** ilustra bem os resultados.

O CD3 é um marcador específico de superfície de los linfócitos T (CD4+ e CD8+). A ativação desregulada dos linfócitos TCD4+ é um marcador de doenças autoimunes e inflamatórias (NAKAYA et al., 2014). Com relação às percentagens dos polimorfonucleares (PMN) que são negativos para o receptor de CD3 e positivos para o receptor de prolactina dos grupos asmáticos, a ANOVA não acusou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). Com relação à percentagem dos polimorfonucleares (PMN) positivos tanto para o receptor de CD3 como para o receptor de prolactina, a ANOVA ($p>0,05$, $F=3,351$) não revelou diferenças estatísticas entre os quatro grupos. Com relação à percentagem dos polimorfonucleares (PMN) positivos para o receptor de CD3 e negativos para o receptor de prolactina, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). Em relação aos polimorfonucleares negativos tanto para os receptores para o CD3 e como para os de prolactina, a ANOVA não revelou diferenças estatísticas entre os quatro grupos avaliados ($p>0,05$; $F=1,804$).

Na medula óssea, quando se avalia a percentagem de blastos positivos para o receptor de prolactina entre os grupos, a ANOVA não revelou diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Na MFI dos blastos positivos para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre os grupos ($p=0,4383$, $F=1,007$).

Com relação aos granulócitos, para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre os grupos ($p=0,9266$; $F=0,1503$). Na MFI, quando são avaliados os granulócitos positivos para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,7099$; $F=0,4724$).

A comparação da percentagem dos linfócitos com receptor de prolactina do lavado medular femoral, a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,1744$; $F=2,132$). Consistentemente, em relação à MFI a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,61$).

Nas comparações feitas tanto da percentagem dos monócitos como na MFI, para as células positivas para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p>0,05$). Consistentemente, em relação à MFI dos monócitos para o receptor de prolactina a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,42$).

Em relação as percentagens das células negativas para o receptor de CD3 e positivas para o receptor de prolactina, a ANOVA não acusou a presença de diferença estatística entre grupos ($p=0,61$). Em relação à comparação das percentagens das células positivas tanto para o receptor de CD3 quanto para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,89$). Já em relação à comparação das percentagens das células positivas para o receptor de CD3 e negativas para o receptor de prolactina, a ANOVA não revelou diferença estatística entre grupos ($p=0,22$). A comparação do percentual de células negativa tanto para receptores de CD3 como para receptores de prolactina nas células do MFL não revelou diferenças (ANOVA; $p=0,3685$). A **Figura 25** ilustra bem os resultados.

Figura 24 - Citometria de fluxo para o receptor de prolactina e intensidade de fluorescência média da expressão do receptor de prolactina (MFI) nas diferentes populações de células no lavado bronco-alveolar em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.kg⁻¹) antes das OVA-inalações

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; A= asmáticos, ratos imunizados e desafiados com OVA, C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. P<0,05 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Figura 25 - Citometria de fluxo para o receptor de prolactina e intensidade de fluorescência média da expressão do receptor de prolactina (MFI) nas diferentes populações de células no lavado medular femoral em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.kg⁻¹) antes das OVA-inalações

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; A= asmáticos, ratos imunizados e desafiados com OVA, C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. P<0,05 (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test)

5.2 EXPERIMENTO 2: RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR EM RATAS LACTANTES

Confirmando dados anteriores que validam esse modelo no nosso e em outros laboratórios (OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al., 2011) a ANOVA seguida de do teste de Tukey ($p < 0,0001$, $F = 15,10$) revelou que o grupo V, equivalente ao asmático controle do experimento anterior, apresentou um maior número de células no lavado bronco-alveolar (BAL) quando comparado ao grupo N. Além disso o grupo L, que pode ser considerado similar ao grupo hiperprolactinêmico-domperidona do experimento anterior, apresentou um menor número de células no lavado bronco-alveolar (BAL) quando comparado ao grupo V, sem diferir do grupo N. A **Tabela 6** mostra os resultados.

Quanto à celularidade leucocitária total sanguínea, a ANOVA não revelou diferença estatística ($p > 0,05$). Também, pela ANOVA ($p > 0,05$) na contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos no sangue, não revelou diferenças estatísticas entre os grupos.

Com relação na contagem de células totais da medula óssea entre os três grupos avaliados, a anova de Kruskal-Wallis revelou que houve diferenças significantes ($p = 0,0071$, $K = 9,895$). A seguir, o Dunn's Multiple Comparison Test, acusou uma quantidade significativamente menor de células no lavado medular femoral (MFL) no grupo L quando comparado com o grupo V. A maior quantidade de células da medula óssea foi para o grupo de V comparado com os grupos *naïve* e lactantes.

Tabela 6 - Efeitos da lactação sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar (BAL), sangue circulante e lavado medular femoral (FML) durante a inflamação alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS		
	Naïve	Virgens	Lactantes
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	$14,40^a \pm 2,38$	$83,55 \pm 9,17$	$30,29^a \pm 4,70$
Sangue ($\times 10^4 \cdot \text{mm}^3$)	$20,80 \pm 3,89$	$24,13 \pm 2,43$	$23,54 \pm 4,98$
Linfócitos	$14,60 \pm 2,76$	$19,07 \pm 1,95$	$18,92 \pm 4,47$
Neutrófilos	$5,40 \pm 1,12$	$3,53 \pm 0,82$	$3,23 \pm 0,69$
Eosinófilos	$5,40 \pm 1,12$	$0,20 \pm 0,10$	$0,07 \pm 0,07$
Monócitos	$1,00 \pm 0,32$	$1,33 \pm 0,21$	$1,15 \pm 0,33$
BFL Número total de células ($\times 10^6$)	$9,00^a \pm 1,94$	$25,28^b \pm 4,35$	$10,24^a \pm 2,81$

Legenda:* ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test; $p < 0,0001$ Kruskal-Wallis test, and Dunn's Multiple Comparison Test *post hoc*

As **Figuras 26, 27, 28, 29** contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 26 - Efeitos da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes no fluido do lavado broncoalveolar (BAL)

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naïve*, ratas virgens sem ser imunizadas e desafiadas com OVA, V= virgens, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= lactantes, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$ (ANOVA e Tukey's).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Figura 27 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes no sangue

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

Legenda: N=*naive*, ratas não imunizadas e não desafiadas com OVA, V= virgens, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= lactantes, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ ANOVA-Neuman-Keuls.

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas depois do último desafio inalatório com OVA

Figura 28 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do recuento diferencial de células no sangue

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N=*naive*, ratas não imunizadas e não desafiadas com OVA, V= virgens, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= lactantes, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ (ANOVA e Neuman-Keuls).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas depois do último desafio inalatório com OVA

Figura 29 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número total de células presentes na medula óssea

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N=*naive*, ratas não imunizadas e não desafiadas com OVA, V= *virgens*, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= *lactantes*, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. P=0,0071 (Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA

Com relação à contagem diferencial de células no BAL para os macrófagos, a anova de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa ($p=0,0404$, $F=6,417$). A seguir, o teste de Dunn mostrou que o grupo que apresentou migração de macrófagos ao pulmão significativamente maior, foi o grupo V, sendo estatisticamente diferente do N. A anova de Kruskal-Wallis não acusou diferenças significantes linfócitos ($p>0,05$) e neutrófilos ($p>0,05$) entre os grupos. Com referência à migração dos eosinófilos ao pulmão, a ANOVA revelou diferença estatística ($p=0,0010$, $F= 8,184$). A seguir, o teste de Neuman-Keuls revelou que houve uma diminuição significativa no grupo L em relação ao grupo V (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do reconto diferencial no BAL, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos

Parâmetro	GRUPOS		
	Naive	Virgens	Lactantes
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	14,40 ^a $\pm$ 2,38	83,55 ^b $\pm$ 9,17	30,29 ^{ab} $\pm$ 4,70
Macrófagos	5,00 ^a $\pm$ 1,09	27,08 ^b $\pm$ 4,48	18,59 ^{ab} $\pm$ 4,28
Linfócitos	5,00 $\pm$ 0,89	22,68 $\pm$ 5,08	13,53 $\pm$ 4,52
Neutrófilos	4,00 $\pm$ 0,70	5,60 $\pm$ 2,30	7,11 $\pm$ 3,00
Eosinófilos	0,20 ^a $\pm$ 0,20	19,80 ^b $\pm$ 3,84	3,58 ^a $\pm$ 1,12

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: * $P < 0,0001$. ANOVA-Neuman-Keuls e Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test. $p < 0,0001$ (BAL); $p = 0,0404$ (macrófagos); $p = 0,0010$ (eosinófilos)

Notas: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA. São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N=5; V=25; L=17).

A **Figura 30** contribui para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 30 - Efeito da lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar induzida pela ovoalbumina sobre o número do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos

N=5; V=25; L=17

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratas não imunizadas e não desafiadas com OVA, V= *virgens*, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= *lactantes*, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$ (ANOVA-Neuman-Keuls, Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA.

Em relação ao peso absoluto das glândulas adrenais, a ANOVA não acusou diferença estatística ($p>0,05$). A **Tabela 8** mostra esses resultados.

Tabela 8 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais, naive, virgens e lactantes antes das OVA-inalações

Parâmetro	GRUPOS		
	Naive	Virgens	Lactantes
Peso glândulas adrenais (mg)	77,66 $\pm$ 5,48	71,11 $\pm$ 4,50	68,83 $\pm$ 4,15

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

Legenda: $P > 0,05$. ANOVA.

Nota: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N=5; V=25; L=17).

A **Figura 31** contribui para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 31 - Peso absoluto (mg) das glândulas adrenais em ratas naive, alérgicas virgens e lactantes após o desafio inalatório com a OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratas não imunizadas e não desafiadas com OVA, V= virgens, ratas imunizadas e desafiadas com OVA, L= lactantes, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ (ANOVA).

A seguir, foram quantificadas as citocinas TNF- α e IFN- γ em lavados bronco-alveolares. Não foram reveladas diferenças significantes para o TNF α entre os diferentes grupos avaliados ($p > 0,05$, $K = 3,295$). Quanto ao IFN γ presente no BAL, a ANOVA acusou diferença estatística ($p < 0,05$; $F = 4,118$). A seguir, o teste de Neuman-Keuls revelou que o grupo L apresentou maior quantidade de IFN γ no BAL, que o grupo N. Os resultados são ilustrados na **Figura 32**.

Figura 32 - Quantificação de citocinas TNF- α e IFN γ presente no lavado bronco-alveolar (BAL), geradas após o desafio inalatório com ovoalbumina (OVA) em ratas naive e alérgicas virgens e lactantes

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: Citocinas TNF- α (A) no BAL, e IFN- γ (B) liberado no BAL. N= *naive*, ratas não imunizadas nem desafiadas com OVA, V= ratas virgens imunizadas e desafiadas com OVA, L= ratas lactantes sensibilizadas e desafiadas com OVA. As citocinas foram quantificadas no BAL 24 horas após o desafio com a OVA. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. TNF α : $P > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Dunn's) e IFN γ : $p < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Com relação aos níveis plasmáticos de corticosterona (**Tabela 9**), a prova de Kruskal-Wallis seguida da prova de "U" de Mann-Whitney não revelou diferença entre os grupos N e V, tampouco entre os grupos N e L. Entretanto, nos animais lactantes os níveis de corticosterona mostraram-se estatisticamente mais baixos que nas ratas V ($p = 0,0096$; $U = 111$). Os níveis plasmáticos de corticosterona das ratas são representados na **Figura 33**.

Tabela 9 - Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) de ratas naïve e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS ¹		
	Naïve	Virgens	Lactantes
N	5	25	17
Média	780,9 ^{ab}	993,9 ^b	713,5 ^a
Erro padrão	139,9	77,13	55,31

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015)

Legenda: ¹ a,b,c,d Dentro de cada linha, médias cujos sobrescritos não possuem nenhuma letra em comum, são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), Kruskal-Wallis, seguida da prova de "U" de Mann-Whitney.

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 33 - Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) de ratas naïve e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= naïve, ratas não sensibilizados, desafiados ou tratados; V= virgens, ratas imunizadas e desafiadas com OVA. L= lactantes, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA, com 5 dias de lactação. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como mediana, amplitude inter-quartis e valores máximos e mínimos $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguida da prova de "U" de Mann-Whitney Test).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Com relação à neuroquímica plasmática, não houve diferença estatística entre os grupos no que se refere às concentrações de adrenalina. Com relação à produção de noradrenalina, a ANOVA acusou diferença ($p = 0,0026$; $F = 7,005$). A seguir, o teste de Neuman-Keuls revelou que o grupo L apresentou maior concentração de noradrenalina plasmática com relação aos grupos N e V ($P < 0,01$).

A **Figura 34** mostra os resultados da neuroquímica plasmática das dosagens da adrenalina e noradrenalina

Figura 34 - Níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina (ng/ml) de ratas naïve e alérgicas virgens e lactantes, sobre a resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naïve*, ratas não sensibilizados, desafiados ou tratados; V= *virgens*, ratas imunizadas e desafiadas com OVA. L= *lactantes*, ratas sensibilizadas e desafiadas com OVA, com 5 dias de lactação. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. Adrenalina: $P > 0,05$; Noradrenalina: $p < 0,005$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

5.3 EXPERIMENTO 3: ESTUDO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO, ANTES DA SENSIBILIZAÇÃO, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA.

A **Tabela 10** mostra resultados expressos em médias e erros padrões das medidas das células do BAL dos grupos. A ANOVA revelou diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$; $F = 8,192$). A análise *post hoc* Newman-Keuls Multiple Comparison Test mostrou que o grupo controle apresentou um maior número de células no BAL quando comparado com os grupos *naïve* ($p = 0,0006$), veículo ($p < 0,05$) e domperidona ($p = 0,0006$). O grupo veículo e o grupo controle são estatisticamente diferentes no BAL ($p = 0,0006$), mas não apresentaram diferença estatística no FML ($p > 0,05$). A quantidade de células totais do BAL não foi estatisticamente diferente para o grupo veículo em relação aos grupos domperidona e *naïve* ($p > 0,05$). Ambos

os tratamentos com veículo ($p=0,0006$) e domperidona ($p=0,0006$) diminuíram o BAL em relação ao grupo controle ($p=0,0006$).

Em relação à celularidade leucocitária total do sangue, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os grupos ($p<0,05$; $F=3,060$). Entretanto, o grupo controle apresentou o maior número de células circulantes com relação aos outros três grupos ($p<0,05$). Quando comparada a celularidade leucocitária total do sangue entre os grupos *naive*, veículo e domperidona não foram observadas diferenças estatísticas.

Em relação à contagem diferencial de células no sangue, a ANOVA ($p<0,05$) revelou diferenças significantes. A seguir, o teste de Newman-Keuls revelou que as contagens dos neutrófilos e linfócitos do grupo controle foram maiores que as dos grupos *naive*, veículo e domperidona. Quanto aos monócitos, a anova de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn's ($p=0,0241$; $K=9,426$) revelou que o grupo *naive* se mostrava estatisticamente menor em relação aos grupos controle, veículo e domperidona ($p=0,0013$). Já, em relação aos eosinófilos sanguíneos circulantes, não houve diferença entre os quatro grupos ($p>0,05$).

