UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-FMRP
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

ALINE BARBOSA RIBEIRO

**Efeito protetor do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal
induzida pela endotoxemia**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

ALINE BARBOSA RIBEIRO

**Efeito protetor do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal induzida
pela endotoxemia**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – USP para obtenção do título de Doutora
em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ribeiro, Aline Barbosa

Efeito protetor do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal induzida pela endotoxemia. Ribeirão Preto, 2018.

176 p. : 24 fig.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Franci, Celso R.

1. Estradiol. 2. Sepsis 3. *Tight junctions* 4. Translocação bacteriana 5. Neutrófilos 6. Mastócitos 7. Citocinas 8. Permeabilidade intestinal.

FICHA DE APROVAÇÃO

Aline Barbosa Ribeiro

Efeito protetor do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal induzida pela endotoxemia.

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Instituição: UNIFESP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof^a. Dr^a. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura:_____

*Dedico aos meus pais queridos, **Luzia e Lacerda**, aos meus irmãos **Alex, Adriana e Alexsander**, e à maior alegria vinda durante meu doutorado: minha sobrinha e afilhada, **Sofia**.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, meu maior alicerce, que me concedeu força, perseverança e retidão para o término deste trabalho.

Aos meus pais, *Luzia e Lacerda*, pelo dom da vida, pelo apoio incondicional e pelo amor único e contínuo. Obrigada meus amores, por não medirem esforços para que eu tivesse a melhor formação educacional, moral e ética, primordiais para chegar até esta fase importante da minha vida.

À minha irmã *Adriana*, por ser minha razão nos momentos de desespero, por ser minha amiga nos dias bons e maus e por ser minha segunda mãe durante toda minha vida. Agradeço também por ter me presenteado com a minha sobrinha e afilhada linda: *Sofia*. Soso, a dinda te ama demais.

Ao meu irmãozinho *Alexsander*, por ter compartilhado comigo durante parte do meu doutorado minhas inseguranças e por me dar tanto carinho, amor e doçura.

Ao meu irmão *Alex*, pelo incentivo e por ser um exemplo para mim de excelência profissional, amo você Lekim.

Ao *Felipe* por todo companheirismo na reta final do doutorado. Obrigada por entender e apoiar minha ausência e impaciência. Amo você.

Ao meu cunhado *Wainer*, pelos finais de semana de muita conversa e comida boa, por ser tão gentil e prestativo comigo. À minha cunhada *Mari*, por todo auxílio durante o meu doutorado, obrigada por ser tão doce comigo.

Ao *prof. Dr. Rafael Saia* pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança em mim depositada, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados que permitiram a conclusão deste trabalho. Obrigada por todas as conquistas proporcionadas nesses anos de convivência e trabalho.

Agradeço imensamente ao *prof. Dr. Celso Rodrigues Franci* por todo apoio científico que me deu ao longo de toda a realização do trabalho e o empenho fundamental demonstrado na fase de finalização da tese. Obrigada por todo respeito, confiança, críticas e incentivo.

À *Profª. Drª. Janete Franci*, por ter me iniciado à vida científica. Sou grata pelas oportunidades e conhecimentos obtidos durante todos os anos que estive ao seu lado.

Ao *Humberto Giusti* pela convivência agradável, por ser tão solícito e por todos conselhos que levarei para minha vida pessoal e profissional. Obrigada pelo suporte técnico impecável.

À *Profª. Drª. Leda Menescal de Oliveira* pelo respeito e carinho depositado à mim, disponibilização da infraestrutura e parceria em diferentes projetos.

Ao meu amigo de pós-graduação e da vida *Procópio Filho*, por ser a melhor pessoa que pude conviver durante toda minha vida. Obrigada por me aguentar todos os dias, sendo nos momentos de alegria ou de tristeza. Amo você, meu amigo. À minha amiga amada *Aninha Omoto*, por compartilhar comigo todos os momentos na pós-graduação e fora dela. Tenho muito carinho por você e jamais esquecerei tudo o que vivemos até aqui.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós. ”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço aos professores participantes da banca examinadora pela disponibilidade em participarem e contribuirém neste momento tão importante e esperado: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, Prof. Dr. Reinaldo Salomão, Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon e Profª. Drª. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

À *Marininha* e à *Mariulzinha* pela amizade, apoio e carinho durante esses 4 anos de trabalho conjunto.

Ao *Rubinho* pelos momentos bons na histologia. Obrigada por me auxiliar com as minhas lâminas.

À *Maria Dolores Seabra Ferreira* e ao *José Augusto Maulim* do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos por todo auxílio na microscopia eletrônica de transmissão.

Às minhas amigas *Gabriela Campos* e *Day* pelos conselhos e amizade.

Aos meus companheiros do Departamento de Fisiologia: *Luanete, Nathália Camin, Ludmila, Junia, Mateus, George, Amandinha, Pedro, Fernanda, Fernanda Vechiato, Juliana, Ricardo, Lucas, Lucas Almeida, Gean, Priscila, Natany, Camila, Alexandra, Cesinha, Camilla, Hadder, Heloísa, Larissa e Thaís*.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Fisiologia: *Elisa, Cláudia, Fernando e Igor*, pelo suporte, paciência, educação e respeito.

Ao *Léo* do Biotério pelo auxílio no cuidado com minhas ratinhas.

À *FAPESP, CNPq e CAPES*, por financiarem este trabalho.

RESUMO

RIBEIRO, AB. **Efeito protetor do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal induzida pela endotoxemia.** 2018. 176 páginas. Tese de doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A injúria ao epitélio intestinal é uma das mais importantes complicações da sepse, associada à perda da integridade da barreira epitelial intestinal pela alteração da expressão de proteínas constituintes das *tight junctions* (TJ). Os dois subtipos de receptores de estrógeno são normalmente expressos na mucosa intestinal, sendo responsável pela manutenção da arquitetura do epitélio intestinal. Além disso, diversos modelos experimentais fisiopatológicos têm atribuído um papel imunomodulador ao estradiol. O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do estradiol na modulação da resposta inflamatória e na proteção da barreira epitelial intestinal durante a inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo (LPS; 1,5 mg/kg, i.v.) em ratas. As ratas foram ovariectomizadas e mantidas para recuperação durante 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram tratadas com cipionato de estradiol (50 ou 100 µg/kg, s.c.) ou óleo. Após 6h da indução da endotoxemia, foram avaliadas a permeabilidade intestinal pela injeção de dextrana FITC no íleo ou cólon, a translocação bacteriana nos linfonodos mesentéricos e as citocinas no plasma e na mucosa intestinal. Adicionalmente, a infiltração de mastócitos e neutrófilos foi avaliada no íleo e no cólon, a integridade das TJ e junções aderentes (JA) foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão, e expressão das proteínas (occludina, claudina-1, JAM-A, E-caderina) bem como suas localizações. Nossos resultados demonstraram que o estradiol reduziu a permeabilidade intestinal bem como preveniu a translocação bacteriana nos linfonodos mesentéricos induzidas pela administração de LPS. Em ratas endotoxêmicas tratadas com estradiol, as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β), migração de neutrófilos (atividade da mieloperoxidase) e degranulação dos mastócitos no íleo e no cólon foram reduzidas. O estradiol também reverteu a disfunção da barreira epitelial induzida pelo LPS, aumentando a expressão das proteínas das TJ, reduzindo a abertura das TJ e JA e atenuando os danos histológicos. Em conjunto, os resultados sugerem um papel protetor do estradiol, prevenindo a disfunção da barreira epitelial

intestinal induzida pela inflamação sistêmica, possivelmente modulando a resposta inflamatória e a liberação de proteases de mastócitos.