Em relação ao BFL, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os grupos ($p=0,0005$; $F= 8,792$). A seguir, o Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou que os grupos controle, veículo e domperidona foram menores que o grupo *naive* ($p=0,0005$).

Tabela 10 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária

Parâmetro	GRUPOS			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	14,00 ^{ac} $\pm$ 3,68	65,20 ^b $\pm$ 17,52	29,40 ^c $\pm$ 5,69	13,78 ^{dc} $\pm$ 2,83
Sangue ($\times 10^4 \cdot \text{mm}^3$)	50,80 ^a $\pm$ 7,80	150,4 ^b $\pm$ 55,65	63,30 ^a $\pm$ 10,50	63,30 ^a $\pm$ 16,13
Linfócitos	44,62 ^a $\pm$ 6,29	80,58 ^b $\pm$ 19,56	49,38 ^a $\pm$ 8,26	49,41 ^a $\pm$ 13,10
Neutrófilos	7,46 ^a $\pm$ 1,44	22,66 ^b $\pm$ 7,219	9,480 ^a $\pm$ 2,328	7,97 ^a $\pm$ 1,69
Eosinófilos	0,36 $\pm$ 0,24	0,0 $\pm$ 0,0	0,10 $\pm$ 0,10	0,0 $\pm$ 0,0
Monócitos	0,99 ^a $\pm$ 0,20 ^a	4,81 $\pm$ 1,931 ^b	4,44 ^b $\pm$ 0,90	5,91 ^b $\pm$ 2,03
BFL Número total de células ($\times 10^6$)	152,2 ^a $\pm$ 24,63	146,1 ^a $\pm$ 17,13	69,63 ^b $\pm$ 9,84	52,63 ^b $\pm$ 9,90

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: DOMP = Domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00) durante cinco dias. Letras diferentes em cima indicam diferenças estatísticas.

^b $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Monócitos: Kruskal-Wallis test- Dunn's Multiple Comparison Test

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=5, V=10, D=10).

As **Figuras 35, 36, 37, 38** contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 35 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o numero total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL)

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 ($1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). D= Domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão. A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA

Figura 36 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número total de células presentes no sangue

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA; V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA. São apresentadas médias $\pm$ erro padrão.

Figura 37 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; A= asmáticos, ratos sensibilizados e desafiados com OVA; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). Monócitos: Kruskal-Wallis test- Dunn's Multiple Comparison Test.

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA. São apresentadas médias $\pm$ erro padrão.

Figura 38 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona antes da OVA-imunização sobre o número total de células presentes na medula óssea

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média ± SE. P<0,0005 (ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA. São apresentadas médias ± erro padrão.

Em relação diferencial de células no BAL, a ANOVA revelou diferenças significantes ($p=0,0182$; $F=4,030$). A seguir, o teste de Newman-Keuls a contagem dos macrófagos do grupo controle apresentou diferenças estatísticas com relação ao grupo *naive* sendo a maior migração dos macrófagos do grupo controle; igualmente o controle é estatisticamente maior que domperidona ($p=0,0182$). O grupo veículo e o controle não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$). Com relação aos linfócitos, a prova de Kruskal-Wallis seguida pelo Dunn's Multiple Comparison Test ($p=0,0088$; $K=11,61$) revelou a maior migração ao pulmão é do grupo controle comparado com o *naive* ($p=0,0088$), mas o controle não atinge diferenças estatísticas com relação ao grupo veículo ($p>0,05$). O grupo *naive*, quando comparado com domperidona, não atinge diferença estatística ($p>0,05$). Com referência à migração dos eosinófilos ao pulmão, a ANOVA revelou ($p<0,0001$;

F=8,184). A seguir, o Newman-Keuls Multiple Comparison Test mostrou que há diferença significativa entre o grupo controle e os grupos *naive*, veículo e domperidona (**Tabela 11 e Figura 39**).

Tabela 11 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos

Parâmetro	GRUPOS			
	<i>Naive</i>	Controle	Veículo	DOMP
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	$14,00^{ac} \pm 3,68$	$65,20^b \pm 17,52$	$29,40^c \pm 5,69$	$13,78^{dc} \pm 2,83$
Macrófagos	$2,02^a \pm 0,91$	$8,708^b \pm 3,262$	$4,77^{ab} \pm 1,24$	$1,61^a \pm 0,52$
Linfócitos	$3,64^a \pm 0,98$	$13,93^b \pm 5,99$	$9,06^b \pm 1,36$	$4,42^a \pm 0,70$
Neutrófilos	$8,38^a \pm 2,49$	$15,13^a \pm 5,58$	$10,89^a \pm 4,69$	$5,07^a \pm 2,18$
Eosinófilos	$0,0^a \pm 0,0$	$27,43^b \pm 5,49$	$5,93^a \pm 1,56$	$2,68^a \pm 0,60$

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: DOMP = Domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00 horas) durante cinco dias.

Letras diferentes em cima indicam diferenças estatísticas.

$p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Linfócitos: $p < 0,0001$ Kruskal-Wallis test-Dunn's Multiple Comparison Test.

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA. São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=5, V=10, D=9).

Figura 39 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina antes da sensibilização sobre a celularidade leucocitária do reconto diferencial do Lavado bronco-alveolar (BAL), de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 ($1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ macrófago e eosinófilo $p < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison). Linfócito: $p < 0,0001$ (Kruskal-Wallis test-Dunn's Multiple Comparison Test).

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão. A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio das inalações com OVA.

A **Tabela 12** mostra que comparados os pesos absolutos das glândulas adrenais dos grupos *naive*, controle, veículo e domperidona. Não houve diferença estatística (ANOVA; $p>0,05$; $F=2,612$). Em relação ao peso glândula / peso corporal (mg.g^{-1}) a ANOVA não revelou diferenças estatísticas entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 12 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina antes da ova-imunização

Parâmetro	GRUPOS			
	<i>Naive</i>	Controle	Veículo	DOMP
Peso glândulas adrenais (mg)	$132,0 \pm 13,93$	$122,2 \pm 8,55$	$106,8 \pm 8,58$	$92,10 \pm 10,18$
Relação peso glândula/peso corporal (mg.g^{-1})	$0,34 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: DOMP = domperidona ($1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00 horas) durante cinco dias.

$p>0,05$ ANOVA.

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=5, V=10, D=10)

As **Figuras 40 e 41**, contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 40 - Peso absoluto das glândulas adrenais (mg) em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg^{-1}) antes da OVA-imunização

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ (ANOVA).

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão.

Figura 41 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg-1) antes da OVA-imunização

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média ± SE. P>0,05 (ANOVA).

Notas: São apresentadas médias ± erro padrão.

Com relação aos níveis plasmáticos de corticosterona, a prova de Kruskal Wallis acusou a presença de diferença estatística ($p=0,0036$; $K=9,244$) revelaram que foram estatisticamente diferentes o grupo *naive* e os outros três grupos (OVA sensibilizados e desafiados tratados com domperidona e/ou solução salina antes da sensibilização) (**Tabela 13**). Os níveis plasmáticos de corticosterona dos ratos são representados na **Figura 42**.

Tabela 13 - Níveis plasmáticos de corticosterona (pg/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP ²
n	5	5	10	10
Média	5991 ^a	2836 ^b	2634 ^b	2459 ^b
Erro padrão	1591	557,2	242,2	337,2

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

¹ Houve diferenças significantes entre os grupos experimentais e seus controles correspondentes ($p < 0,05$), Kruskal-Wallis seguida de U de Mann-Whitney

² DOMP=domperidona ($1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 07h30; 15h00; 22h00 horas).

Notas: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 42 - Níveis plasmáticos de corticosterona (pg/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como medianas, intervalos inter-quartis e valores máximos e mínimos $P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguida de U Mann-Whitney.

Com relação à comparação dos níveis plasmáticos de prolactina, a ANOVA não revelou diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$; $F = 0,3079$; **Tabela 14** com dados ilustrados na **Figura 43**).

Tabela 14 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da ova-imunização, sobre a resposta alérgica pulmonar

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP ¹
n	5	5	10	10
Média	45,87	62,50	51,44	56,72
Erro padrão	8,995	20,32	6,48	10,40

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

($p > 0,05$; ANOVA)

¹ **DOMP**= domperidona ($1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06h:30; 14h:00; 21h:00).

Notas: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 43 - Níveis plasmáticos de prolactina (ng/ml) de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona antes da sensibilização com ovoalbumina, sobre a resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controles, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como mediana, intervalos interquartis, e valores máximos e mínimos $P > 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison).

Com relação à quantidade de colágeno, a ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p < 0,0001$; $F = 11,39$) revelou que, no grupo domperidona a produção de colágeno foi estatisticamente menor que a observada no grupo controle e maior que no grupo *naive* ($p < 0,0001$). Os resultados são ilustrados nas **Figuras 44 e 45**.

Figura 44 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison).

Figura 45 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de colágeno na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Marcação para colágeno mediante a coloração de picrosirius nos pulmões de ratos. (A) grupo *naive*. (B) grupo controle. (C) grupo veículo. (D) grupo domperidona. Marcação positiva para colágeno é de cor roxa.

Com relação à produção de muco, a ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p < 0,0001$; $F = 11,39$) revelou os grupos controle, veículo e domperidona apresentam estatisticamente mais muco que o grupo *naïve* ($p < 0,0001$). Os grupos domperidona e veículo não diferem estatisticamente entre si, embora ambos apresentem menos muco que o grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados são ilustrados nas **Figuras 46 e 47**.

Figura 46 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes do desafio inalatório com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de moco na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naïve*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison).

Figura 47 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre a percentagem de muco na resposta alérgica pulmonar

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Marcação para muco mediante a tincção de PAS nos pulmões de ratos. (A) grupo *naive*. (B) grupo controle. (C) grupo veículo. (D) grupo domperidona. Marcação positiva para muco é de cor roxa no epitélio respiratório nas células caliciformes.

Para investigar se as mudanças ocorridas no pulmão sobre a migração celular foram relacionadas ao efeito do tratamento sobre a geração das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF α e IFN γ em ratos alérgicos, as concentrações dessas citocinas foram medidas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão com 24 horas de cultura e corrigidos com relação ao peso do tecido pulmonar. A ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p=0,0101$; $F=4,661$) revelou que a concentração de IL-4 foi estatisticamente maior no grupo domperidona com relação aos grupos *naive* e veículo. O grupo controle não apresentou diferenças estatísticas com relação aos outros grupos.

Com relação às citocinas IL-6 e IL-10, a ANOVA seguida de Newman-Keuls Multiple Comparison Test mostrou que, tanto para a IL-6 ($p<0,0001$; $F=131,2$) como para a IL-10 ($p=0,0013$; $F= 6,984$) medidas nos sobrenadantes os três grupos asmáticos tiveram maiores concentrações que aquelas observadas no grupo *naive*. Com relação ao TNF α , a ANOVA não acusou a presença de diferença estatística ($p>0,05$; $F= 2,077$). A comparação das concentrações de IFN γ nas culturas dos

explantes de pulmão, também não revelou diferenças (ANOVA, $p>0,05$; $F=1,835$). Os resultados são ilustrados na **Figura 48**.

Figura 48 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da imunização (OVA) sobre a geração de IL-4, IL-6, IL-10 TNF α e IFN γ em ratos alérgicos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: Citocinas IL-4 (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF- α (D) e IFN γ (E) liberadas pelos explantes de pulmão em cultura. N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; que dão os valores basais, C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* As citocinas foram quantificadas 24 horas após o desafio com a OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$, $P < 0,05$, (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Por serem os eosinófilos as células efetoras centrais na inflamação alérgica pulmonar e responsáveis pelo comportamento da inflamação nas vias aéreas, foi avaliada a correlação dos níveis plasmáticos da prolactina com o número de eosinófilos no pulmão nos animais alérgicos. O número de eosinófilos reflete a quimiotaxia e migração celular eosinofílica ao pulmão nos animais alérgicos somente. Observou-se nos animais do grupo controle, o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r) $r=0,9253$ com um intervalo de confiança de 0,2339 a 0,9952 e um valor de $p=0,0242$. Isso nos permite inferir que houve uma intensidade da associação forte neste grupo controle existente entre o número de eosinófilos migrados ao pulmão e a concentração plasmática de prolactina, revelando uma correlação positiva. Com relação ao grupo veículo e o domperidona os valores de r , são respectivamente $r=0,1779$ para o grupo veículo, $r=0,3248$, para o grupo domperidona, indicando uma correlação fraca, entre o número de eosinófilos migrados ao pulmão e a concentração plasmática de prolactina. Os resultados são ilustrados na **Figura 49**.

Figura 49 - Correlação entre níveis de prolactina e número de eosinófilos no pulmão em ratos sensibilizados e desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015).

Legenda: C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* A migração foi calculada como descrito no protocolo experimental. Os níveis plasmáticos de prolactina foram feitos em duplicata por radioimunoensaio.

Com relação a neuroquímica plasmática, não houve diferenças significantes na comparação entre os grupos, tanto em relação a adrenalina (ANOVA $p>0,05$; $F=0,1115$), como em relação a noradrenalina ($p>0,05$; $F=1,578$). A **Figura 50** ilustra os resultados.

Figura 50 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo antes da sensibilização com ovo albumina (OVA) sobre os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina de ratos desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P > 0,05$ (ANOVA).

5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA HIPERPROLACTINEMIA DE CURTA DURAÇÃO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA PELA OVOALBUMINA APÓS ESTABELECID A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR NO RATO.

A **Tabela 15** mostra os resultados, expressos em médias e erros padrões das medidas das células do BAL dos grupos. A ANOVA, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p>0,05$; $F=1,335$). Quando

comparada a celularidade leucocitária total sanguínea, a ANOVA não revelou diferenças estatísticas ($p>0,05$; $F= 3,837$).

Com relação à contagem diferencial sanguínea, na contagem dos linfócitos a ANOVA seguida de Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p=0,0239$; $F= 3,718$) revelou que, quando comparados os grupos *naive* e domperidona, estes apresentaram maior quantidade de linfócitos circulantes que os grupos controle e veículo. A ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p=0,0003$; $F= 9,039$) revelou que, no grupo *naive*, houve maior número de neutrófilos em relação aos grupos controle, veículo e domperidona. A ANOVA com relação aos monócitos ($p>0,05$; $F= 1,365$) e eosinófilos ($p>0,05$; $F= 3,613$) não revelou diferenças estatísticas entre os quatro grupos avaliados.

Com relação à contagem de células totais da medula óssea, a ANOVA revelou diferença ($p=0,0007$; $F= 7,748$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que os grupos controle, veículo e domperidona foram significativamente menores que o grupo *naive* ($p<0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos asmáticos ($p>0,05$).

Tabela 15 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária

Parâmetro	GRUPOS			
	<i>Naive</i>	Controle	Veículo	DOMP
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	$14,00 \pm 3,688$	$12,60 \pm 4,79$	$21,40 \pm 3,42$	$20,10 \pm 2,80$
Sangue ($\times 10^4 \cdot \text{mm}^3$)	$50,80 \pm 7,80$	$31,60 \pm 6,38$	$32,00 \pm 2,91$	$41,82 \pm 2,713$
Linfócitos	$44,62^a \pm 7,713$	$26,17^b \pm 5,28$	$27,65^b \pm 2,45$	$34,42^a \pm 2,41$
Neutrófilos	$7,45^a \pm 1,44$	$3,04^b \pm 0,76$	$1,91^b \pm 0,31$	$4,22^b \pm 0,66$
Eosinófilos	$0,36 \pm 0,24$	$0,0 \pm 0,0$	$0,03 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,20$
Monócitos	$0,99 \pm 0,24$	$2,28 \pm 0,57$	$2,72 \pm 0,49$	$2,49 \pm 0,65$
BFL Número total de células ($\times 10^6$)	$152,2^a \pm 24,63$	$36,40^b \pm 5,24$	$47,30^b \pm 11,35$	$64,91^b \pm 15,89$

Legenda: DOMP = domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06:30; 14:00; 21:00 horas) durante cinco dias.

* $p<0,05$ ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=10, V=10; D=10).

As **Figuras 51, 52, 53, 54** contribuem para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 51 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre o número total de células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL)

N=5; C=5; V=10; D=10

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda. N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ (ANOVA).

Notas: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Figura 52 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre o número total de células presentes no sangue

N=5; C=10; V=10; D=11

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P>0,05$ (ANOVA).

Notas: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Figura 53 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar sobre o número do reconto diferencial no sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Notas: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Figura 54 - Efeitos de cinco dias de tratamento com domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar sobre o número total de células presentes na medula óssea

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; A= asmáticos, ratos imunizados e desafiados com OVA, C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,05$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Nota: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Com relação à contagem diferencial de células no BAL, a ANOVA ($p>0,05$; $F=1,567$) não revelou diferenças estatísticas na contagem dos macrófagos, comparando os quatro grupos entre si. Da mesma forma, com relação aos linfócitos não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos avaliados ($p>0,05$; $F=0,5967$). Com referência à migração dos neutrófilos ($p>0,05$; $F=1,499$) e eosinófilos ($p>0,05$; $F=1,858$), a ANOVA não revelou diferença significativa entre os grupos. A **Tabela 16 e Figura 55** ilustram melhor os resultados.

Tabela 16 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar

Parâmetro	GRUPOS			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP
BAL Número total de células ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	$14,00 \pm 3,68$	$12,60 \pm 4,79$	$21,40 \pm 3,42$	$20,10 \pm 2,80$
Macrófagos	$2,02 \pm 0,91$	$1,39 \pm 0,38$	$3,27 \pm 1,06$	$5,23 \pm 1,54$
Linfócitos	$3,64 \pm 0,98$	$7,03 \pm 3,65$	$7,30 \pm 1,50$	$5,70 \pm 1,57$
Neutrófilos	$8,38 \pm 2,49$	$2,20 \pm 0,86$	$8,70 \pm 2,03$	$7,96 \pm 2,02$
Eosinófilos	$0,0 \pm 0,0$	$1,98 \pm 0,55$	$2,14 \pm 0,68$	$1,32 \pm 0,54$

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015).

Legenda: DOMP = domperidona ($1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, s.c., três vezes por dia: 06:30; 14:00; 21:00 horas) durante cinco dias.

* $p>0,05$ ANOVA.

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão, (N= 5, C=5, C=10; D=11).

A **Figura 55** contribui para uma melhor apreciação destes resultados.

Figura 55 - Efeitos de 5 dias de tratamento com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a celularidade leucocitária no lavado broncoalveolar

N=5, C=5, V=10, D=11

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J.E., 2015).

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média ± SE. P>0,05 (ANOVA).

Notas: A contagem celular foi feita 24 horas após o desafio da inalação com OVA.

Com relação à comparação dos pesos absolutos das glândulas adrenais entre os diferentes grupos *naive*, controle, veículo e domperidona, a ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou ($p < 0,0001$; $F = 17,22$) que o grupo *naive* teve maior peso das glândulas adrenais, apresentando diferenças estatísticas entre ele e os grupos controle, veículo e domperidona. Na Relação peso glândula / peso corporal (mg.g⁻¹), a ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test revelou ($p < 0,0001$; $F = 13,87$) que os grupos *naive* e controle apresentaram maior peso relativo quando foram comparados com os grupos veículo e domperidona. A **Tabela 17** mostra os resultados.

Tabela 17 - Pesos (mg) absolutos das glândulas adrenais e relação com o peso corporal (g), em ratos tratados com domperidona ou salina após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Parâmetro	GRUPOS			
	Naïve	Controle	Veículo	DOMP
Peso glândulas adrenais (mg)	146,0 ^a ± 23,58	57,20 ^b ± 8,72	54,60 ^b ± 4,18	51,64 ^b ± 6,36
Relação peso glândula / peso corporal (mg.g ⁻¹)	0,34 ^a ± 0,03	0,36 ^{ab} ± 0,07	0,15 ^{cd} ± 0,01	0,14 ^d ± 0,01

Legenda: DOMP = Domperidona (1,7 mg.kg⁻¹, *i.p.*, três vezes por dia: 06:30; 14:00; 21:00 horas) durante cinco dias.

^{a,b,c,d} $p < 0,0001$ ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Notas: São apresentadas médias ± erro padrão, (N= 5, C=5, V =10; D =11).

Figura 56 - Peso absoluto das glândulas adrenais (mg) em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica tween 80 (1 ml.Kg⁻¹) após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Fonte: (Ochoa-Amaya, J. E., 2015)

Legenda: N= *naïve*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média ± SE. $P < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison).

Notas: São apresentadas médias ± erro padrão.

Figura 57 - Peso das glândulas adrenais (mg/g) relativo ao peso corporal em ratos tratados por 5 dias com domperidona ou solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.Kg^{-1}) após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Fonte: (Ochoa-Amaya, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h:30; 14h:00 e 21h:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison).

Notas: São apresentadas médias $\pm$ erro padrão.

Com relação aos níveis plasmáticos de corticosterona, a prova de Kruskal não indicou diferença ($p = 0,1974$; $K = 4,673$). Os níveis plasmáticos de corticosterona dos ratos são mostrados na **Tabela 18** e representados na **Figura 58**.

Tabela 18 - Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	<i>Naive</i>	Controle	Veículo	DOMP ²
N	5	5	9	11
Média	5991	2604	3710	3724
Erro padrão	1591	516,4	619,2	300,0

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: ¹ Não houve diferenças significantes entre os grupos experimentais e seus controles correspondentes ($p > 0,05$), prova Kruskal-Wallis.

² DOMP=Domperidona ($1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, *i.p.*, três vezes por dia: 06:30; 15:00; 22:00 horas).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 58 - Efeitos do tratamento de domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato, sobre os níveis plasmáticos de corticosterona

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como medianas, intervalos inter-quartis e valores máximos e mínimos $p > 0,05$, Kruskal-Wallis.

Com relação aos níveis plasmáticos de prolactina, a prova de Kruskal Wallis acusou a existência de diferença ($p < 0,0001$; $K = 20,90$). A seguir, o Dunn's Multiple Comparison Test, revelou que o grupo domperidona tem os maiores níveis de prolactina que os grupos *naive*, controle e veículo. Os resultados mostram que as concentrações plasmáticas desse hormônio, nos animais tratados com domperidona, são aproximadamente cinco vezes maiores que nos animais tratados com o veículo.

Os níveis plasmáticos de prolactina são apresentados na **Tabela 19** (5 dias) e ilustrados na **Figura 59**.

Tabela 19 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato

Parâmetro	GRUPOS ¹			
	Naive	Controle	Veículo	DOMP ²
n	5	5	9	10
Média	45,87 ^a	38,89 ^a	63,52 ^a	315,0 ^b
Erro padrão	8,995	11,55	7,168	79,22

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: ¹ a,b Dentro de cada linha, médias cujos sobrescritos não possuem nenhuma letra em comum, são estatisticamente diferentes ($p < 0.001$) $p = 0,0008$, Kruskal-Wallis test seguida de Dunn's Multiple Comparison Test.

² DOMP=Domperidona (1,7 mg.kg⁻¹, s.c., três vezes por dia: 06:30; 14:00; 21:00 horas).

Nota: São apresentadas as médias $\pm$ erro padrão.

Figura 59 - Níveis plasmáticos de prolactina de ratos com cinco dias de hiperprolactinemia induzida por domperidona após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato.

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como mediana, intervalos interquartis, e valores máximos e mínimos $p < 0,0001$ (Kruskal Wallis seguida do Dunn's Multiple Comparison Test).

Para investigar o efeito do tratamento a geração das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e IFN γ nos sobrenadantes dos explantes de pulmão em cultura em ratos alérgicos, as concentrações dessas citocinas foram medidas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão com 24 horas de cultura e corrigidos com relação ao peso do tecido pulmonar (mg).

A ANOVA acusou diferenças para IL-6 ($p < 0,0001$; $F = 130,3$) e IL-10 ($p = 0,0013$; $F = 6,984$). A seguir, o teste de Newman-Keuls revelou que os ratos dos grupos controle, veículo e domperidona, têm níveis estatisticamente maiores dessas citocinas que aqueles observados nos sobrenadantes dos explantes de pulmão dos grupos *naïve*. Com relação ao TNF- α nas culturas dos explantes de pulmão durante 24 horas, a prova de Kruskal-Wallis seguida do teste Dunn's Multiple Comparison Test ($p = 0,0027$; $K = 14,15$) revelou que o grupo *naïve* e domperidona apresentaram menor concentração do TNF α com relação aos grupos controle e veículo. A prova de Kruskal-Wallis seguida do teste Dunn's Multiple Comparison Test ($p = 0,0023$; $K = 14,47$) demonstrou que os grupos controle e domperidona apresentaram maior concentração do IFNg que os grupos *naïve* e veículo. Os resultados são ilustrados na **Figura 60**.

Figura 60 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre a geração de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN γ em ratos alérgicos

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: Citocinas IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C), e IFN γ (D) liberadas pelos explantes de pulmão em cultura. N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; que dão os valores basais, C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg⁻¹). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona (5,1 mg.kg⁻¹ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06h30; 14h00 e 21h00 horas, via *i.p.* As citocinas foram quantificadas 24 horas após o desafio com a OVA. Letras diferentes em cima das colunas indicam diferenças estatísticas. Os dados são expressos como média $\pm$ SE. $P < 0,0001$, $P < 0,05$, (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test, Kruskal Wallis-Dunn's Multiple Comparison Test).

Com relação à concentração de adrenalina plasmática, a ANOVA seguida do Newman-Keuls Multiple Comparison Test ($p<0,05$; $F= 2,917$) revelou que a maior concentração foi a do grupo controle em relação aos outros três grupos. A ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls Multiple Comparison ($p<0,05$; $F= 4,203$) revelou que a concentração de noradrenalina do grupo *naive*, é estatisticamente maior que a do grupo domperidona. A **Figura 61** ilustra os resultados.

Figura 61 - Efeitos do tratamento de hiperprolactinemia (5 dias) induzida pela domperidona e/ou veículo após de estabelecida a inflamação alérgica pulmonar no rato sobre os níveis de adrenalina e noradrenalina de ratos desafiados com OVA

Fonte: (OCHOA-AMAYA, J. E., 2015)

Legenda: N= *naive*, ratos não sensibilizados, desafiados ou tratados; C= controle, ratos imunizados e desafiados com OVA, V= veículo, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com solução salina fisiológica *tween* 80 (1 ml.kg^{-1}). D= domperidona, ratos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados por 5 dias com domperidona ($5,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal por dia), divididos em três injeções diárias às 06:30; 14:00 e 21:00 horas, via *i.p.* Os dados são expressos como média $\pm$ SE. ($p<0,05$) ANOVA-Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5 DISCUSSÃO

É amplamente conhecido que a administração de domperidona por sua propriedade de bloquear os receptores D2 de dopamina, particularmente aqueles do sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, induz hiperprolactinemia (BAILEY; HERBERT, 1982; FELICIO; BRIDGES, 1992; NASELLO et al., 1997; CRUZ-CASALLAS et al., 1999; OCHOA-AMAYA et al., 2011, 2015). Os resultados do primeiro experimento da tese confirmam esse efeito da domperidona e são consistentes com achados anteriores do nosso laboratório (BAILEY; HERBERT, 1982; CHAMPION, 1988; FELICIO; BRIDGES, 1992; NASELLO et al., 1997; CRUZ-CASALLAS et al., 1999; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011).

Muito do que agora é conhecido relacionado com a patogênese e patofisiologia da asma é derivado de estudos feitos com animais e humanos da asma alérgica. Mas se deve tomar cuidado em extrapolar os dados obtidos nesses modelos para tentar entender que está acontecendo na asma não atópica. Em geral, a asma não ocorre em roedores ou em animais não humanos, e é necessário cuidado ao interpretar os dados dos modelos animais da asma, muitos dos quais poderiam ser mais facilmente descritos como modelos da inflamação das vias aéreas causados por sensibilização alérgica (RICH et al., 2008). Não obstante, o modelo da asma funcionou muito bem nestes experimentos.

O estudo do primeiro experimento avaliou os efeitos da hiperprolactinemia induzida pela domperidona antes do desafio antigênico sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar. A hiperprolactinemia induzida antes do desafio antigênico diminuiu a inflamação alérgica pulmonar. Esses dados sugerem que a prolactina possa ter uma função na patogênese da asma.

Os resultados do BAL dos grupos asmáticos, quer sejam controle, veículo ou domperidona, demonstram que os animais tiveram maior migração celular ao pulmão caracterizando o processo inflamatório alérgico pulmonar induzido pela OVA, quando são comparados com o grupo não asmático *naïve* que apresentou os níveis basais de celularidade no pulmão. Com relação aos eosinófilos, linfócitos e

macrófagos, a maior migração ao pulmão foi observada para o grupo controle que se apresentou estatisticamente diferente do *naive* e do domperidona. Assim, foi evidente o processo inflamatório alérgico pulmonar no grupo controle. No experimento 1, o grupo controle apresentou uma migração que não difere estatisticamente do veículo com relação ao BAL total. Isto pode ser explicado pelo fato de ser este um grupo asmático que só recebeu tratamento com salina. No BAL diferencial o grupo veículo apresentou diferenças estatísticas significantes com o controle com relação aos eosinófilos e os neutrófilos sugerindo que o tratamento com veículo talvez não seja totalmente inócuo. O grupo controle mostrou um maior número de células do BAL possivelmente em decorrência de uma maior migração de células da medula óssea em resposta ao processo inflamatório alérgico pulmonar induzido pela OVA. O grupo domperidona teve diminuição da população dos eosinófilos em relação ao grupo controle.