Palavras-chaves: estradiol, sepse, *tight junctions*, translocação bacteriana, neutrófilos, mastócitos, citocinas, permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

RIBEIRO, AB. **Protective effect of estradiol on intestinal epithelial barrier dysfunction induced by endotoxemia.** 2018. 176 pages. PhD thesis- Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo.

Intestinal injury is one of the most important complications of sepsis, associated with the loss of integrity of the intestinal epithelial barrier due to the alteration of the expression of proteins that constitute the tight junctions (TJ). The two subtypes of estrogen receptors are normally expressed in the intestinal mucosa, being responsible for maintaining the architecture of intestinal epithelium. Moreover, several experimental pathophysiological models have been attributed the immunomodulatory role for the estradiol. The aim of the present study was to evaluate the role of estradiol in the modulation of the inflammatory response and the protection of the intestinal epithelial barrier during systemic inflammation induced for lipopolysaccharide (LPS, 1.5 mg / kg, i.v.) in rats. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 µg/kg, subcutaneous) or corn oil. At 6h after of endotoxemia induction, were evaluated the intestinal permeability by injecting FITC dextran into the ileum or colon, bacterial translocation in the mesenteric lymph nodes and plasma and intestinal mucosa cytokines levels. In addition, the infiltration of mast cells and neutrophils was evaluated in the ileum and colon, the integrity of the TJ and adherent junctions (JA) integrity was determined by transmission electron microscopy, and the protein expression (occludin, claudin-1, JAM-A, E-cadherin) as well as their localization. Our results demonstrated that estradiol reduced intestinal permeability as well as prevented bacterial translocation in the mesenteric lymph nodes induced by the LPS administration. In the endotoxemic rats treated with estradiol, the concentration of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β), neutrophil infiltration (myeloperoxidase activity), and mast cells degranulation were reduced in the ileum and colon. Estradiol also reverted the LPS-induced epithelial barrier dysfunction, increasing the expression of the TJ proteins, reducing TJ and AJ opening and attenuating the histological damages. Together, these results suggest a protective role for estradiol, attenuating damage to the intestinal epithelium induced by systemic inflammation, possibly due to modulation of the inflammatory response and the release of mast cells proteases.

Key-words: estradiol, sepsis, tight junctions, bacterial translocation, neutrophils, mast cells, cytokines, intestinal permeability.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Microscopia eletrônica e desenho representativo da localização das *Tight junctions*, das junções aderentes e dos desmossomos29

Resultados

Figura 1: Efeito do tratamento com cipionato de estradiol no peso relativo uterino e nas concentrações plasmáticas do estradiol.....56

Figura 2: O estradiol reduz as concentrações plasmáticas de IL-1 β e aumenta as concentrações plasmáticas de IL-10 e corticosterona durante a endotoxemia. ...58

Figura 3: O estradiol aumenta a expressão de ER β no íleo e no cólon durante a endotoxemia.....60

Figura 4: O estradiol reduz a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana durante a endotoxemia.....61

Figura 5: O estradiol diminui o escore de lesão induzido pela endotoxemia no íleo.63

Figura 6: O estradiol diminui o escore de lesão induzido pela endotoxemia no cólon.64

Figura 7: O estradiol modula a expressão das proteínas constituintes das TJ na mucosa ileal durante a endotoxemia.....66

Figura 8: O estradiol modula a expressão das proteínas constituintes das TJ na mucosa colônica durante a endotoxemia67

Figura 9: O estradiol previne a internalização das proteínas das TJ e JA no íleo durante a endotoxemia68

Figura 10: O estradiol previne a internalização das proteínas das TJ e JA no íleo durante a endotoxemia.....69

Figura 11: O estradiol atenua a abertura das TJ e JA no íleo durante a endotoxemia.70

Figura 12: O estradiol atenua a abertura das TJ e JA no cólon durante a endotoxemia.....71

Figura 13: O estradiol diminui a síntese de citocinas pró-inflamatórias na mucosa ileal durante a endotoxemia.73

Figura 14: O estradiol diminui a síntese de citocinas pró-inflamatórias na mucosa colônica durante a endotoxemia.....	74
Figura 15: O estradiol reduz a expressão de NF- κ B p65 no íleo e no cólon e aumenta a expressão de I κ B no íleo durante a endotoxemia	76
Figura 16: O estradiol diminui a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na mucosa ileal e colônica induzida pela endotoxemia	77
Figura 17: O estradiol não altera o número total, porém reduz a degranulação dos mastócitos no íleo durante a endotoxemia	79
Figura 18: O estradiol reduz a expressão de proteases de mastócitos no íleo durante a endotoxemia	80
Figura 19: O estradiol não altera o número total, porém reduz a degranulação dos mastócitos no cólon durante a endotoxemia.	82
Figura 20: O estradiol reduz a expressão de proteases de mastócitos no cólon durante a endotoxemia.....	83
Figura 21: A administração de doxantrazole reduz a permeabilidade intestinal induzida pela endotoxemia	84
Figura 22: O estradiol reduz a expressão da caspase-3 ativa no íleo e no cólon induzida pela endotoxemia	85
Figura 23: Esquema hipotético do possível mecanismo de ação do estradiol na proteção do epitélio intestinal em condição de endotoxemia.....	100

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
CLP	ligadura e perfuração cecal
ELISA	ensaio imunoenzimático
G.A.L.T	tecido linfoide associado ao intestino
HIV	vírus da imunodeficiência humana
i.p.	injeção intraperitoneal
i.v.	injeção intravenosa
IFN	interferon
IκB	inibidor de κ B
IL	interleucina
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
JA	Junções aderentes
JAM	moléculas de adesão juncional
LBP	proteína ligadora de LPS
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD-2	proteína de diferenciação mielóide 2
MPO	enzima mieloperoxidase
Myd88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NF-κB	fator nuclear κ B
OVX	Ovariectomizadas tratadas com óleo
OVX+E2	Ovariectomizadas tratadas com estradiol
PAR-2	receptor ativado por protease
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TJ	Tight junctions
TLR	receptor Toll-like
TNF	fator de necrose tumoral
ZO	<i>zonula occludens</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 SEPSE	19
1.1.1 Definição da sepse	19
1.1.2 Dados epidemiológicos relevantes	20
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	21
1.2.1 Lipopolissacarídeo (LPS)	23
1.2.2 O intestino como “motor da sepse”	25
1.3 MORFOLOGIA DA BARREIRA EPITELIAL	26
1.3.1 Componentes extracelulares	236
1.3.2 Componentes celulares	25
1.3.3 Sistema Imune da mucosa intestinal	30
1.3.4 Integridade do epitélio intestinal	35
1.3.5 Mediadores inflamatórios e integridade das TJ e JA intestinais	35
1.4 AÇÃO DO ESTRADIOL NA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA	21
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ANIMAIS	44
3.2 ANESTESIA E CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS	44
3.3 OVARECTOMIA	44
3.4 TRATAMENTO HORMONAL	45
3.5 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR	45
3.6 COLETA DE SANGUE TOTAL	45
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
3.8 PERMEABILIDADE INTESTINAL	47
3.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	48
3.10 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS	48
3.11 ATIVIDADE DA ENZIMA MPO	49
3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA	50
3.13 DOSAGEM HORMONAL	51
3.14 WESTERN BLOT	51
3.15 IMUNOFLUORESCÊNCIA	52
3.16 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	53
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4 RESULTADOS	56
4.1 EFEITO DO ESTRADIOL NA PRESERVAÇÃO DA ARQUITETURA DO EPITÉLIO INTESTINAL	56
4.2 ER α E ER β SÃO EXPRESSOS NAS MUCOSAS ILEAL E COLÔNICA E O ESTRADIOL PREVINE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDUZIDOS PELA ENDOTOXEMIA	59
4.3 EFEITO DO ESTRADIOL NA PRESERVAÇÃO DA ARQUITETURA DO EPITÉLIO INESTINAL	62
4.4 O ESTRADIOL PREVINE A ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO, LOCALIZAÇÃO E ABERTURA DAS TJ E JÁ NA ENDOTOXEMIA	62
4.5 O EFEITO DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS MUCOSAS DO ÍLEO E DO CÓLON DURANTE A ENDOTOXEMIA	62