Ao avaliar o número de células totais presentes na medula óssea, os grupos controle, veículo e o grupo hiperprolactinêmico apresentaram um menor número de células totais comparado com o grupo *naive* que representa os níveis basais da celularidade da MO. Esse resultado do grupo controle pode ser devido a que, devido a intensa migração de células para o pulmão promovida pelos fatores quimiotáticos às células epiteliais bronquiais, a MO foi incapaz de compensar a demanda da celularidade e de alcançar os níveis basais normais representados por o grupo *naive*. O grupo hiperprolactinêmico D exibiu menor número do total de células quando comparado com o grupo *naive*. A redução das células da medula óssea no grupo D foi associada com o número mais baixo de células no fluido BAL e sangue, o qual pode ser causado pela hiperprolactinemia. Assim, o tratamento com a domperidona, feito antes do desafio inalatório, teve efeitos antiinflamatórios nos pulmões de ratos alérgicos. Esses efeitos podem ser atribuídos ao efeito da domperidona induzindo hiperprolactinemia de curta duração sobre a linfopoiese (WELNIAK; RICHARDS; MURPHY, 2001). Esses autores estudaram a habilidade da prolactina recombinante humana (rhPRL) para estimular o crescimento de células progenitoras hematopoiéticas murinas *in vitro*. Nesse estudo, os autores confirmaram que algumas observações feitas em células de camundongo podem-se estender a humanos. A prolactina falhou em aumentar o progenitor granulocito-macrófago (CFU-GM) e crescimento de progenitores eritróides comprometidos

(BFU-E) quando a prolactina foi adicionada a culturas a várias concentrações (1-1000 ng/ml) ou de medula óssea não fraccionada (WELNIAK et al., 2000). Há uma correlação entre os níveis de prolactina e o número de linfócitos CD4+ e linfócitos B, mas a prolactina não é essencial para a linfopoiesis (WELNIAK; RICHARDS; MURPHY, 2001; ORBACH; SHOENFELD, 2007). A prolactina pode atuar diretamente sobre seus receptores presentes nas células progenitoras na medula óssea. A interação da prolactina com seus receptores ativa a JAK da família das cinases. Esta via fosforila proteínas latentes STAT5, conferindo capacidade de ligação ao ADN e STAT resultando na ativação da transcrição de determinados genes, tais como de STAT1, STAT3, e STAT5b. Esta via também ativa a transcrição de genes-chave no desenvolvimento da resposta de Th1, tais como o fator de T-bet. A transcrição deste gene é ativada até mesmo por baixas concentrações de PRL e inibida por concentrações elevadas de prolactina em linfócitos CD4+ (JARA et al., 2011; BLANCO-FAVELA et al., 2012). Baixas doses de prolactina promovem uma resposta pró-inflamatória e geram a produção de anticorpos, enquanto que doses elevadas de prolactina suprimem essas respostas. O hormônio do crescimento, Fator de crescimento 1 semelhante à insulina, e a prolactina poderiam promover efeitos de crescimento celular em função de resposta imune através da liberação de citocinas (WELNIAK; RICHARDS; MURPHY, 2001).

A IL-4 tem uma função central na promoção da reação inflamatória eosinofílica em doenças alérgicas, através da ativação de isotipo de IgE (PACKARD; KHAN, 2003). O grupo domperidona apresentou maiores concentrações de IL4 com relação ao grupo *naive* e maior expressão do TNF α que o grupo veículo ($p < 0,05$). A prolactina promove respostas imunes pró-inflamatórias via NF κ B e fator regulatório do interferon 1 (IRF-1). Esses fatores citados são conhecidos por induzir aumento do TNF α , considerado mediador essencial de inflamação (OCHOA-AMAYA et al., 2011), o qual pode afetar processos patofisiológicos durante condições hiperprolactinêmicas (BRAND et al., 2004). O TNF α contribui para a resposta inflamatória desregulada nas vias aéreas dos asmáticos, em parte por indução da expressão epitelial de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (LEE et al., 2011), o que foi observado no grupo hiperprolactinêmico com aumento em IL-6, IL-10 e IFN γ pelas células secretoras. A produção do IFN γ no BAL foi maior no grupo hiperprolactinêmico.

A prolactina induz a transcrição do fator regulatório do interferon 1 (IRF-1) que é um fator de transcrição multifuncional, e um importante fator regulatório da diferenciação e maturação de linfócitos T e B (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005). Para os linfócitos T, o IRF-1 é essencial para o desenvolvimento e a resposta Th1, bem como a sua proliferação e apoptose. Em células Nb2 T, o IRF-1 é induzido pela estimulação da prolactina como parte da ativação inicial G1 (YU-LEE et al., 1998). IRF-1 regula a expressão de genes importantes que medeiam à resposta imune, defesa do hospedeiro, a progressão do ciclo celular, de supressão tumoral e de apoptose (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002). Consistentemente, a prolactina promove a resposta imunológica de Th1, que está associada com a ativação da resposta celular, com a ativação de macrófagos, e com as sínteses de IFN γ em células NK e linfócitos T (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005).

O TNF α estimula ACTH, hormônio do crescimento, hormônio estimulante da tireoide, e secreção de prolactina em células da hipófise de rato *in vitro*. Em contraste, o TNF α foi descrito como inibidor da liberação de ACTH e de outros hormônios em resposta a fatores hipotalâmicos por atuação direta sobre as células da hipófise (WEIZMAN; BESSLER, 1999).

A IL-6 é sintetizada pelas células Th2 e as células apresentadoras do antígeno e é envolvida na resposta inflamatória (BASCONES; MOLES, 2003). Aumentos nos níveis de IL-6 estimulam a secreção de ACTH, e a IL-6 desempenha um papel na ativação do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (WEIZMAN; BESSLER, 1999). As concentrações de IL-6 e IL-10 nos explantes pulmonares em ratos do grupo domperidona, no presente estudo foram maiores do que nos grupos *naïve*, veículo, e controle desafiados com OVA. A concentração de IL-6 nos animais do grupo hiperprolactinêmico, tratado com domperidona, foi significativamente maior que aquelas observadas nos outros três grupos (N, V, e C). A ativação dos linfócitos T, mediada por vias de prolactina através de receptores de prolactina (PRL-R), e JAK2 / Stat5, conduz à produção e liberação de uma variedade de citocinas, incluindo IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IFN γ , que estimulou as células B ativadas para proliferar e diferenciar-se. Estes resultados sustentam a idéia de que a prolactina favorece a tolerância através da modulação da atividade biológica de vários tipos de células e

tecidos, bem como diversos aspectos da resposta imune (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOSA, 2002). A concentração de prolactina é um importante fator modulador da resposta inflamatória (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; PEREIRA et al., 2015). A prolactina tem um papel fisiológico importante na manutenção da sobrevivência e da função do sistema imune, em condições de stresse, em que tanto a prolactina e glicocorticóides são elevados, mas com funções opostas (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005). Isso sugere a existência de um antagonismo fisiológico entre esses dois hormônios em determinadas situações.

No entanto, os níveis de corticosterona no grupo hiperprolactinêmico eram baixos e diferentes dos grupos *naïve* e controle. Estes resultados são consistentes com o antagonismo fisiológico de ACTH e corticosteróides pela prolactina em situações de estresse (OCHOA-AMAYA et al., 2010). Como tal, a administração de prolactina após a hemorragia melhora a função dos macrófagos e esplenócitos, e reduz os níveis de corticosterona plasmática e mortalidade (MONTES DE OCA et al., 2005). A prolactina reverte os efeitos dos corticosteróides e aumenta as respostas celulares tipo Th1 (CHIKANZA, 1999). Assim, as respostas Th1 no modelo de asma podem ser anti-inflamatórias. Isto é consistente com as observações descritas neste estudo. Esses resultados são consistentes com os achados de outros autores que relataram que a prolactina promove a secreção de citocinas Th1 *in vivo* e *in vitro* (CHIKANZA, 1999; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; BLANCO-FAVELA et al., 2012). Em camundongos, os níveis elevados de prolactina aumentam a atividade das células Th1 e a função de linfócitos T específicos ao antígeno (CHIKANZA, 1999) as células Th1 segregam IL-2 e IFN γ , cuja função é a de inibir a asma brônquica (BARNES, 2001).

A prolactina também é capaz de modular a resposta de células Th1 a IL-2 exógena e a resposta de células B e T para fatores de competência, tais como agentes mitogênicos. Esta ação moduladora pode ser positiva ou negativa, dependendo da concentração do hormônio. No entanto, o efeito estimulador da prolactina foi diminuído em concentrações elevadas (200 ng/ml), e quantidades comparáveis de IL-2 também são conhecidas por aumentar eficazmente a proliferação de células NK (MATERA et al., 1992). A prolactina é uma molécula versátil e isto depende tanto do

seu polimorfismo estrutural e a ampla distribuição dos seus receptores de membrana (MACOTELA et al., 2002; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005).

A IL-10 evita a deposição e a ativação de eosinófilos, induzida pelo alérgeno em modelos animais de asma. Também regula a resposta imunitária celular (PACKARD; KHAN, 2003). O grupo domperidona exibiu um aumento nos níveis de IL-10, uma citocina que é produzida por células Th2, células B e macrófagos. A IL-10 atua sobre as células que expressam antígeno inibindo a sua função (BASCONES; MOLES, 2003). Hiperprolactinemia neste grupo ativou um sistema de controle pela IL-10, limitando assim a reatividade pró-inflamatória (OCHOA-AMAYA et al., 2010). Quando a IL-10 é aumentada nas doenças alérgicas, ela suprime a atividade de mastócitos e neutrófilos. A IL-10 também tem sido associada com a síntese reduzida de IgE em reações alérgicas que envolvem mastócitos (DE OLIVEIRA et al., 2011). Elevadas doses de prolactina (1000 ng / ml) em macrófagos murinos induz aumento da síntese de IL-10 (COSTANZA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015) com supressão significativa da produção de citocinas na mesma linha celular, correlacionada com a expressão pSTAT3 (PEREIRA et al., 2015).

Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias Th2 como IL-5 (ZHOU et al., 2015), IL6 (WONG et al., 2001) e um baixo perfil de citocinas Th1 como IFN γ (PACKARD; KHAN, 2003) e citocinas anti-inflamatórias como IL10 (TOMITA et al., 2002) foram observados em doentes asmáticos. Tem sido reconhecido que a vitamina D ativada (calcitriol) modula a resposta imune através da inibição ou aumento em vários níveis da função das células, tal como a produção de ambas as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e a inibição da diferenciação de células B, proliferação e secreção de anticorpos. A vitamina D ativada aumenta o desenvolvimento da IL-10 e reduz o número de células secretoras de IL-6 e IL-17 (CORREALE; YSRRAELIT; GAITN, 2009).

A vitamina D parece atuar de modo semelhante à prolactina. Tanto a vitamina D e prolactina aumentaram a produção de IL-10. Assim, partes dos efeitos relatados neste primeiro experimento podem se dever às ações da vitamina D juntamente com as de a prolactina. A domperidona tem limitações como um modelo para hiperprolactinemia. Esse fármaco bloqueia os receptores de dopamina periféricos e

algumas células do sistema imunológico que têm receptores de dopamina. Assim, esse mesmo mecanismo, de antagonismo competitivo, pode ter influenciado a resposta dessas células do sistema imunológico. Os estudos *in vitro* têm abordado esta questão (CARVALHO-FREITAS et al., 2007, 2008, 2011). No entanto, estudos futuros vão investigar se as ações de prolactina aqui descritas ocorreram utilizando uma ou mais das diferentes vias de sinalização de prolactina. Camundongos *knockout* para a STAT5 neuronal podem vir a revelar-se como uma ferramenta útil para abordar esta questão (BUONFIGLIO et al., 2015).

Histologicamente, em todos os asmáticos a característica mais evidente é o engrossamento da membrana basal, independentemente da severidade da doença. O colágeno é produzido pelos miofibroblastos. No presente estudo, os resultados mostraram com coloração histoquímica picrossirius revela-se o colágeno de cor roxa, permitindo assim a sua quantificação. Várias citocinas regulatórias produzidas pelas células T e eosinófilos têm efeitos pró-fibróticos. Entre elas temos o TGF- β , IL-10, e IL-17. As concentrações dessas citocinas podem aumentar nas vias aéreas de seres humanos alérgicos. Elas promovem a fibrose através da diminuição da atividade de células T e B (RICH et al., 2008). Todos os grupos de tratamento (C, V, e D) exibiram maior intensidade de coloração para o colágeno quando comparados com o grupo *naïve*. Isso acontece porque esses três grupos apresentam inflamação alérgica pulmonar. O TNF α também pode ter uma função mais integrada no remodelamento das vias aéreas, e resposta de reparação que ocorre como um resultado da resposta inflamatória que é associada com a lesão epitelial das vias aéreas através da modulação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) dependente do estresse e resposta de reparação.

Além disso, as células epiteliais das vias aéreas também secretam muco quando são estimuladas com o TNF α (RUSSO; POLOSA, 2005). Devido a isso, o grupo domperidona apresentou níveis aumentados do muco quando comparado com o grupo *naïve*. Da mesma maneira, o grupo domperidona teve maiores níveis de TNF α quando foi comparado com o grupo veículo. Concordando com o descrito anteriormente (MELI et al., 1993a) que descreveu que a produção do TNF α (medida por ensaio MTT/ensaio citotóxico) pelos neutrófilos foi marcadamente aumentado nos ratos tratados hiperprolactinêmicos em comparação aos controles. Tal qual foi

observado neste experimento. Do mesmo modo o grupo domperidona diminuiu a produção de muco quando foi comparado com o grupo veículo, sendo estatisticamente diferente dele.

Quanto à morfometria no pulmão, o grupo que apresentou maior migração de eosinófilos, macrófagos e linfócitos ao pulmão foi o grupo controle. Isto se deve provavelmente também a maior produção de citocina IL-4. A IL-4 é uma citocina que promove a migração dos leucócitos, eosinófilos ao sítio inflamatório por meio da expressão de moléculas de adesão como a L-selectina (HAMASATO et al., 2014).

A sinalização do receptor P2X7R contribui para a patogênese da inflamação das vias aéreas alérgicas (MÜLLER et al., 2011; IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014). Nos cortes de pulmão a expressão do receptor encontra-se aumentada nos animais dos grupos C e V. Esse aumento foi revertido nos animais hiperprolactinêmicos. Esses resultados sugerem que a alergia pulmonar teria induzido um aumento na expressão desse receptor, enquanto a hiperprolactinemia parece reverter parcialmente esse efeito. A expressão aumentada do receptor P2X7R pode ser encontrada sobre eosinófilos e macrófagos na asma (IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014), como aconteceu nos grupos controle e veículo que tiveram a maior marcação para o receptor P2X7R. Esses receptores têm uma função crítica em mediar as respostas inflamatórias e imunológicas, contribuindo para estados inflamatórios crônicos existentes em várias desordens tais como a enfermidade inflamatória crônica pulmonar, asma e a enfermidade inflamatória intestinal (IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014). Os animais tratados com a domperidona mostraram uma forte redução nas características da inflamação alérgica pulmonar, eosinofilia das vias aéreas, hipersecreção de muco e na expressão do receptor P2X7R, quando foram comparados com o grupo veículo e controle. Consistentemente com a idéia de um efeito da prolactina nessa circunstância, estes animais hiperprolactinêmicos se comparados com os animais *naïve*, não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Com relação ao peso das glândulas adrenais e a relação glândula adrenal / peso corporal, no experimento 1 não houve diferenças estatísticas entre os 4 grupos

avaliados. Assim, esses resultados não evidenciaram um possível efeito da alergia pulmonar e tampouco a hiperprolactinemia sobre o peso das adrenais.