4.6 O ESTRADIOL ALTERA A APOPTOSE CELULAR NO ÍLEO E NO CÓLON	59
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
8 ANEXO	130

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

1.1.1 Definição da sepse

O termo sepse origina-se do vocabulário grego, que significa putrefação. Ao longo dos últimos 20 anos, a definição, o diagnóstico e as características demográficas da sepse evoluíram significativamente. As diferentes definições de sepse são baseadas na sintomatologia clínica e são de grande relevância para o desenvolvimento de pesquisas. A primeira conferência de Consenso entre a *Critical Care Medicine Society* e o *American College of Chest Physicians* foi realizada em Chicago, em agosto de 1991, a fim de padronizar e simplificar um conjunto conceitual e prático de definição da resposta inflamatória sistêmica à infecção e à disfunção de órgãos (Bone *et al.*, 1992).

A sepse foi definida como um sinal associado de infecção (provável ou confirmada) associada à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês *SIRS*). A *SIRS* por sua vez, consiste de uma ou mais manifestações clínicas resultantes da ativação do sistema imune inato, na presença ou não de condições infecciosas. Os seus principais sinais e sintomas incluem: alterações na temperatura corporal, como febre ($>38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$); taquicardia, taquipnéia ou hiperventilação; e alteração na contagem de leucócitos (Bone *et al.*, 1992).

Em 1991, também foram definidos os estágios da sepse decorrentes do agravamento do quadro clínico. A “sepse severa” foi definida como a sepse associada a uma ou mais disfunções de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão. Já o “choque séptico” foi definido pela hipotensão persistente e hiporresponsiva à reposição de líquidos e de agentes vasopressores (Bone *et al.*, 1992).

A segunda conferência para a definição de novos conceitos na sepse foi realizada em Chicago, em dezembro de 2001, na qual foi revalidada grande parte dos conceitos anteriormente definidos. Entretanto, o que ficou muito evidente foram os indicadores da *SIRS* não serem específicos da sepse, visto que são encontrados em outras patologias, tais como trauma ou pancreatite (Levy *et al.*, 2003).

Devido ao avanço nas pesquisas relacionadas à sepse, em fevereiro de 2016, foi realizado o terceiro consenso para determinar novas definições para sepse e choque séptico. Esta nova definição incorpora critérios clínicos e biológicos relevantes, como o escore SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment Score*) e níveis de lactato. Para o escore SOFA, os critérios definidos foram: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22/min e alteração do estado mental. A sepse em sua atual definição é a “disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção” (Seymour *et al.*, 2016). Já o choque séptico passou a ser conhecido como a “sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas capazes de aumentar a mortalidade substancialmente” (Shankar-Hari *et al.*, 2016). Adicionalmente, os termos septicemia, síndrome séptica e sepse grave foram colocados em desuso.

Embora as definições tenham sido endossadas por muitas sociedades de terapia intensiva em todo o mundo, também geraram muitas controvérsias. Tanto a Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB), a *American College of Chest Physicians*, *American College of Emergency Physicians* quanto o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) não consideram viável o uso dos critérios para definir disfunção orgânica, visto que a aplicabilidade dos novos termos pode reduzir a sensibilidade e aumentar o retardo para o reconhecimento da sepse (Singer *et al.*, 2016).

1.1.2 Dados epidemiológicos relevantes

A sepse é uma condição clínica extremamente grave com taxa alta de morbidade e mortalidade, sendo um importante problema de saúde pública. A incidência de sepse tem aumentado ao longo dos anos (Iwashyna *et al.*, 2012; Gaieski *et al.*, 2013), principalmente pelo reflexo do envelhecimento populacional, do aumento no número de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), além do aumento da expectativa de vida dos pacientes que desenvolvem a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), da maior utilização de fármacos imunossupressores, do crescimento da resistência bacteriana a antibióticos e a rápida confirmação clínica para o diagnóstico da sepse (Dellinger *et al.*, 2013).

Embora os números absolutos não sejam conhecidos, estimam-se cerca de 17 milhões de casos anualmente em todo o mundo (Wilhelms *et al.*, 2010). Um estudo de 2007 identificou um aumento rápido e constante no número de casos de sepse grave, de 415.280 em 2003 para 711.736 em 2007 (um aumento de 71%) nos Estados Unidos. Além disso, os custos hospitalares totais associados para todos os pacientes com sepse grave também aumentaram significativamente: de 15,4 bilhões de dólares em 2003 para 24,3 bilhões em 2007 (aumento de 57%) (Lagu *et al.*, 2012).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos multicêntricos, até o momento, demonstrando taxas altas de mortalidade no país em comparação a outros países em desenvolvimento, como Argentina e Índia (Beale *et al.*, 2009; Conde *et al.*, 2013). O primeiro estudo, denominado BASES, foi conduzido de maio de 2001 a janeiro de 2002 e mostrou que a mortalidade por sepse foi de 33,9%, sepse severa foi de 46,9%, enquanto que a mortalidade por choque séptico foi de 52,2% (Silva *et al.*, 2004). Já o estudo Sepse Brasil de 2003, mostrou que 17% dos leitos de terapia intensiva são ocupados por pacientes acometidos por sepse sendo a mortalidade por sepse grave e choque séptico de 34,4% e 65,3%, respectivamente (Tanriover *et al.*, 2006). Adicionalmente, um estudo com dados colhidos entre 2003 e 2004 em 21 Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) brasileiras, mostrou uma mortalidade maior em hospitais ligados ao Sistema Único de Saúde (SUS) (49,1%) comparado a hospitais particulares (36,7%) (Sogayar *et al.*, 2008).

As bactérias Gram-negativas e as Gram-positivas são os principais agentes etiológicos implicados no desenvolvimento da sepse. No Brasil, um estudo de Sales Jr *et al.* identificou que as bactérias Gram-negativas são as mais prevalentes nas UTIs (40,1%), já as bactérias Gram-positivas foram identificadas em 32,8% dos casos, enquanto que as infecções fúngicas representam 5% (Sales Jr *et al.*, 2006). Em contrapartida, nos Estados Unidos há um predomínio de sepse provocada por bactérias Gram-positivas (52,1% dos casos) (Martin *et al.*, 2006).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A resposta do hospedeiro frente à presença de um agente agressor infeccioso é um mecanismo básico de defesa do organismo, visando combater a infecção e evitar a disseminação da mesma a partir do foco primário. Para tanto, nessa resposta do

hospedeiro há fenômenos inflamatórios, incluindo a produção de mediadores inflamatórios, síntese de óxido nítrico, expressão de moléculas de adesão no endotélio, radicais livres de oxigênio, alterações na coagulação e fibrinólise. Em contrapartida, o organismo tenta equilibrar essa resposta utilizando mecanismos anti-inflamatórios, sendo o equilíbrio entre ações inflamatórias e anti-inflamatórias de suma relevância para a manutenção da integridade do mesmo (Hotchkiss and Karl, 2003). Durante a sepse, ocorre o desequilíbrio entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória, o qual é responsável pela geração de fenômenos que culminam em alterações fisiopatológicas e disfunções orgânicas.

A sepse pode ter início não só por meio da disseminação direta de agentes patogênicos na corrente sanguínea, mas por mecanismos indiretos decorrentes de complicações pós-cirúrgicas, traumas, queimaduras, hemorragias e translocações bacterianas (Mokart *et al.*, 2005; Bogner *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2010). Uma vez que ocorre a invasão, a resposta do hospedeiro aos agentes patogênicos é mediada pelo sistema imune. Este tem sido conceitualmente dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. O sistema imune inato é composto por barreiras biológicas, químicas e físicas, células especializadas e moléculas solúveis, e constitui a primeira linha de defesa do organismo, apresentando uma resposta rápida a alguns estímulos (Medzhitov and Janeway, 2000).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células Natural Killer – NK e mastócitos. Essas células são responsáveis pela fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio e grande parte das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral (TNF α), interferon (IFN- γ), interleucina (IL-1 β), IL-6 e IL-8 (Aziz *et al.*, 2013). Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos tais como lipopolissacarídeos e resíduos de manose, os quais são encontrados na superfície de microorganismos e constituem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Medzhitov and Janeway, 2000).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos (linfócitos T, B e NK/T Células dendríticas ou apresentadoras de antígenos) bem como das moléculas solúveis por eles produzidas, tais como imunoglobulinas, citocinas e quimiocinas. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de

reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (Oberholzer *et al.*, 2001).

A produção excessiva e prolongada desses mediadores pró-inflamatórios, principalmente nas fases iniciais da sepse severa e choque séptico, contribui para alterações celulares e circulatórias, tanto na circulação sistêmica como na microcirculação. Entre as alterações circulatórias, os pontos mais marcantes são a vasodilatação e o aumento de permeabilidade capilar, os quais estão relacionados com o quadro de hipovolemia e hipotensão. Já a alteração na microcirculação induz alteração no fluxo e redução de densidade capilar. Esses fenômenos culminam na redução da oxigenação tecidual, provocando o aumento do metabolismo anaeróbico e a hiperlactatemia. Isto resulta em danos orgânicos relacionados também pelo aumento da apoptose celular (Gogos *et al.*, 2000; Bozza *et al.*, 2007).

1.2.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

Diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos a fim de mimetizar a sepse em humanos. Um dos modelos mais utilizados para tentar compreender a fase aguda da inflamação sistêmica é por meio da administração de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Opal and Huber, 2002). Essas bactérias são compostas por duas membranas distintas, uma externa e outra interna, separadas entre si pelo periplasma. O LPS está localizado na face externa e induz um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios de forma robusta, intensa e rápida comparado a outros modelos experimentais, dentre eles, o modelo de ligadura e perfuração cecal e o de contaminação e infecção peritoneal (Seemann *et al.*, 2017).

O LPS é um complexo glicolípido estruturalmente dividido em três partes: o lipídeo A, a fração hidrofóbica que ancora o LPS na membrana externa das bactérias Gram-negativas; o corpo de oligossacarídeos e antígeno-O, que consiste em uma cadeia de polissacarídeos (Sperandeo *et al.*, 2009). O lipídeo A é um fosfolípido que permite a fixação e é considerado o responsável pela maior ação antigênica do LPS (Raetz and Whitfield, 2002). O corpo de oligossacarídeos do LPS está ligado covalentemente ao lipídeo A e pode ser dividido em duas porções; a interna e a externa (Erridge *et al.*, 2002). Este consiste em uma porção altamente conservada entre distintas linhagens e espécies de bactérias (Erridge *et al.*, 2002). Já o antígeno-

O é o maior alvo antigênico para os anticorpos do hospedeiro por se localizar na porção mais externa do LPS. Além disso, tem como função proteger a bactéria da ação lítica de componentes do sistema complemento e da fagocitose, bem como as proteger do efeito dos antibióticos (Caroff and Karibian, 2003).

O LPS desencadeia vias de sinalização intracelular por meio de sua ligação a receptores próprios. O sistema imunológico do hospedeiro reconhece molecularmente o LPS através do receptor tipo Toll 4 (TLR4), sendo um receptor do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*). Os receptores do tipo Toll são proteínas transmembranas descobertas no final da década de 1990 por Lemaitre *et al.* (1996). A partir de sua descoberta, estudos têm correlacionado esses receptores na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos, bem como na ativação do sistema imune inato (Albiger *et al.*, 2007; Kawai and Akira, 2010).

O reconhecimento do LPS é mediado também por outras moléculas acessórias como a proteína ligante de LPS (LBP, do inglês *Lipopolysaccharide Binding Protein*), a proteína CD-14 e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) (Fujihara *et al.*, 2003). A LBP é uma glicoproteína com alta afinidade ao LPS que apresenta concentrações plasmáticas elevadas durante infecções agudas (Tobias *et al.*, 1995). Ela transfere e acelera a ligação do LPS ao CD-14 (Hailman *et al.*, 1994), a qual pode estar sob a forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular (sCD14 e mCD14, respectivamente) (Wright *et al.*, 1990). Já as duas formas do CD-14 facilitam o reconhecimento do LPS pelo TLR4-MD-2, o que aumenta a sensibilidade desse receptor para o LPS (Wright *et al.*, 1990). Portanto, o complexo TLR4-MD-2/LPS é considerado como a principal forma de reconhecimento do LPS, visto que células não responsivas ao LPS, transfectadas somente com cDNA de TLR4, não são capazes de reconhecer o LPS (Shimazu *et al.*, 1999). Entretanto, quando as células são transfectadas com cDNA para MD-2 ou com a proteína MD-2 solúvel, adquirem a capacidade de responder ao LPS (Visintin *et al.*, 2001).

As principais vias de sinalização envolvidas a partir da ativação dos receptores TLR4 são: MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), STAT (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*), AP-1 (do inglês, *activator protein 1*) e IRF3 (do inglês, *Interferon regulatory factor 3*). A ativação do domínio citoplasmático do TLR4, o TIR, é essencial para a sinalização intracelular. Esta sinalização induzida pela interação do LPS com seus receptores pode desencadear o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, dentre elas a proteína Myd88 (do inglês, *myeloid*

differentiation primary response protein 88) e a proteína adaptadora contendo um domínio TIR (TIRAP/MAL); e estar envolvida na transdução do sinal dos TLR (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002 a). A Myd88 está associada a duas importantes vias de sinalização a ativação da MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) que por sua vez, ativam o fator de transcrição AP-1 (do inglês, *activator protein 1*), bem como a ativação da cinase do I κ B, com consequente ativação do factor de transcrição NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*).