A liberação de maior quantidade de adrenalina é um mecanismo na resposta inflamatória alérgica pulmonar, pois a adrenalina endógena aumenta como um ajuste fisiológico compensatório. É possível que a hiperprolactinemia tenha influenciado a atividade do sistema nervoso simpático, diminuindo a adrenalina plasmática no grupo domperidona. Fisiologicamente, a adrenalina causa aumento da força de contração e da frequência cardíaca, aumenta a pressão sanguínea e dilata as vias respiratórias, eventos que contribuem para aumentar a disponibilidade de oxigênio nos tecidos. A adrenalina aumenta a frequência e o volume respiratórios por meio do relaxamento dos músculos bronquiais mediante a ativação de receptores β_2 . Os receptores β_2 têm sido localizados primariamente no músculo liso das vias aéreas, nas células epiteliais, nas fibras nervosas colinérgicas pós-ganglionares e também têm sido demonstrados em vários tipos celulares inflamatórios incluindo os mastócitos, eosinófilos, macrófagos neutrófilos e linfócitos (HALEY; SUNDAY, 2002). As catecolaminas, em particular a adrenalina, parecem modificar os padrões de produção de citocinas Th1 e Th2 (STERNBERG, 2001).

Por isso, os animais que mais inflamaram apresentaram níveis mais altos de adrenalina plasmática. Isso ocorreu nos grupos controle e veículo como um mecanismo compensatório ao processo inflamatório alérgico pulmonar que está acontecendo. Assim, ao aumentar a disponibilidade de oxigênio, por meio da broncodilatação, a adrenalina compensaria parcialmente a falta de ar gerada pela alergia pulmonar (DÍAZ GONZÁLEZ; CERONI DA SILVA, 2006).

Observou-se nos animais do grupo controle tratados com ovoalbumina, que tiveram os maiores níveis de adrenalina e também apresentaram maiores concentrações de corticosterona. Assim, alergia pulmonar nos permitiu revelar uma alta intensidade de associação entre os níveis elevados de adrenalina e os de corticosterona plasmáticas. SANCHEZ et al (2003) relataram resultados consistentes com os aqui descritos, em um estudo no qual sugerem que os corticosteroides regulam a biossíntese das catecolaminas na glândula adrenal e por sua vez as catecolaminas estimulam a liberação da ACTH da hipófise. O aumento da adrenalina e da

corticosterona, seria uma tentativa de compensar alergia pulmonar, embora essa mobilização endógena não seja suficiente para reverter a inflamação.

As células T são um componente essencial da imunidade adaptativa. Após amadurecerem no timo, as células T *naïve* circulam na periferia. Quando acontece a ativação por um antígeno específico, as células TCD4+ *naïve* proliferam e diferenciam-se em várias subpopulações de células T helper Th, incluindo Th1, Th2, e Th17, que produzem diferentes citocinas e medeiam diferentes funções efetoras. Com relação ao marcador de superfície CD3 dos linfócitos T CD4+ e CD8+ não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos avaliados, *naïve*, controle, veículo e domperidona tanto no BAL e no BFL. O CD3 é um marcador específico de superfície de los linfócitos T (CD4+ e CD8+). A ativação desregulada dos linfócitos TCD4+ é um marcador de doenças autoimunes e inflamatórias. Esses linfócitos TCD4+ *naïve* ativados podem também produzir células T regulatórias Foxp3+ com funções imunossupressivas (NAKAYA et al., 2014). Na asma ocorre uma resposta imunológica excessiva. Nesta doença, a hiperprolactinemia, ao aumentar a função dos linfócitos T reguladores (Treg) terá um efeito benéfico (BLANCO-FAVELA et al., 2012). Os linfócitos T reguladores (Treg) são células que surgem no desenvolvimento do timo e têm características supressoras da resposta imunológica. A prolactina tem um papel de regulação das células T efetoras e reguladoras (CHIKANZA, 1999).

Nos animais hiperprolactinêmicos, grupo domperidona, a quantidade de granulócitos positivos para o receptor de prolactina presentes no BAL, foi menor em relação ao grupo controle. Por outro lado, a medida da intensidade média de imunofluorescência, que é um indicador de número de receptores por célula, do grupo domperidona foi maior que nos outros grupos. Isso sugere que o grupo domperidona tem maior expressão dos receptores por célula para a prolactina nos granulócitos. Assim, dadas essas condições experimentais, é possível que a hiperprolactinemia tenha feito com que os granulócitos, embora tendo menor migração para o pulmão, expressem maior número de receptores por célula para a prolactina. Tendo em vista que os eosinófilos são células primordiais na resposta alérgica, é possível que essa alteração de número de receptores para a prolactina, associada a redução do número dessas células, tenha um significado funcional

relevante na redução da resposta alérgica pulmonar observada nos animais hiperprolactinêmicos.

No segundo experimento do estudo avaliou-se se a lactação influencia a função imune na inflamação alérgica pulmonar. A lactação diminuiu a inflamação alérgica pulmonar nas ratas no início da lactação. As ratas lactantes, mesmo expostas ao antígeno, apresentaram menor migração celular ao pulmão, principalmente de macrófagos e eosinófilos. Assim, pode-se inferir que a lactação tem um papel importante na patofisiologia da asma. Os presentes resultados confirmam em um modelo experimental fisiológico com fêmeas lactantes, os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório, num modelo experimental farmacológico, que avaliou os efeitos de uma hiperprolactinemia de curta duração, induzida pela domperidona antes do desafio inalatório antigênico com ovoalbumina, sobre a inflamação alérgica pulmonar (OCHOA-AMAYA et al., 2015).

Os resultados obtidos nas análises do BAL no grupo V, demonstraram que o tratamento feito com a OVA foi efetivo para induzir inflamação alérgica pulmonar. Os animais do grupo V desenvolveram maior migração celular nos pulmões com maior migração de macrófagos e eosinófilos, quando foram comparados tanto com os do grupo N, que representou a celularidade basal no pulmão, como com os do grupo L.

O número de células do BAL no grupo L foi significativamente menor que no grupo V. E o grupo L não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo N. A comparação do número de eosinófilos e macrófagos entre os grupos L e N não revelou diferenças estatisticamente significantes. O grupo L apresenta menor migração celular de eosinófilos ao pulmão. Isso pode sugerir uma relação causal, no qual a hiperprolactinemia fisiológica efetivamente reduz a migração eosinofílica pulmonar.

Em relação à celularidade do FML do grupo V, foi significativamente maior que aquela observada para os grupos N e L. Isso porque o grupo V apresentou um aumento na demanda da produção de células na medula óssea em resposta ao processo alérgico pulmonar induzido pela OVA. O grupo L e o grupo N não foram

estatisticamente diferentes na celularidade do FML. A redução das células da MO no grupo L quando comparada com o observado no grupo V, pode se dever a uma menor demanda na MO do grupo L. Isto é associado à hiperprolactinemia fisiológica, como o descrito por (WELNIAK; RICHARDS; MURPHY, 2001; ORBACH; SHOENFELD, 2007). Esses autores estudaram a habilidade da prolactina recombinante humana (rhPRL) para estimular o crescimento das células progenitoras hematopoiéticas murinas *in vitro*. A prolactina não aumentou o progenitor granulócito macrófago (CFU-GM) e (BFU-E), quando a prolactina foi adicionada nas culturas em várias concentrações (1-1000 ng.ml⁻¹).

A prolactina promove respostas imunes pró-inflamatórias via NFκB e fator regulatório do interferon 1 (IRF-1), que é um fator de transcrição multifuncional e um importante regulador da diferenciação e maturação dos linfócitos T e B (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005). Esses fatores citados são conhecidos por induzir aumento do TNFα considerado mediador essencial de inflamação (OCHOA-AMAYA et al., 2011). O TNFα é uma citocina pro-inflamatória (BERRY et al., 2007) com uma extensa organização de atividades imuno-modulatórias (RUSSO; POLOSA, 2005; OYOSHI et al., 2008), sua função precisa na patogênese da asma ainda não está muito clara (OYOSHI et al., 2008). O TNFα é sobre-regulado nas vias aéreas em asmáticos, após o desafio do alérgeno (CHOY et al., 2015), o TNFα induz expressão epitelial de citocinas como IFNγ (LEE et al., 2011). No grupo L houve diferença significativa com maior expressão desta citocina, quando foi comparado com o grupo N. Cabe lembrar que a concentração de prolactina é um importante fator modulador da resposta inflamatória. Como as fêmeas lactantes têm níveis mais altos de prolactina plasmática, é possível que esse hormônio tenha tido um papel relevante no processo de modulação da resposta alérgica pulmonar dos animais do grupo L (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; PEREIRA et al., 2015).

Os níveis de corticosterona no grupo V foram significativamente maiores que os do grupo L. Possivelmente devido ao fato do grupo V ter maior intensidade de inflamação alérgica pulmonar que os outros. A corticosterona endógena aumenta a resposta patofisiológica da adrenal, possivelmente para proteger o pulmão durante a inflamação alérgica eosinofílica (NAGATA et al., 1999). Vários autores sugerem que

a síndrome alérgica está sujeita à regulação endócrina (HIOCO et al., 1951). Sendo assim os corticosteroides produzidos endogenamente podem reduzir a inflamação eosinofílica (NAGATA et al., 1999) no grupo V. Esses autores relatam que a inflamação eosinofílica pode causar estresse para o paciente e um consequente aumento na corticosterona sérica. Sendo assim, a corticosterona pode aumentar como uma resposta adrenal no sentido de proteger o pulmão (NAGATA et al., 1999). Níveis fisiológicos de glucocorticoides são imuno-modulatórios, causando mudança de citocinas de tipo pro-inflamatório a anti-inflamatório (STERNBERG, 2001).

Os corticosteroides podem prevenir a inflamação das vias aéreas, por reduzir a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios das células epiteliais bronquiais (WANG et al., 1997). O pré-tratamento de uma hora com o corticosteróide budesonide 300 nM, com os mastócitos peritoneais de rato, resultou em 50 % de redução na liberação do $TNF\alpha$ (ZHOU et al., 2008). Provavelmente devido a isso, o grupo V por ter a corticosterona aumentada, não mostrou diferenças estatísticas em relação aos grupos N e L na liberação do $TNF\alpha$. Os glucocorticoides exercem efeitos quase imediatos sobre as células imunes. Um receptor para os glucocorticoides é requerido para que exerçam seus efeitos sobre as células imunes. Ainda que alguns de seus efeitos podem não requerer a dimerização do receptor e união do ADN ao receptor (STERNBERG, 2001). Os glucocorticoides inibem o sinal de transmissão via receptores de células T (TCR), usando um mecanismo não genômico que requer a ligação dos glucocorticoides aos receptores de membranas. Assim, para os resultados aqui descritos é possível que a ação dos glucocorticoides tenha se dado por meio de mecanismos não genômicos nas células T (JIANG et al., 2015).

Os níveis de corticosterona do grupo L foram menores com relação aos do grupo V. Esses resultados são consistentes com o antagonismo fisiológico do ACTH e corticosteroides pela prolactina em situações de estresse (OCHOA-AMAYA et al., 2010). A prolactina reverte os efeitos dos corticosteróides e aumenta a resposta celular tipo Th1 (CHIKANZA, 1999). Assim mesmo, a resposta Th1 no modelo de asma pode ser anti-inflamatória. Esses dados de literatura são consistentes com as observações feitas neste e em outros estudos (CHIKANZA, 1999; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005; BLANCO-FAVELA et al., 2012).

Camundongos com altos níveis de prolactina aumentam a atividade Th1 e a atividade de linfócitos T antígeno específico. As células Th1 secretam IFN γ que inibe a asma bronquial (BARNES, 2001). Nesse sentido, é possível que a prolactina ao promover a resposta imunológica Th1, que está associada com a ativação da resposta celular e com a ativação dos macrófagos na síntese do IFN γ nas células NK e linfócitos T (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ; CARIÑO; DÍAZ, 2005) e faz que ela atue como anti-inflamatório no grupo L.

Além dos glucocorticoides, o sistema nervoso regula o sistema imune regionalmente por meio da inervação dos órgãos imunes pelo sistema nervoso simpático, e nos locais onde há inflamação por meio dos nervos simpáticos (STERNBERG, 2001). A regulação neural das respostas imunes ocorre regionalmente por meio da ativação do sistema nervoso simpático e dos efeitos dos neurotransmissores tais como noradrenalina sobre as células imunes no baço e nodos linfáticos (STERNBERG, 2001). O grupo lactação não apresentou diferenças estatísticas na produção de adrenalina com relação aos outros grupos N e V. Assim, nossos resultados não evidenciam uma participação da adrenalina nas diferenças de expressão da alergia pulmonar entre os grupos. Como o estímulo adrenérgico causa um aumento da frequência e do volume respiratórios através do relaxamento dos músculos bronquiais mediante receptores β_2 decidimos investigar a possível participação da noradrenalina nessa resposta (DÍAZ-GONZÁLEZ; CERONI DA SILVA, 2006). Os receptores β_2 têm sido localizados primariamente no músculo liso das vias aéreas, nas células epiteliais, nas fibras nervosas colinérgicas pós-ganglionares e também têm sido descritos em vários tipos celulares inflamatórios incluindo os mastócitos, eosinófilos, macrófagos neutrófilos e linfócitos (HALEY; SUNDAY, 2002). De fato, estudos recentes demonstram que todos os leucócitos aparentemente expressam 2AR, com exceção apenas dos subclones do tipo Th2 CD4+. Sabe-se, porém, que mesmo estas células Th2 CD4+, são reguladas por estímulos adrenérgicos via liberação de citocinas em decorrência da sensibilização pelas catecolaminas das células que contêm os 2AR (KOHM et al., 2000). Especificamente, considere-se que todos os parâmetros avaliados decorrem de leucócitos e que parte especialmente relevante da resposta decorre da liberação de catecolaminas. Quanto à noradrenalina, as fêmeas lactantes apresentaram concentrações maiores que as dos outros grupos. Esse resultado sugere que durante a lactação ocorra um

aumento de noradrenalina num cenário de alergia pulmonar. Sabe-se que a ativação de receptores adrenérgicos beta2 têm efeito bronco dilatador. Assim, esse aumento de noradrenalina teria um alto valor adaptativo ao minorar a broncoconstrição característica da alergia pulmonar e também da asma.

Como já dito, as principais vias de resposta a estressores são o eixo HPA, por meio de glicocorticoides e o SNAS, por meio de adrenalina e noradrenalina. Assim, num contexto de asma, teríamos níveis de corticóides aumentados que atuariam inibindo o processo inflamatório e também uma ativação adrenérgica que por meio de receptores β_2 adrenérgicos, atuaria gerando broncodilatação. É possível que hormônios lactogênicos endógenos, tais com a prolactina e lactogênios placentários tenham atuado ao longo da gestação e da lactação no sentido de mobilizar vias de sinalização moduladoras levando á expressão reduzida da resposta alérgica pulmonar durante a lactação. Esses resultados, são consistentes com a ação da prolactina sugerida no experimento 1 e ressaltam a importância do estudo da asma no contexto específico de cada estado fisiológico do indivíduo.