Na ausência de estímulo, o NF- κ B encontra-se sequestrado na forma inativa devido à interação com as proteínas inibitórias I κ B. Estas são importantes para a regulação da expressão de genes ativados pelo LPS, desde que não ocorra a fosforilação do I κ B e não haja a sua degradação proteassômica, o fator de transcrição NF- κ B não será translocado ao núcleo (Ghosh et al., 1998). O fator de transcrição NF- κ B pertence à família dos fatores de transcrição NF- κ B /REL formada por cinco genes (NF- κ B1, NF- κ B2, RELA, c-REL e RELB) que dão origem a sete proteínas: p100, p105, p50, p52, RELA (também conhecida por p65), RELB e c-REL. As proteínas do NF- κ B ao se translocarem para o núcleo, promovem a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Raetz & Whitfield, 2002). As proteínas do NF- κ B regulam a expressão de distintos genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa, inflamação, apoptose, respostas ao estresse, diferenciação celular e proliferação de células tumorais (Raetz and Whitfield, 2002).

1.2.2 O intestino como “motor da sepse”

As primeiras evidências descrevendo o intestino como o “motor” da disfunção múltipla de órgãos foram sugeridas por Carrico et al. (1986) em uma reunião da *Surgical Infection Society*. Sua principal hipótese baseou-se nos achados de crescimento e aumento da resistência das bactérias presentes no intestino em pacientes nas UTIs. Foi discutido o impacto da perda da função da barreira epitelial intestinal, o que permitiria a translocação de bactérias para a circulação sistêmica em um organismo já com comprometimento de sua defesa, levando assim não somente à piora do prognóstico do paciente quanto à propagação da doença para outros órgãos distantes.

Em anos posteriores, estudos clínicos e experimentais ratificaram que a disfunção múltipla de órgãos e sua fisiopatologia inicial estão relacionadas com a

ruptura da barreira epitelial intestinal, sendo a força motriz na origem e agravamento de doenças críticas não somente na sepse (Johnston *et al.*, 1996; Macfie *et al.*, 2006), mas também em outras alterações patológicas tais como traumas múltiplos (Pape *et al.*, 1994) e queimaduras (Ryan *et al.*, 1994).

Para compreender as alterações patológicas intestinais é importante primeiramente descrever fisiologicamente a função do epitélio intestinal na proteção do organismo.

1.3 MORFOLOGIA DA BARREIRA EPITELIAL

As estruturas que formam a barreira do epitélio intestinal podem ser classificadas, conforme a sua localização e função, em componentes extracelulares e celulares.

1.3.1 Componentes extracelulares

A superfície da mucosa intestinal é coberta por lipídeos e por um gel hidratado formado por mucinas, os quais são importantes para limitar a exposição da monocamada das células epiteliais intestinais da ação e do trauma físico de partículas dentro do lúmen, como também impedem o contato direto do epitélio com microrganismos (Turner, 2009).

As mucinas possuem propriedades surfactantes e hidrofóbicas, as quais fornecem retenção das secreções da mucosa, que são ricas em peptídeos antibacterianos (tais como defensinas, catecilidinas e lisozimas) e imunoglobulina A. Além disso, atuam na proteção contra os microrganismos luminiais, como as bactérias, destruindo-as e prevenindo a sua adesão à mucosa e ao epitélio intestinal (Johansson and Hansson, 2008).

1.3.2 Componentes celulares

O epitélio intestinal consiste em uma camada única de células especializadas, que reveste a face luminal de todo o trato gastrointestinal e compreende a maior área de superfície mucosa do organismo humano. A função essencial do epitélio intestinal

é de formar uma barreira que impeça conteúdos potencialmente nocivos do lúmen intestinal, incluindo a microbiota, alcançarem a circulação sistêmica promovendo, portanto, a proteção do organismo (Turner, 2009). Entretanto, o epitélio não é totalmente impermeável e atua como filtro seletivo, possibilitando assim a absorção de componentes essenciais (nutrientes, água e eletrólitos) e secreção de íons e muco (Turner, 2009).

A permeabilidade seletiva estabelecida pelo epitélio intestinal é feita de duas maneiras: pela via transepitelial/transcelular e pela via paracelular (Tsukita *et al.*, 2001). A permeabilidade transcelular é associada ao transporte de solutos através das células epiteliais e é regulada por proteínas transportadoras altamente seletivas (Ferraris and Diamond, 1997; Schreiber *et al.*, 2002; Broer, 2008). Já a permeabilidade paracelular é associada ao transporte através do espaço entre as células epiteliais adjacentes, e é regulada por complexos intercelulares localizados na junção da membrana apical e ao longo da membrana basolateral (Van Itallie and Anderson, 2006).

O contato entre as células epiteliais intestinais está representado na Figura 1 e inclui três estruturas distintas: os desmossomos, as junções aderentes e as *tight junctions* (TJ) (Turner, 2009). Os desmossomos, que estão localizados abaixo do complexo juncional apical, são formados por interações entre desmogleína, desmocolina, desmoplaquina e filamentos de queratina. Eles formam estruturas que se conectam aos filamentos intermediários do citoesqueleto, proporcionando fortes ligações adesivas que mantêm a proximidade celular e são também locais de comunicações intercelulares intermediários do citoesqueleto (Turner, 2009).

As junções aderentes são compostas por interações de glicoproteínas transmembranares da superfamília clássica de caderinas, como a E-caderina e dos membros da família de catenina incluindo p120-catenina, β -catenina e α -catenina (Hartsock and Nelson, 2008). As caderinas clássicas, como a E-caderina, são as principais proteínas das junções aderentes e iniciam os contatos intercelulares através da intercalação de caderinas em células opostas (Gumbiner, 2005).

As TJ são estruturas complexas e dinâmicas, que incluem uma série de proteínas juncionais capazes de cruzar a bicamada lipídica celular e se ligarem à porção extracelular na célula adjacente. Funcionam como uma barreira paracelular seletiva/semipermeável que regula a passagem de íons e solutos através do espaço intercelular, evitando a translocação luminal de antígenos, microorganismos e suas

toxinas. Estes complexos são formados por proteínas transmembrana (occludinas, claudinas e molécula de adesão juncional/JAM) e proteínas acessórias/periféricas citoplasmáticas [*zonula occludens* (ZO)-1, -2 e -3, cingulina e 7H6] (Hartsock and Nelson, 2008; Turner, 2009).

As primeiras proteínas integrantes das TJ identificadas foram as occludinas em 1993. Seu nome vem do latim “*occludere*” que significa passagem restrita. Possuem massa molecular de ≈ 65 kDa e são relativamente conservadas entre diferentes espécies e tecidos (Furuse *et al.*, 1993). Apresentam quatro domínios transmembrana sendo as duas alças extracelulares responsáveis pela regulação seletiva da permeabilidade paracelular. Possui um N-terminal curto e um longo domínio C-terminal citoplasmático. Já os domínios intracelulares interagem com proteínas acessórias, como a ZO-1, proporcionando a ligação das occludinas ao citoesqueleto (Groschwitz and Hogan, 2009). A deleção do gene da occludina parece não comprometer a estrutura das TJ, bem como não altera o transporte de solutos e a condutância através dos enterócitos, entretanto afeta significativamente a adesão célula-célula (Vanitallie and Anderson, 1997; Schulzke *et al.*, 2005). Por esses motivos, acreditou-se no envolvimento de outras proteínas integrais na estrutura das TJ.

As claudinas também são proteínas integrais de membrana, compostas por 4 domínios hidrofóbicos, massa molecular de $\approx 20-27$ kDa e compõem uma família com 24 membros distintos reconhecidos. O nome que vem da palavra do latim *claudere* (“para fechar”). As duas alças extracelulares são críticas para a interação com outras proteínas das TJ e também para a formação dos poros iônicos seletivos (Groschwitz and Hogan, 2009). Por outro lado, o domínio intracelular está envolvido no ancoramento das claudinas ao citoesqueleto e na interação com domínios de proteínas acessórias, como as ZO-1, -2 e -3. A expressão das claudinas é dependente do tecido, tipo celular e estágio de desenvolvimento do organismo. Além disso, cada isoforma das claudinas pode contribuir de modo distinto na seletividade da barreira epitelial (Fasano *et al.*, 1991; Groschwitz and Hogan, 2009). No intestino de ratos, as claudinas-1, -3, -4, -5 e -8 são altamente expressas no cólon, e nesse segmento encontra-se alta resistência elétrica transepitelial. Em contrapartida, no duodeno há maior expressão da isoforma -2, enquanto no jejuno e íleo as isoformas -2, -7 e -12 são predominantes; havendo diminuição gradual da resistência elétrica transepitelial a partir do segmento proximal do intestino delgado (Markov *et al.*, 2010). Atualmente,

essas proteínas são tidas como as principais reguladoras das TJ e da permeabilidade intestinal.

As moléculas de adesão juncional (JAM) são proteínas transmembranas que participam de forma importante na regulação e manutenção da função de barreira junto com as ocludinas e as claudinas. A família JAM pertence à superfamília das imunoglobulinas (Martin-Padura *et al.*, 1998), caracterizada por dois domínios extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio C-terminal intracelular. Já foram identificadas várias proteínas dessa família, dentre elas JAM-A, -B, e -C. Os membros da JAM são expressos em células epiteliais, incluindo as endoteliais e células do sistema imunológico. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que a ausência de JAM-A aumenta a permeabilidade intestinal e uma maior atividade de mieloperoxidase (MPO; enzima que estimula a infiltração de neutrófilos) no cólon (Laukoetter *et al.*, 2007).

Figura 1. Microscopia eletrônica e desenho representativo da localização das *Tight Junctions*, das junções aderentes e dos desmossomos [modificado de (Turner, 2009)] .

1.3.3 Sistema Imune da mucosa intestinal

O epitélio intestinal exerce uma função bimodal, visto que enquanto maximiza a absorção de nutrientes digeridos, impede a passagem de alimentos não digeridos e de bactérias do lúmen intestinal. Para tanto, a via de transporte paracelular no epitélio intestinal é regulada pelas TJ existentes como um complexo juncional apical (Turner, 2009). Em condições fisiológicas, as células epiteliais são seletivamente permeáveis ao transporte de água e de solutos, assim como a apresentação de antígenos microbianos para as células imunes intestinais, sendo, portanto, um importante local de interação antigênica (Artis and Grencis, 2008; Konigsrainer *et al.*, 2011). Tanto a progressão quanto o desenvolvimento das respostas imunológicas devem ser finamente reguladas, a fim de evitar uma reação exacerbada e prejudicial ao organismo (Turner, 2009).

Os enterócitos contribuem na imunidade local, mediando processos como a defesa da mucosa, tolerância à microbiota e reparos estruturais na barreira intestinal (Turner, 2009). Coletivamente, a barreira epitelial intestinal somada a outros mecanismos da imunidade inata e uma camada de muco saturado com peptídeos antimicrobianos, controla a densidade bacteriana na interface entre o lúmen e o epitélio. Além disso, os tecidos linfoides chamados coletivamente de GALT (tecido linfóide associado ao intestino, do inglês: *gut-associated lymphoid tissue*) são constituídos por células do sistema imunológico. O sistema G.A.L.T é formado por folículos linfóides densos isolados no cólon e agregados como nas placas de Peyer no íleo. As placas de Peyer são importantes por possuírem centros germinativos contendo linfócitos B, células T auxiliares foliculares, células dendríticas foliculares e macrófagos. O transporte dos antígenos do lúmen intestinal para o sistema G.A.L.T é realizado pelas células M (do inglês, *microfold cells*). A lâmina própria e a mucosa são compostas *per se* em grande número de leucócitos, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos e eosinófilos. Eles formam uma rede pluripotente que pode orquestrar uma resposta inata ou adaptativa para potenciais agentes patogênicos, os quais podem comprometer o organismo (Wershil and Furuta, 2008).

A resposta imune inata é a primeira resposta imune a ser ativada e atua de forma imediata e não específica. O sistema imune inato reconhece os PAMPs dos microrganismos principalmente por meio da ativação de receptores do tipo Toll (TLR). Quando ocorre a interação PAMP-TLR, há a ativação de vias intracelulares que

culminam na indução da transcrição de genes importantes para a ativação celular ou a indução da fagocitose. O processo de fagocitose é exercido principalmente pelos macrófagos e neutrófilos. Além da fagocitose, os neutrófilos e macrófagos têm uma função fundamental de regular a cinética e a magnitude da resposta inflamatória e também a apresentação de antígenos às células que controlam a resposta do sistema imune adaptativo (Medzhitov and Janeway, 2000).

As células efectoras do sistema imune inato juntamente com as células epiteliais intestinais são fundamentais para limitar a extensão da invasão de microrganismos luminais. Os mecanismos efetores do sistema imune adaptativo suportam e ajustam a manutenção desse equilíbrio. Para tanto, a resposta adaptativa inclui linfócitos T e B com resposta específica e de memória para certos antígenos. Células T CD4⁺ localizam-se na lâmina própria, gerando células Th1 e Th17 com propriedades pró-inflamatórias. Entretanto, as células T regulatórias (Treg), caracterizadas pela expressão da molécula CD25⁺ e do fator nuclear FOXP3, atuam contrabalanceando o efeito pró-inflamatório das Células T CD4⁺, ajudando a manter a inflamação sob controle (Campbell and Ziegler, 2007; Sojka *et al.*, 2008).

As células T da mucosa são subdivididas nas que expressam o marcador de diferenciação CD4 e nas que expressam o marcador CD8. As CD4 reconhecem antígenos extracelulares expostos na superfície das células apresentadoras de antígenos. Já as CD8 reconhecem proteínas intracelulares anormais (Konigsrainer *et al.*, 2011).

A principal função do sistema de células B da mucosa na defesa imune local é colaborar com as células epiteliais intestinais secretoras para fornecer uma primeira linha de defesa. Isto é conseguido principalmente pela síntese e transporte seletivo de IgA polimérica através de células epiteliais que revestem a superfície da mucosa. Na mucosa intestinal a principal imunoglobulina secretada nas secreções externas é a IgA, a qual serve para impedir que agentes infecciosos rompam a barreira da mucosa, interagindo com receptores específicos, tais como FcαRI, Fcα/μR e CD71 (Woof and Mestecky, 2005). A IgA é transportada para a superfície das células epiteliais onde se encontra o muco e funciona na detecção de microrganismos, em sua imobilização e neutralização de sua ação, além de controle da densidade bacteriana na microbiota intestinal.