No experimento 3 com relação ao BAL total, o grupo controle apresentou a maior migração celular ao pulmão e foi estatisticamente diferente aos grupos, *naive*, veículo e domperidona. Assim, no grupo controle a resposta alérgica pulmonar induzida pela OVA ficou claramente demonstrada. Ainda com relação ao grupo controle, é possível que o maior número de células do BAL exista em decorrência de uma maior migração de células em resposta ao processo inflamatório alérgico pulmonar induzido pela OVA. Assim mesmo, com relação aos eosinófilos, linfócitos e macrófagos, a maior migração ao pulmão foi observada para o grupo controle que se apresentou estatisticamente diferente do *naive* e do domperidona, ainda que fosse evidente o processo inflamatório alérgico pulmonar no grupo veículo. No experimento 3, o grupo controle apresentou uma migração que não difere estatisticamente do veículo com relação ao BAL diferencial na contagem de macrófagos e linfócitos. Isto pode ser explicado pelo fato de ser este um grupo asmático que só recebeu tratamento com salina. Embora, no BAL diferencial o grupo veículo apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao controle representado pelos eosinófilos. O grupo controle mostrou um maior número de células do BAL em decorrência de uma maior migração de células da medula

óssea em resposta ao processo inflamatório alérgico pulmonar induzido pela OVA. Isso ocorreu, provavelmente, porque houve uma maior demanda da celularidade migratória para o pulmão dos animais do grupo controle. O grupo domperidona teve diminuição da população dos eosinófilos, macrófagos e linfócitos sendo estatisticamente diferente comparado com o grupo controle e com o veículo, mas não difere estatisticamente comparado com o grupo *naïve*. Observou-se naqueles animais do grupo controle, o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r) $r=0,9253$ com um intervalo de confiança de 0,2339 a 0,9952 e um valor de $p=0,0242$ sendo considerado estatisticamente significativo, com relação aos outros grupos avaliados, veículo e domperidona. O que nos permite inferir a medida da intensidade da associação muito forte neste grupo controle existente entre o número de eosinófilos migrados ao pulmão e a inflamação indicando-se uma correlação direta. Com relação ao grupo veículo e o domperidona os valores de r , são respectivamente para o grupo veículo $r=0,1779$, domperidona $r=0,3248$, indicando uma correlação muito fraca, entre o número de eosinófilos migrados ao pulmão e a inflamação, entre estes grupos não há diferença estatística.

Ao avaliar o número de células totais presentes na medula óssea, os grupos controle, veículo e o grupo hiperprolactinêmico apresentaram um menor número de células totais comparado com o grupo *naïve* que representa os níveis basais da celularidade da MO. O grupo controle teve um maior requerimento de células da medula óssea, a medula óssea não foi capaz de restabelecer a quantidade de células requeridas para poder manter os níveis basais, pois o grupo controle é estatisticamente diferente do grupo *naïve*. O grupo controle no BAL foi quem apresentou maior migração de células para o pulmão, quando foi comparado com os outros três grupos. Esse resultado do grupo controle pode ser devido à intensa migração de células para o pulmão promovida pelos fatores quimiotáticos das células epiteliais bronquiais. O grupo controle comportou-se de forma semelhante aos grupos veículo e domperidona com relação à quantidade de células do BFL, pois não foi significativamente diferente deles. O grupo domperidona comparado com o grupo veículo ($p>0,05$), não apresenta diferença estatisticamente significativa, pois ambos apresentaram o menor número de células do BFL que os níveis basais do *naïve*. Por outro lado, os tratamentos tanto com o veículo como com o fármaco, efetuados antes da imunização também se revelaram anti-inflamatórios. Assim, os

resultados, não permitem avaliar se a hiperprolactinemia de curta duração, feita antes da sensibilização diminui a resposta inflamatória no pulmão em ratos asmáticos. Tampouco, se pode descartar essa hipótese. A interpretação desses resultados vai além de uma possível ação da prolactina e deve envolver uma rede mais abrangente de interações neuroimunomodulatórias. A diminuição do número de células da MO observada tanto no grupo veículo como no grupo domperidona, pode ser devida à manipulação experimental que envolveu injeções, e provocou a ativação do eixo HPA com um aumento na liberação do hormônio adrenocorticotropina pituitária (ACTH), a qual eleva os corticosteroides adrenais que vão a interferir com a apresentação do antígeno, assim mesmo ocorre a ativação do sistema simpatoadrenomedular causando aumento da secreção de noradrenalina e adrenalina, também como neuropeptídeos como encefalina e B-endorfinas; estas últimas modulam a função dos linfócitos, células NK, macrófagos e mastócitos (WEIZMAN; BESSLER, 1999). É possível que a redução das células da medula óssea, observada nos grupos veículo e domperidona, esteja associada de maneira causal com o menor número de células na corrente sanguínea e no BAL.

Com relação à concentração da corticosterona os três grupos alérgicos apresentaram menores níveis de corticosterona comparados com o grupo *naïve*. O procedimento das manipulações das injeções e aquelas feitas para converter os animais em alérgicos, tenha influenciado os níveis do hormônio corticosterona gerando uma redução na intensidade da resposta. Haja vista que, os níveis da corticosterona dos grupos controle, veículo e domperidona não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Em concentrações fisiológicas, os glucocorticoides são imunoregulatórios, mudando a produção de citocinas do tipo pró-inflamatório a anti-inflamatório. O padrão Th2 de imunidade é caracterizado pela produção de IL-4, IL-6 e IL-10 e está associado a uma resposta imune humoral ou de produção de anti-corpos (STERNBERG, 2001).

A IL-4 conduz à diferenciação das células Th0 *naïve* a células Th2 no curso da inflamação alérgica pulmonar (HAMASATO et al., 2014). É por isso que no experimento 3, os grupos asmáticos como controle, veículo e domperidona apresentaram níveis altos dessa citocina, com relação ao grupo *naïve*, que não tinha processo inflamatório pulmonar nenhum. Igualmente pode-se observar a ação

imunomodulatória dos glucocorticoides produzidos endogenamente nestes grupos de animais alérgicos. Em condições fisiológicas os glicocorticoides inibem as respostas Th1 e aumentam as respostas Th2, como são a produção de citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 (STERNBERG, 2001). A IL-6 é sintetizada pelas células Th2 e pelas células apresentadoras de antígeno e está implicada na resposta inflamatória (BASCONES; MOLES, 2003). Ao ocorrer aumento da IL-6 se estimula a secreção do ACTH, pois a IL-6 tem uma função na ativação do eixo HPA (WEIZMAN; BESSLER, 1999).

As concentrações de IL-6 e IL-10 medidas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão de ratos dos grupos controle, veículo e domperidona são estatisticamente diferentes que naquelas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão dos grupos *naïve*, desafiados com OVA. O grupo controle, veículo e domperidona apresentaram aumento da IL-10, esta citocina é produzida pelas células Th2, linfócitos B e macrófagos. A IL-10 atua sobre as células apresentadoras de antígeno inibindo sua função (BASCONES; MOLES, 2003). Ao estar aumentada a IL-10 que é um regulador negativo da resposta imune celular (BASCONES; MOLES, 2003), e na doença alérgica, ela suprime a atividade dos mastócitos e dos neutrófilos. Além disso, a IL-10 tem sido relacionada com a redução da síntese da IgE nas respostas alérgicas envolvendo a participação dos mastócitos (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Com relação ao TNF- α , as culturas dos explantes de pulmão durante 24 horas não apresentaram diferenças significantes entre os grupos avaliados, *naïve*, controle, veículo e domperidona. Assim, esses resultados não evidenciaram um possível efeito da alergia pulmonar e tampouco a hiperprolactinemia sobre a concentração do TNF α .

Com relação ao IFN γ não houve diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos avaliados. Isso ocorreu provavelmente pela ação imunomodulatória dos glicocorticoides que inibiram a resposta Th1 de tipo celular como é a produção de IFN γ (STERNBERG, 2001) dos grupos asmáticos controle, veículo e domperidona. Nos grupos asmáticos controle, veículo e domperidona houve uma dramática diminuição do IFN γ produzido pelas células Th1. Em nenhum grupo experimental houve diferença na concentração do IFN γ com relação ao grupo *naïve*.

Nas enfermidades inflamatórias e autoimunes uma resposta desregulada dos linfócitos TCD4+ ativados e diferenciados acontece. No experimento aqui descrito, esse fenômeno não foi evidenciado (NAKAYA et al., 2014).

O sistema nervoso usa dois mecanismos, um direto e o outro indireto, para exercer sua atividade inibitória sobre citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos periféricos. Na forma, denominada “via colinérgica anti-inflamatória” citocinas inflamatórias estimulam a atividade do nervo vago. A acetilcolina se liga aos receptores nicotínicos sobre a membrana plasmática dos macrófagos vizinhos. Uma consequência, da ativação da via de sinalização (NFkB) é o bloqueio da produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF α e a redução da alta mobilidade do grupo das citocinas 1 (HMGB-1). O outro mecanismo é um *feedback* negativo que se inicia quando as reações inflamatórias, mediadas pelas citocinas periféricas, estimulam a rota sensorial vagal aferente e ativam uma resposta reflexa através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) a qual libera ACTH e glucocorticóides, que reduzem a produção de citocinas periféricas (REYES-GARCÍA; GARCÍA-TAMAYO, 2009). Talvez as diferenças observadas nos animais do grupo veículo se devam a ativação de alguma dessas vias, ou de ambas.

No experimento 3 não houve diferenças estatísticas com relação à adrenalina e noradrenalina entre os quatro grupos avaliados. A liberação de maior quantidade de adrenalina é um mecanismo que ocorre na resposta inflamatória alérgica pulmonar, pois a adrenalina endógena aumenta como um ajuste fisiológico compensatório. Assim, no experimento 3, essas medidas não evidenciam a participação dessas catecolaminas nas diferenças entre as repostas alérgicas observadas para cada grupo. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que não houve participação do sistema nervoso simpático na redução da resposta alérgica observada nos grupos veículo e domperidona. É possível que isso se deva à ativação de outras vias bioquímicas.

Com relação ao colágeno e muco, o grupo domperidona apresentou menor quantidade de colágeno e muco com relação ao grupo controle. O grupo domperidona teve maior quantidade de colágeno e muco que o grupo *naïve*. Esse resultado sugere que o grupo domperidona tem maior produção que os níveis basais

de um animal *naïve* e menor que um animal controle. O tratamento com o grupo veículo também diminuiu a quantidade de colágeno e muco com relação ao grupo controle. O fenômeno é consistente com as outras variáveis medidas nesse experimento 3. A alergia pulmonar se revela claramente no grupo controle e se mostra claramente diminuída nos grupos veículo e domperidona. A medida do muco é mais um indicador da alergia pulmonar.

Com relação ao peso das glândulas adrenais e a relação peso glândula adrenal / peso corporal (mg.g^{-1}), não houve diferenças entre os quatro grupos avaliados. Assim, esses resultados não evidenciaram um possível efeito da alergia pulmonar e tampouco da hiperprolactinemia sobre o peso das adrenais e a relação glândula adrenal / peso corporal (mg.g^{-1}) no experimento 3.

Com relação ao Experimento 4, em função das características do desenho experimental, no momento em que as medidas foram feitas a reação alérgica já não se revelava. Assim, os dados nos falam de uma situação em que a alergia havia regredido. Consistentemente, nesse experimento, para a maior parte das variáveis medidas, o grupo controle não costuma apresentar-se diferente do *naïve*. Isso ocorre para os indicadores agudos de alergia tais como eosinófilos, macrófagos e linfócitos no BAL. Possivelmente devido a isso, as diferenças se revelam com mais clareza nas células circulantes sanguíneas. Os neutrófilos e linfócitos circulantes estavam presentes em menores quantidades nos grupos asmáticos com relação ao *naïve*. Isso ocorreu, provavelmente por que muitas delas teriam ficado presas ao parênquima pulmonar durante a fase mais intensa do processo alérgico.

Como era esperado e de maneira consistente com dados prévios de nosso laboratório e da literatura, as concentrações plasmáticas de prolactina se encontravam aumentadas nos animais tratados com domperidona. Isso confirma a reprodutibilidade e validade dessa abordagem experimental para a avaliação das alterações promovidas pela hiperprolactinemia (BAILEY; HERBERT, 1982; CHAMPION, 1988; FELICIO; BRIDGES, 1992; NASELLO et al., 1997; CRUZ-CASALLAS et al., 1999; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011).

Em relação ao peso das adrenais e a relação peso glândula adrenal e peso corpóreo (mg.g^{-1}), os animais que tiveram alergia pulmonar, grupos controle, veículo e domperidona, tiveram o peso de suas adrenais reduzido em relação aos animais do grupo *naive*. A redução de peso não se revela nos animais do grupo controle quando é considerada a relação peso glândula adrenal e peso corpóreo. Possivelmente a alergia pulmonar tenha se manifestado com maior intensidade no grupo controle, afetando o peso total do corpo desses animais. Assim, é provável que a redução do peso corporal total tenha feito com que a diferença observada anteriormente na medida do peso absoluto da glândula não mais se revele. De qualquer forma, a redução observada parece ser um efeito da alergia pulmonar *per se*, enquanto os tratamentos, veículo e domperidona, são incapazes de reverter essa redução. A ausência de alteração significativa nos níveis de corticosterona nos remete à possibilidade de que os tratamentos não tenham levado a modificações funcionais relacionadas à produção desse esteroide pelo córtex da adrenal. Assim, nossos dados não mostram evidências de que a redução no peso das adrenais tenha tido consequências nessa esfera.

As concentrações de IL-6 e IL-10 medidas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão de ratos dos grupos controle, veículo e domperidona são estatisticamente diferentes que naquelas nos sobrenadantes dos explantes de pulmão dos grupos *naive*, desafiados com OVA. Todos os animais dos grupos controle, veículo e domperidona apresentaram aumento da IL-6 e da IL-10. Como mencionado anteriormente, a IL-10 atua sobre as células apresentadoras de antígeno inibindo sua função (BASCONES; MOLES, 2003). A IL-10 regula atividade Th1 e Th2 (HAMASATO et al., 2014). Esta citocina funciona como um regulador negativo da resposta imune celular que pode inibir a atividade dos mastócitos e dos neutrófilos (BASCONES; MOLES, 2003). A IL-6 é sintetizada pelas células Th2 e as células apresentadoras do antígeno e está envolvida na resposta inflamatória (BASCONES; MOLES, 2003). Tal com o a IL-10, a IL-6 também funciona como modulador da resposta alérgica pulmonar (WEIZMAN; BESSLER, 1999). Os níveis aumentados dessas citocinas, observados nos grupos de animais que foram submetidos ao protocolo de indução de alergia pulmonar, podem ser consequência da mobilização endógena compensatória que serviria para reverter o quadro de tipo asmático.

O TNF α é liberado na fase aguda a alergia. Em termos funcionais, essa citocina é pouco relevante no momento seguinte a uma crise asmática. Pois, nesse cenário a inflamação alérgica pulmonar já teve o seu ápice e se encontra cronificada ou revertida. Uma vez que o quadro tipo asma encontra-se cronificado ou revertido, a redução desse fator observada nos animais hiperprolactinêmicos poderia ser consequência do esgotamento das reservas dessa citocina. Uma outra interpretação para esse achado seria essa citocina atua na imunidade inata enquanto no cenário do presente experimento o quadro é de imunidade adaptativa donde a necessidade do organismo mobilizar a produção dessa citocina praticamente inexistente (LEE et al., 2011). É possível que a hiperprolactinemia dos animais tratados com domperidona, por possuir um efeito anti-inflamatório parece ter ajudado a reduzir ainda mais os níveis do TNF- α nos animais desse grupo, fazendo com que eles ficassem abaixo daquelas observados nos animais *naive*.

As células Th1 secretam IFN γ que inibe a asma bronquial (BARNES, 2001). O aumento dos níveis dessa citocina tem relevância funcional do sentido de diminuir a intensidade da resposta alérgica. Assim, os níveis elevados de IFN γ , observados nos animais dos grupos domperidona e controle, seriam típicos de um quadro pós-alérgico. Curiosamente, no grupo veículo esse fenômeno não se revelou.