É importante ressaltar a importância das células dendríticas no sistema imune intestinal. Essas células inserem seus prolongamentos entre duas células epiteliais

adjacentes e capturam diretamente os microrganismos que se encontram no lúmen intestinal. Evidência experimental apoia uma ação imunomoduladora para as células dendríticas, incluindo a indução de tolerância oral e respostas imunes protetoras (Bilsborough and Viney, 2004).

Outras células abundantes na mucosa intestinal e que estão relacionadas com o sistema imunológico são os mastócitos. Estes atuam na fagocitose de partículas, no processamento de antígenos, na produção de citocinas, na liberação de substâncias vasoativas e antimicrobicidas, no recrutamento e ativação de células inflamatórias e no reparo tecidual (Abraham and Malaviyar, 1997; Abraham and John, 2010).

Os mastócitos são classificados em dois subtipos - de mucosa e de tecidos conectivos (próximo a vasos sanguíneos e na cavidade peritoneal) - dependendo do conteúdo de proteases em seus grânulos (Bischoff, 2009). Os mastócitos podem ser ativados por diversos estímulos, incluindo a via clássica mediada por IgE e também por citocinas, hormônios, imunoglobulinas, neuropeptídeos e componentes do sistema complemento (Bischoff, 2009). A ativação funcional dos mastócitos promove a degranulação de seus mediadores pré-formados e armazenados em grânulos secretores. Muitas das funções fisiológicas e fisiopatológicas dos mastócitos estão intimamente associadas às ações biológicas dos compostos granulados pré-formados, os quais são armazenados na sua forma ativa. Desta forma, os grânulos dos mastócitos auxiliam rapidamente a proteção do organismo contra insultos adversos (Foeger et al., 2011).

Dentre as moléculas prontamente secretadas em resposta à ativação dos mastócitos pode-se citar histamina, serotonina, TNF, cininas e proteases. Após a liberação dessas moléculas bioativas, ocorre aumento da expressão gênica de quimiocinas, citocinas (TNF α , IL-4, IL-1 e IL-6), bem como fatores de crescimento de fibroblastos 2 do endotélio vascular (Azouz *et al.*, 2015).

Além dos efeitos pró-inflamatórios clássicos da histamina (Ohtsu, 2012) e das citocinas localizadas nos grânulos, como o TNF, em condições alérgicas e outras configurações patológicas; alguns estudos sugerem que as proteases (tais como a quimase e triptase) representam uma proporção substancial das ações pró-inflamatórias que são atribuídas aos mastócitos (Molinari *et al.*, 1996; He and Walls, 1998; Huang *et al.*, 1998).

As triptases são proteínas tetraméricas e clivam resíduos de lisina-arginina, enquanto as quimases são monoméricas e clivam preferencialmente resíduos de

aminoácidos aromáticos (Pejler *et al.*, 2010). Em ratos, foi previamente demonstrado que os grânulos de mastócitos contêm atividade de quimase e triptase (Kido *et al.*, 1985; Kido *et al.*, 1986). Em ratos, duas quimases são mais estudadas até o momento, a protease de mastócitos de rato 1 (rMCP-1) e rMCP-2 (Kido *et al.*, 1986; Benfey *et al.*, 1987; Letrong *et al.*, 1987). A rMCP-1 é a protease mais abundante expressa no tecido conectivo de rato, enquanto a rMCP-2 é a principal protease de mucosa de mastócitos (Gibson *et al.*, 1986). Já em camundongos, as populações de mastócitos contêm combinações diferentes de pelo menos sete proteases diferentes, denotadas proteases de mastócitos de murinos 1 a 7 (mMCP-1-7), sendo as mais estudadas as mMCP-4 e 5 (Enerback and Aldenborg, 1986; Reynolds *et al.*, 1991; Mcneil *et al.*, 1992)

As triptases e as quimases são caracterizadas por seus efeitos pró-inflamatórios, dentre eles o aumento da migração de neutrófilos, eosinófilos e outras células inflamatórias para os locais de infecção (Molinari *et al.*, 1996; He and Walls, 1998; Huang *et al.*, 1998). Em contrapartida, inibidores das proteases dos mastócitos demonstram efeitos anti-inflamatórios (Clark *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 2002). Adicionalmente, camundongos *knockout* para mMCP-4 ou mMCP-5 apresentam uma redução na resposta inflamatória induzida por queimadura (Younan *et al.*, 2010; Bankova *et al.*, 2014), já camundongos *knockout* para mMCP-6 apresentam uma atenuação na colite experimental induzida pelo sulfato sódico de dextrana e pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (Hamilton *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais as proteases atuam podem ser múltiplos, o que refletem suas especificidades amplas em distintas condições inflamatórias (Hellman and Thorpe, 2014). Estudos diversos mostram que as proteases exercem grande parte de seus efeitos pró-inflamatórios pela ativação do receptor ativado por protease PAR-2 (Mirza *et al.*, 1997; Molino *et al.*, 1997).

1.3.4 Integridade do epitélio intestinal

A hipótese da “sepse de origem intestinal” propõe que enterobactérias, endotoxinas e peptidoglicanos presentes no lúmen intestinal se translocam para órgãos distantes devido à perda da integridade do epitélio intestinal (Deitch, 1990; Gatt *et al.*, 2007). De fato, a disfunção intestinal grave antecede o aparecimento da falência de múltiplos órgãos em pacientes com sepse e choque séptico (Macfie *et al.*,

1999), o que leva ao agravamento do quadro clínico do paciente (Doig *et al.*, 1998; Macfie *et al.*, 1999). Uma série de fatores comprometem a integridade do epitélio dentre eles: o crescimento exagerado da microbiota intestinal, as toxinas bacterianas, os componentes da dieta e a inflamação (Turner, 2009).

Evidências clínicas suportam a correlação entre a perda da integridade do epitélio intestinal e diversas patologias. É bem reconhecido que a infecção nosocomial é frequentemente uma consequência de organismos derivados do intestino, como a *Escherichia coli* (Emori and Gaynes, 1993). Além disso, há um aumento na incidência de complicações sépticas em pacientes que recebem nutrição parenteral (Kudsk *et al.*, 1991). Ainda, existe uma correlação entre a intensa colonização do trato gastrointestinal superior e as complicações sépticas em pacientes acometidos por cirurgias (Deitch *et al.*, 1987).

Em modelos experimentais que mimetizam os processos fisiopatológicos presentes em muitos pacientes sépticos, entre eles o modelo de administração de LPS, ocorre um aumento na translocação bacteriana, a qual está correlacionada com uma resposta inflamatória local e sistêmica exacerbadas. Estas induzem uma injúria primária à mucosa intestinal (Reino *et al.*, 2011), o que leva à esfoliação do epitélio e formação de edema (Verdant *et al.*, 2009).