A liberação de adrenalina e do seu precursor noradrenalina, pode se dar como parte da resposta inflamatória alérgica pulmonar. Os níveis dessas catecolaminas aumentariam como parte de um ajuste fisiológico compensatório durante a crise da alergia pulmonar. Uma vez passada a crise, é possível que os estoques dessas substâncias estejam reduzidos. Isso explicaria os níveis mais baixos de adrenalina observados nos animais dos grupos alérgicos, veículo e domperidona. Já em relação ao grupo controle, os níveis altos devem estar relacionados a uma resposta exacerbada nesse grupo devido a ausência de fatores atenuantes tais como a manipulação da injeção do veículo, no caso do grupo veículo e a hiperprolactinemia, no caso do grupo domperidona. Essa resposta parece se manter mesmo na fase de regressão ou cronificação da inflamação. A noradrenalina, por sua vez, não revelou uma resposta igual aquela observada para a adrenalina. Por outro lado, no grupo hiperprolactinêmico os níveis dessa catecolamina encontravam-se mais baixos. A princípio, nesse caso cabe a mesma explicação dada para a diferença de adrenalina

observada para o mesmo grupo. No caso, a prolactina teria servido para intensificar permitindo que o fenômeno fosse revelado.

Este estudo demonstrou que a hiperprolactinemia, induzida farmacologicamente, diminui a resposta alérgica pulmonar. Além disso, em fêmeas lactantes também houve redução na intensidade dessa resposta. Como nessa situação fisiológica os níveis desse hormônio encontram-se altos, é possível que a prolactina atue durante a lactação de modo similar ao que teria ocorrido nos machos. O tratamento profilático também diminui a resposta alérgica. Entretanto esse fenômeno se revelou tanto em animais tratados com veículo como nos hiperprolactinêmicos. Finalmente, o tratamento com domperidona não foi capaz de revelar-se efetivo na modulação dos indicadores medidos após a crise de alergia pulmonar. Em muitas espécies de mamíferos, o parto ocorre durante a primavera. A abundância de pólen no ar, durante a primavera, é um fator alérgico. Assim, mecanismos endógenos que favorecem a proteção de fêmeas durante a lactação têm alto valor adaptativo. Este estudo, confirma a função da prolactina como um fator modulador de alta relevância para a alergia pulmonar.

6 CONCLUSÕES

A hiperprolactinemia de cinco dias antes do desafio inalatório, foi capaz de diminuir o influxo celular pulmonar, alterar o perfil de migração celular na medula óssea e no sangue, diminuindo a celularidade na medula óssea e a migração de eosinófilos ao pulmão. Além, disso esse tratamento aumenta a concentração de $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes dos explantes de pulmão, bem como de IFN γ no lavado broncoalveolar (BAL), diminui a produção de muco em tecido pulmonar. Nesse cenário, a hiperprolactinemia também diminui os níveis de corticosterona e de adrenalina, diminui a imunorreatividade para o receptor purinérgico P2X7R no pulmão e aumenta o número de receptores de prolactina em granulócitos. Assim, os resultados sugerem um efeito anti-asmático resultante da hiperprolactinemia induzida após o tratamento com ovoalbumina.

Nas fêmeas em lactação o influxo celular pulmonar e a quantidade de eosinófilos estão reduzidas. Da mesma forma, a migração celular na medula óssea é diminuída. Já os níveis de corticosterona e noradrenalina estão aumentados. Os resultados sugerem um efeito anti-asmático resultante do estado fisiológico hiperprolactinêmico da lactação.

Num cenário de tratamento profilático, no qual se tentou avaliar a influência da hiperprolactinemia antes da imunização, a resposta inflamatória alérgica pulmonar foi reduzida tanto nos animais hiperprolactinêmicos como nos animais tratados com o veículo. Assim, apesar da redução da resposta alérgica observada, os dados não evidenciam uma ação específica da hiperprolactinemia.

Uma vez estabelecida a alergia pulmonar, os resultados não evidenciam um efeito da hiperprolactinemia.

Os resultados deste estudo demonstram que a hiperprolactinemia induzida antes do desafio antigênico diminui a inflamação alérgica pulmonar. Assim, é provável que a prolactina endógena tenha um papel relevante como um imunomodulador da asma. Este estudo aponta a possibilidade futura do uso da domperidona para pacientes

asmáticos. Durante a primavera muitas espécies de mamíferos têm seus filhotes e ocorre abundância de fatores alérgenos no ar. Logo, um fator endógeno que favoreça a proteção de fêmeas durante a lactação, tal como a hiperprolactinemia, tem elevado valor adaptativo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. Seventh ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2012.
- ADÁN, N.; LEDESMA-COLUNGA, M. G.; REYES-LÓPEZ, A. L.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Arthritis and prolactin: A phylogenetic viewpoint. **General and Comparative Endocrinology**, v. 203, p. 132–136, 2014.
- ARISAWA, M.; SNYDER, G. D.; YU, W. H. L.; DE PALATIS, L. R.; HO, R. H.; MCCANN, S. M. Physiologically significant inhibitory hypothalamic action of substance P on prolactin release in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 52, n. 1, p. 22–27, 1990.
- BAILEY, D. J.; HERBERT, J. Impaired copulatory behaviour of male rat. **Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 186–193, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7133322>>. Acesso em: 1 jan. 2012.
- BARNES, P. J. Th2 cytokines and asthma: an introduction. **Respiratory Research**, v. 2, n. 2, p. 64–5, jan. 2001.
- BARNES, P. J.; FAN CHUNG, K.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: An update. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 515–596, 1998.
- BARRON, W. M.; LINDHEIMER, M. D. Osmoregulation in pseudopregnant and prolactin-treated rats: Comparison with normal gestation. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 254, n. 3, 1988. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023947476&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 27 jun. 2012.
- BASCONES, A.; MOLES, M. A. G. Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y periimplantarias. **Avances en Periodoncia**, v. 15, n. 3, p. 122 – 138, 2003.
- BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; BRITTO, L. R. G.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J.; GIORGETTI BRITTO, L. R.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: Role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research**, v. 1009, n. 1-2, p. 181–8, 29 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120595>>. Acesso em: 2 set. 2013.
- BEN-JONATHAN, N.; ARBOGAST, L. A.; HYDE, F. J. Neuroendocrine regulation of prolactin release. **Progress in Neurobiology**, v. 33, p. 399–447, 1989.
- BERCZI, I. The role of the growth and lactogenic hormone family in immune function. **Neuroimmunomodulation**, v. 1, n. 4, p. 201–216, 1994.
- BERCZI, I.; NAGY, E.; KOVACS, K.; HORVATH, E. Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. **Acta Endocrinologica**, v. 98, n. 4, p. 506–513, 1981.

BERCZI, I.; QUINTANAR STEPHANO, A.; CAMPOS, R.; KOVACS, K. New aspects of immunoregulation by growth and lactogenic hormones. **Advances in Neuroimmune Biology**, v. 5, n. 1, p. 43–60, 2014.

BERNTON, E. W.; MELTZER, M. S.; HOLADAY, J. W. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. **Science**, v. 239, n. 4838, p. 401–404, 1988. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023848298&partnerID=tZOTx3y1>>. Acesso em: 6 jul. 2012.

BERRY, M.; BRIGHTLING, C.; PAVORD, I.; WARDLAW, A. TNF-alpha in asthma. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 279–82, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475560>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64–102, 1996.

BLANCO-FAVELA, F.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; HUERTA-VILLALOBOS, Y. R.; MONTOYA-DÍAZ, E.; CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L.; ZENTENO-GALINDO, E. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. **Boletín Medicina Hospitalar Infantil Mexico**, v. 69, n. 5, p. 329–336, 2012.

BRAND, J.-M.; FROHN, C.; CZIUPKA, K.; BROCKMANN, C.; KIRCHNER, H.; LUHM, J. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. **European Cytokine Network**, v. 15, n. 2, p. 99–104, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319167>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

BRIDGES, R. S.; FELICIO, L. F.; PELLERIN, L. J.; STUER, A. M.; MANN, P. E. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. **Life Sciences**, v. 53, n. 5, p. 439–445, 1993.

BUONFIGLIO, D. C.; RAMOS-LOBO, A. M.; SILVEIRA, M. A.; FURIGO, I. C.; HENNIGHAUSEN, L.; FRAZÃO, R.; DONATO, J. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. **Hormones and Behavior**, v. 71, p. 60–8, maio 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X15000549>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

CAMORATTO, A. M.; GRANDISON, L. Platelet-activating factor stimulates prolactin release from dispersed rat anterior pituitary cells in vitro. **Endocrinology**, v. 124, n. 3, p. 1502–1506, 1989.

CARIÑO, C.; DÍAZ, L.; LARREA, F.; MÉNDEZ, I.; CARIÑO, C.; DÍAZ, L. Conceptos actuales sobre fisiología de la prolactina: variantes moleculares y mecanismos de acción. **Revista Investigación Clínica**, v. 45, n. 4, p. 375–86, 1993.

CARR, D. J.; BLALOCK, J. E. From the neuroendocrinology of lymphocytes toward a molecular basis of the network theory. **Hormone Research**, v. 31, n. 1-2, p. 76–80, 1989.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MAIORKA, P. C.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. Prolactin differentially modulates the

macrophage activity of lactating rats: possible role of reproductive experience.

Journal of Reproductive Immunology, v. 89, n. 1, p. 38–45, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420738>>. Acesso em: 20 out. 2013.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; TEODOROV, E.; NASELLO, A. G.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. Reproductive experience modifies dopaminergic function, serum levels of prolactin, and macrophage activity in female rats. **Life sciences**, v. 81, n. 2, p. 128–36, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574628>>. Acesso em: 20 out. 2013.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; NASELLO, A. G.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. In vitro macrophage activity: biphasic effect of prolactin and indirect evidence of dopaminergic modulation. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 2, p. 131–9, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679052>>. Acesso em: 2 set. 2013.

CHAMPION M. C. Minireview domperidone. **General Pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 499–505, 1988.

CHIKANZA, I. C. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, p. 119–30, 22 jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415600>>. Acesso em: 1 jan. 2012.

CHIKANZA, I. C.; PETROU, P.; CHROUSOS, G.; KINGSLEY, G.; PANAYI, G. S. EXCESSIVE AND DYSREGULATED SECRETION OF PROLACTIN IN RHEUMATOID ARTHRITIS: IMMUNOPATHOGENETIC AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS. **Rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 445–448, 1993.

CHOY, D. F.; HART, K. M.; BORTHWICK, L. A.; SHIKOTRA, A.; NAGARKAR, D. R.; SIDDIQUI, S.; JIA, G.; OHRI, C. M.; DORAN, E.; VANNELLA, K. M.; BUTLER, C. A.; HARGADON, B.; SCIURBA, J. C.; GIESECK, R. L.; THOMPSON, R. W.; WHITE, S.; ABBAS, A. R.; JACKMAN, J.; WU, L. C.; EGEN, J. G.; HEANEY, L. G.; RAMALINGAM, T. R.; ARRON, J. R.; WYNN, T. A.; BRADDING, P. T H 2 and T H 17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 301, p. 301, 2015.

CORBACHO, A. M.; MACOTELA, Y.; NAVA, G.; EISERICH, J. P.; CROSS, C. E.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. **FEBS Letters**, v. 544, n. 1-3, p. 171–175, jun. 2003.

CORREALE, J.; YSRRAELIT, M. C.; GAITN, M. I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. **Brain**, v. 132, p. 1146–1160, 2009.

COSÍO, B. G.; TORREGO, A.; ADCOCK, I. M. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. **Archivos de Bronconeumología**, v. 41, n. 1, p. 34–41, 1 fev. 2005.

COSTANZA, M.; BINART, N.; STEINMAN, L.; PEDOTTI, R. Prolactin: A versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmunity Reviews**, v.

14, n. 3, p. 223–230, 2015.

CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, a G.; HUCKE, E. E.; FELICIO, L. F. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, n. 7, p. 681–93, out. 1999.

DE LIMA, W. T.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. **European Journal of Pharmacology**, v. 213, n. 1, p. 63–70, 17 mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1323472>>. Acesso em: 1 jan. 2012.

DE OLIVEIRA, A. P. L.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; HAMASATO, E. K.; QUINTEIRO-FILHO, W.; HEBEDA, C. B.; DAMAZO, A. S.; FARSKY, S. H. P.; TAVARES-DE-LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Amphetamine modulates cellular recruitment and airway reactivity in a rat model of allergic lung inflammation. **Toxicology Letters**, v. 200, n. 1-2, p. 117–23, 15 jan. 2011.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 785–798, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00036-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00036-3)>. Acesso em: 1 jan. 2013.

DÍAZ GONZÁLEZ, F. H.; CERONI DA SILVA, S. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2006.

DICARLO, R.; MELI, R.; MUCCIOLI, G. Effects of prolactin on rat paw oedema induced by different irritants. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 87–92, maio 1992.

DRAGO, F. Prolactin and sexual behavior: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 8, n. 4, p. 433–439, dez. 1984.

DRAGO, F.; PELLEGRINI-QUARANTOTTI, B.; SCAPAGNINI, U.; GESSA, G. L. Short-term endogenous hyperprolactinaemia and sexual behavior of male rats. **Physiology & Behavior**, v. 26, n. 2, p. 277–279, fev. 1981.

FARON-GÓRECKA, A.; KUŚMIDER, M.; KOLASA, M.; ZURAWEK, D.; GRUCA, P.; PAPP, M.; SZAFRAN, K.; SOLICH, J.; PABIAN, P.; ROMAŃSKA, I.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. Prolactin and its receptors in the chronic mild stress rat model of depression. **Brain Research**, v. 1555, p. 48–59, 2014.

FELICIO, L. F.; BRIDGES, R. S. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in p. 133–138, 1992a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Domperidone+induces+a+probenecid-sensitive+rise+in+immunoreactive+prolactin+in+cerebroventricular+perfusates+in+female+rats.+Brain+Research%2C+573%3A+133-138.>>. Acesso em: 1 jan. 2014.

FELICIO, L. F.; BRIDGES, R. S. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. **Brain**

Research, v. 573, n. 1, p. 133–8, 21 fev. 1992b.

FERRARIS, J.; BERNICHTEIN, S.; PISERA, D.; GOFFIN, V. Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. **Neuroendocrinology**, v. 98, p. 171–179, 2013.

FISH R. Pharmacology of Injectable Anesthetics. In: DENNIS F. KOHN, SALLY K. WIXSON, W. J. W. AND G. J. B. (Ed.). **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. 1997. ed. Pensilvania: Academic Press, 1997. p. 28.

FOTI, A.; KIMURA, S.; DEQUATTRO, V.; LEE, D. Liquid-chromatographic measurement of catecholamines and metabolites in plasma and urine. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 2209–2213, 1987.

GÓMEZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J. a; GASCÓN, M.; ZARATE, J. J.; ALVAREZ, F.; COUTO, C. G. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259–63, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023375>>. Acesso em: 20 out. 2013.

HALEY, K. J.; SUNDAY, M. E. Neuroimmunologic control of asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 22, p. 807–825, 2002.

HAMASATO, E. K.; DE LIMA, A. P. N.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, p. 1–9, 11 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929194>>. Acesso em: 12 out. 2014.

HAYASHI, N.; YOSHIMOTO, T.; IZUHARA, K.; MATSUI, K.; TANAKA, T.; NAKANISHI, K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-gamma and IL-13 production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 37, p. 14765–70, 11 set. 2007.

HIOCO, D.; SAMTER, M.; KARK, R. M.; BEST, W. R. The response of patients with bronchial asthma to epinephrine and to adreno-corticotrophic hormone. **The Endocrine Society**, v. 11, n. April, p. 395–407, 1951.

HITNER, H.; NAGLE, G. Pharmacology: An Introduction. In: HITNER, H.; NAGLE, G. (Ed.). **Pharmacology**. 6th. ed. New York: Kenneth S. Kasse Jr, 2012. p. 901.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 310–317, 15 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828189>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

JARA, L. J.; LAVALLE, C.; FRAGA, A.; GÓMEZ-SANCHEZ, C.; SILVEIRA, L. H.; MARTINEZ-OSUNA, P.; GERMAIN, B. F.; ESPINOZA, L. R.; JARA, B. L. J.; LAVALLE, C.; GERMAIN, B. F.; ESPINOZA, L. R. Prolactin, Immunoregulation, and Autoimmune Diseases. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n. 5, p. 273–284, abr. 1991. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025863722&partnerID=tZOTx3y1>>. Acesso em: 22 set. 2015.

JARA, L. J.; MEDINA, G.; SAAVEDRA, M. a; VERA-LASTRA, O.; NAVARRO, C. Prolactin and autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 40, n. 1, p. 50–9, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911311>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

JIANG, C.-L.; LIU, L.; LI, Z.; BUTTGEREIT, F. The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. **Steroids**, v. 102, p. 27–31, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X15001920>>.

KOHM, A. P.; TANG, Y.; SANDERS, V. M.; JONES, S. B. Activation of antigen-specific CD4⁺ Th2 cells and B cells in vivo increases norepinephrine release in the spleen and bone marrow. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 725–733, 2000.

LEE, Y.-C.; JOGIE-BRAHIM, S.; LEE, D.-Y.; HAN, J.; HARADA, A.; MURPHY, L. J.; OH, Y. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) blocks the effects of asthma by negatively regulating NF- κ B signaling through IGFBP-3R-mediated activation of caspases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 20, p. 17898–909, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3093865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 mar. 2014.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181–90, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067209>>. Acesso em: 2 set. 2013.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; CORREA-COSTA, M.; DURÃO, A. C. C. D. S.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; BERTONI, J. D. A.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; CÂMARA, N. O. S.; MARCOURAKIS, T.; TAVARES-DE-LIMA, W. Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 3, p. 278–85, 15 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983654>>. Acesso em: 15 out. 2013.

MACOTELA, Y.; MENDOZA, C.; CORBACHO, A. M.; COSÍO, G.; EISERICH, J. P.; ZENTELLA, A.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. 16K prolactin induces NF- κ B activation in pulmonary fibroblasts. **Journal of Endocrinology**, v. 175, n. November, p. 13–18, 2002.

MÄKELÄ, A. K.; BORISH L; DAKHAMA A; LOADER J; JOETHAM A; XING Z; JORDANA M; LARSEN GL; GELFAND EW. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 6007–12, 23 maio 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MATERA, L.; CESANO, A.; BELLONE, G.; OBERHOLTZER, E. Modulatory Effect of Prolactin on the Resting and Activity of T , 9 , and NK Lymphocytes. **Brain**,

Behavior, and Immunity, p. 409–417, 1992.

MATERA, L.; MORI, M.; GEUNA, M.; BUTTIGLIERI, S.; PALESTRO, G. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, n. 1, p. 47–55, 1 set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969181>>. Acesso em: 1 jan. 2012.

MAUAD, T.; LOPES DE SOUZA, A. S.; NASCIMENTO SALDIVA, P. H.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **Journal Pneumologia**, v. 26, n. 2, p. 91–98, 2000.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 79–133, 1997.

MELI, R.; GUALILLO, O.; MATTACE, G.; DI CARLO, R. For the involvement of prolactin inflammatory response. **Life Science**, v. 53, p. 105–110, 1993a.

MELI, R.; GUALILLO, O.; RASO, G. M.; DI CARLO, R. Further evidence for the involvement of prolactin in the inflammatory response. **Life Science**, v. 53, n. 6, p. 105–110, jan. 1993b.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, I. C.; CARIÑO, C.; DÍAZ, L. La prolactina en el sistema inmunológico: Aspectos de síntesis y efectos biológicos. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 57, p. 447–456, 2005.

MONASTERIO, N.; VERGARA, E.; MORALES, T. Hormonal influences on neuroimmune responses in the CNS of females. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 7, n. January, p. 8, jan. 2013.

MONTES DE OCA, P.; MACOTELA, Y.; NAVA, G.; LÓPEZ-BARRERA, F.; DE LA ESCALERA, G. M.; CLAPP, C. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 85, p. 633–642, 2005.

MÜLLER, T.; VIEIRA, R. P.; GRIMM, M.; DÜRK, T.; CICKO, S.; ZEISER, R.; JAKOB, T.; MARTIN, S. F.; BLUMENTHAL, B.; SORICHTER, S.; FERRARI, D.; DI VIRGILLIO, F.; IDZKO, M. A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 4, p. 456–64, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508067>>. Acesso em: 12 out. 2014.

MUNITZ, A.; BRANDT, E. B.; MINGLER, M.; FINKELMAN, F. D.; ROTHENBERG, M. E. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7240–5, 20 maio 2008.

NAGATA, A.; YAMADA, Y.; NAKAMURA, A.; ASANO, T.; YAMADA, T.; ISAKA, M.; ITOH, M. Alteration of endogenous corticosteroids and catecholamines in allergen-induced eosinophilic inflammation in Brown Norway rats. **Allergology International**,

v. 48, n. 3, p. 209–215, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1592.1999.00136.x>>.

NAKAYA, M.; XIAO, Y.; ZHOU, X.; CHANG, J.-H.; CHANG, M.; CHENG, X.; BLONSKA, M.; LIN, X.; SUN, S.-C. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 692–705, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4074507&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NASELLO, A. G.; VANZELER, M. L. .; MADUREIRA, E. H.; FELICIO, L. F. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 1089–94, dez. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408218>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

NEILL, J. D. **Physiology of reproduction**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2006. v. 10

NISWENDER, G. D.; MIDGLEY, A. R.; MEITES, J.; ELLIS, S. Radioimmunoassay of rat prolactin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 130, n. 3, p. 793–797, jan. 1969.

OCHOA-AMAYA, J. E.; HAMASATO, E. K.; TOBARUELA, C. N.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; ANSELMO FRANCI, J. A.; PALERMO-NETO, J.; GREIFFO, F. R.; DE BRITTO, A. A.; VIEIRA, R. P.; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; MASSOCO SALLES-GOMES, C. de O.; FELICIO, L. F. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life sciences**, v. 142, p. 66–75, 15 out. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320515300424>>. Acesso em: 20 out. 2015.

OCHOA-AMAYA, J. E.; MALUCELLI, B. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F.; CARVALHO-FREITAS, M. I. R. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 6, p. 386–95, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516720>>. Acesso em: 31 out. 2013.

OCHOA-AMAYA, J. E.; MALUCELLI, B. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F.; CARVALHO-FREITAS, M. I. R. Dual effects of hyperprolactinemia on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 4, p. 245–53, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430396>>. Acesso em: 31 out. 2013.

OLIVEIRA, A. P. L. de; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; LIMA, W. T. De; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1164–71, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602061>>. Acesso em: 2 set. 2013.

ORBACH, H.; SHOENFELD, Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 8, p. 537–42, set. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854745>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

ORBACH, H.; ZANDMAN-GODDARD, G.; BOAZ, M.; AGMON-LEVIN, N.; AMITAL, H.; SZEKANECZ, Z.; SZUCS, G.; ROVENSKY, J.; KISS, E.; DORIA, A.; GHIRARDELLO, A.; GOMEZ-ARBESU, J.; STOJANOVICH, L.; INGEGNOLI, F.; MERONI, P. L.; ROZMAN, B.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 42, n. 2, p. 189–98, abr. 2012.

OYOSHI, M. K.; BRYCE, P.; GOYA, S.; PICHAVANT, M.; UMETSU, D. T.; OETTGEN, H. C.; TSITSIKOV, E. N. TNF receptor-associated factor 1 expressed in resident lung cells is required for the development of allergic lung inflammation. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1878–1885, 2008.

PACKARD, K. A.; KHAN, M. M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 7, p. 909–20, jul. 2003.

PEREIRA, A.; SUAREZ, P.; LÓPEZ-RINCÓN, G.; NERI, P. A. M.; ESTRADA-CHÁVEZ, C.; CLAPP, C.; THEBAULT, S.; MACOTELA, Y.; MORENO, B.; TRIEBEL, J.; MARTÍNEZ, G.; ESCALERA, D. Recent Advances in Prolactin Research. **Recent Advances in Prolactin Research, Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 846, p. 83–95, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12114-7>>.

REYES-GARCÍA, M. G.; GARCÍA-TAMAYO, F. A neurotransmitter system that regulates macrophage pro-inflammatory functions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 216, n. 1-2, p. 20–31, 30 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732963>>. Acesso em: 9 ago. 2013.

RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHOEDER, H. W.; FREW, A. J.; WEYAND, C. M. **Clinical immunology principles and practice**. 3. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health, 2008.

RUSSELL, D. H.; MATRISIAN, L.; KIBLER, R.; LARSON, D. F.; POULOS, B.; MAGUN, B. E. Prolactin receptors on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 121, n. 3, p. 899–906, jun. 1984.

RUSSO, C.; POLOSA, R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. **Clinical Science**, v. 109, n. 2, p. 135–142, 2005.

SALVATO, G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. **Thorax**, v. 56, n. 12, p. 902–6, dez. 2001.

SAUL, A. N.; OBERYSZYN, T. M.; DAUGHERTY, C.; KUSEWITT, D.; JONES, S.; JEWELL, S.; MALARKEY, W. B.; LEHMAN, A.; LEMESHOW, S.; DHABHAR, F. S. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 23, p. 1760–1767, 2005.

SILVA, M. R. P.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 461–468, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305701004713>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

SILVA, V. R.; MARCONDES, P.; SILVA, M.; VILLAVERDE, A. B.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; VIEIRA, R. P.; AIMBIRE, F.; DE OLIVEIRA, A. P. L. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 194, p. 37–48, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904814000093>>. Acesso em: 22 maio. 2014.

STERNBERG, E. M. EUROSTERONE MEETING Neuroendocrine regulation of autoimmune / inflammatory disease. **Journal of Endocrinology**, v. 169, p. 429–435, 2001.

SVARE, B.; BARTKE, A.; DOHERTY, P.; MASON, I.; MICHAEL, S. D.; SMITH, M. S. Hyperprolactinemia suppresses copulatory behavior in male rats and mice. **Biology of Reproduction**, v. 21, n. 2, p. 529–535, 1979.

TEMPL, E.; KOELLER, M.; RIEDL, M.; WAGNER, O.; GRANINGER, W.; LUGER, A. Anterior pituitary function in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 4, p. 350–356, 1996. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029868687&partnerID=tZOtx3y1>>.

TIAN, W.; YANG, Y.; SHANG, Y.; CAI, X.; CHEN, W.; ZHANG, H. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D 3 in the treatment of asthma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 1762–1769, 2014.

TOMITA, K.; LIM, S.; HANAZAWA, T.; USMANI, O.; STIRLING, R.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. **Clinical Immunology**, v. 102, n. 3, p. 258–266, 2002.

TRIEBEL, J.; BERTSCH, T.; BOLLHEIMER, C.; RIOS-BARRERA, D.; PEARCE, C. F.; HÜFNER, M.; MARTINEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, n. AUGUST, p. ajpregu.00256.2015, 2015. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00256.2015>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

VERA-LASTRA, O.; JARA, L. J.; ESPINOSA, L. R. Prolactin and Autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, p. 360–364, 2002.

VERHASSELT, V. Neonatal Tolerance under Breastfeeding Influence: The Presence of Allergen and Transforming Growth Factor- β in Breast Milk Protects the Progeny from Allergic Asthma. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, p. 16–20, 2010.

VIEIRA, R. P.; TOLEDO, A. C. De; FERREIRA, S. C.; SANTOS, Â. B. G. Dos; MEDEIROS, M. C. R.; HAGE, M.; MAUAD, T.; MARTINS, M. D. A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C. R. F. De. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 175, n. 3, p. 383–389, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2011.01.002>>.

VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant: Augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1059–1069, 2005.

VRUGT, B.; WILSON, S.; BRON, A.; HOLGATE, S. T.; DJUKANOVIC, R.; AALBERS, R. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. **The European Respiratory Journal**, v. 15, n. 6, p. 1014–21, jun. 2000.

WALLIS, M. The molecular evolution of pituitary hormones. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 50, n. 1, p. 35–98, 1975.

WANG, J. H.; DEVALIA, J. L.; SAPSFORD, R. J.; DAVIES, R. J. Effect of corticosteroids on release of RANTES and sICAM-1 from cultured human bronchial epithelial cells, induced by TNF-alpha. **The European Respiratory Journal**, v. 10, n. 4, p. 834–840, 1997.

WEIZMAN, R.; BESSLER, H. Cytokines: stress and immunity: an overview. In: PLOTNIKOFF, N. P.; FAITH, R. E.; MURGO, A. J.; GOOD, R. A. (Ed.). **Cytokines: Stress and Immunity**. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 1999. p. 345.

WELNIAK, L. A.; RICHARDS, S. M.; MURPHY, W. J. Effects of prolactin on hematopoiesis. **Lupus**, v. 10, n. 10, p. 700–5, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11721696>>.

WELNIAK, L. A.; TIAN, Z. G.; SUN, R.; KELLER, J. R.; RICHARDS, S.; RUSCETTI, F. W.; MURPHY, W. J. Effects of growth hormone and prolactin on hematopoiesis. **Leukemia & Lymphoma**, v. 38, n. 5-6, p. 435–45, ago. 2000.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W. S.; CHAN, C. H. S.; HO, a. S. S.; HUI, D. S. C.; LAM, C. W. K. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 125, n. 2, p. 177–83, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1906135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

YU-LEE, L. Y.; LUO, G.; MOUTOUSSAMY, S.; FINIDORI, J. Prolactin and growth hormone signal transduction in lymphohaemopoietic cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 1067–1075, 1998.

YU-LEE, L.-Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 435–55, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017556>>. Acesso em: 3 jan. 2013.

ZHOU, J.; LIU, D. F.; LIU, C.; KANG, Z. M.; SHEN, X. H.; CHEN, Y. Z.; XU, T.;

JIANG, C. L. Glucocorticoids inhibit degranulation of mast cells in allergic asthma via nongenomic mechanism. **Allergy: european journal of allergy and clinical immunology**, v. 63, n. 9, p. 1177–1185, 2008.

ZHOU, Y.; WANG, G. F.; YANG, L.; LIU, F.; KANG, J. Q.; WANG, R. L.; GU, W.; WANG, C. Y. Treatment with 1, 25 (OH)₂D₃ induced HDAC2 expression and reduced NF- κ B p65 expression in a rat model of OVA-induced asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 00, p. 1–11, 2015.