Na inflamação sistêmica também há o aumento significativo no número de ileócitos em processo de necrose e apoptose, acelerando a disfunção da barreira epitelial intestinal (Stallion *et al.*, 2005; Hotchkiss and Nicholson, 2006). A indução da apoptose de células epiteliais intestinais e dos linfócitos das placas de Peyer comprometem a defesa imunológica da mucosa intestinal, favorecendo a translocação de bactérias e de endotoxina na circulação sistêmica (Hotchkiss *et al.*, 1999). A contribuição da apoptose na teoria da sepse derivada do intestino é fortemente apoiada por análise de biópsias *post mortem* de pacientes sépticos, revelando extensa apoptose de linfócitos e células epiteliais do íleo e do cólon (Nicholson and Thornberry, 1997), bem como aumento na expressão de caspases. Em mamíferos, as caspases (principalmente, a caspase-3) são proteínas sinalizadoras importantes capazes de prevenir a ativação celular inapropriada ou uma desativação rápida de vias de sinalização intracelular (Cohen, 1997). A caspase-3, após ser ativada pelas caspases iniciadoras -8 e -9, exercerá a sua função efetora na proteólise de um elevado número de substratos (Danial and Korsmeyer, 2004). O processamento desses substratos pode levar a alterações morfológicas associadas à apoptose, incluindo a degradação

do DNA, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e alteração citoplasmática da membrana (como projeções em forma de bolha) (Masuyuk *et al.*, 2002).

1.3.5 Mediadores inflamatórios e integridade das TJ e JA intestinais

A ruptura da integridade da barreira epitelial induzida por antígenos presentes na circulação sanguínea e também locais, é caracterizada pelo aumento da permeabilidade intestinal. Esse aumento resulta na translocação bacteriana, culminando na produção excessiva de citocinas inflamatórias pelas células do sistema imune na mucosa e pelos enterócitos, podendo originar uma resposta imune exacerbada e patológica (Ogle *et al.*, 1997). Assim, a magnitude da resposta inflamatória gerada está diretamente relacionada com o aumento da permeabilidade intestinal, avaliada por meio do transporte paracelular de macromoléculas de diferentes massas moleculares (Macdonald and Monteleone, 2005).

As células do sistema imune e os enterócitos sintetizam um amplo espectro de mediadores inflamatórios, incluindo interleucinas, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ e óxido nítrico (Mainous *et al.*, 1995; Villa *et al.*, 1995; Hietbrink *et al.*, 2009). Desde a descoberta inicial que o $\text{IFN-}\gamma$ modula as proteínas constituintes das TJ (Madara and Stafford, 1989), um número substancial de outras citocinas foram descritas e correlacionadas com a disfunção da barreira epitelial intestinal (Mainous *et al.*, 1995; Villa *et al.*, 1995; Hietbrink *et al.*, 2009).

As citocinas pró-inflamatórias, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, comprometem a integridade da barreira epitelial intestinal (Villa *et al.*, 1995), por mecanismos múltiplos que envolvem a modulação da transcrição e o desarranjo das TJ pela internalização das suas proteínas constituintes (como a ocludina, JAM-A, claudina-1 e claudina-4), a apoptose de células epiteliais, a ativação da quinase, a modulação do citoesqueleto, alterações estruturais no epitélio e também pelo aumento da expressão da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*) (Ma and Ye, 2004; Ye *et al.*, 2006; Pacher *et al.*, 2007; Al-Sadi *et al.*, 2008; Boivin *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2010).

O aumento da expressão da MLCK leva à abertura das TJ por catalisar a fosforilação da cadeia leve de miosina, produzindo a contração dos filamentos de actina-miosina na proximidade dos complexos juncionais (Ma and Ye, 2004; Ye *et al.*, 2006). A ativação da MLCK ocorre como resultado do aumento da atividade

enzimática e da transcrição e tradução da MLCK, tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2005). Da mesma forma, a expressão e atividade da MLCK são aumentadas nas células epiteliais intestinais de pacientes com doença inflamatória intestinal (Blair *et al.*, 2006). Além disso, o grau em que a expressão e a atividade da MLCK são aumentadas correlaciona-se com a atividade da patologia local, sugerindo que esses processos podem ser regulados pela sinalização local de citocinas (Blair *et al.*, 2006)

Diferente das citocinas pró-inflamatórias, a citocina IL-10 regula a resposta inflamatória exacerbada e minimiza a disfunção da barreira epitelial no intestino. Nas doenças inflamatórias intestinais, essa citocina desempenha efeito crucial na origem e controle da patologia. De fato, camundongos deficientes em IL-10 apresentam o desenvolvimento espontâneo de colite (Khun *et al.*, 1993). Adicionalmente, o decréscimo na síntese e expressão da IL-10 na mucosa intestinal pode estar associado às complicações sistêmicas em ratos com nutrição parenteral (Sun *et al.*, 2008). Em contrapartida, a administração de *Lactococcus lactis* (secreta IL-10) (Schotte *et al.*, 2000), atenua a colite induzida por DSS (do inglês, Dextran sulfate sodium) em camundongos (Steidler *et al.*, 2000). Adicionalmente, o tratamento com IL-10 exógena minimiza o aumento da permeabilidade intestinal e alterações nas proteínas constituintes das TJ na sepse polimicrobiana (Vanderpoll *et al.*, 1995).

Uma das principais células que sintetizam as citocinas pró-inflamatórias e são descritas como células “chave” no controle da inflamação e permeabilidade intestinal são os mastócitos (Echtenacher *et al.*, 1996). Tanto o aumento da permeabilidade intestinal quanto a inflamação do epitélio intestinal podem ser revertidos pela administração de um estabilizador de mastócitos, doxantrazole, em modelo de inflamação sistêmica pela administração do LPS (Moriez *et al.*, 2007).

Como descrito anteriormente, grande parte dos efeitos pró-inflamatórios dos mastócitos são dependentes das ações das proteases, as quais também são capazes de comprometer células epiteliais da membrana basolateral, levando ao comprometimento da integridade do epitélio intestinal (Jacob *et al.*, 2005). A triptase não só atua em receptores PAR-2 localizados em células imunes provocando reações inflamatórias, mas também em células epiteliais, alterando a integridade da mucosa intestinal (Jacob *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudo *in vitro* de Wilcz-Villega *et al.* (2013), demonstrou que a triptase compromete a integridade epitelial, por meio de uma diminuição significativa na resistência elétrica transepitelial, um aumento na

permeabilidade à FITC-dextrana e uma diminuição na expressão das proteínas juncionais JAM-A, claudina-1 e ZO-1. Por outro lado, um inibidor de triptase reduziu o efeito da degranulação dos mastócitos na proteína juncional JAM-A, na resistência elétrica transepitelial e permeabilidade intestinal (Wilcz-Villega *et al.*, 2013).

Em relação à quimase, a injeção intravenosa de rMCP-2 induz o aumento da permeabilidade epitelial intestinal e uma translocação de albumina sérica humana dos vasos sanguíneos para o lúmen intestinal em poucos minutos (Scudamore *et al.*, 1995). Em conformidade com este estudo, a rMCP-2 também é responsável por clivar a ocludina e a E-caderina (Fu *et al.*, 2005).

1.4 AÇÃO DO ESTRADIOL NA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

O estradiol é produzido principalmente pelas células ovarianas apresentando uma grande diversidade de ações funcionais nos sistemas biológicos, tais como a reprodução (Singh *et al.*, 2009), o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Silberstein *et al.*, 2006; Choleris *et al.*, 2008), a modelagem óssea (Imai *et al.*, 2009), o funcionamento do sistema cardiovascular (Dworatzek and Mahmoodzadeh, 2017), o metabolismo (Barros and Gustafsson, 2011) e o comportamento (Crews *et al.*, 2004).

As ações do estradiol são mediadas pela presença de seus receptores (ERs), pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares, que atuam como fatores de transcrição após se ligarem ao estradiol. Os ERs podem ser classificados em dois subtipos α e β (Nilsson and Gustafsson, 2011). O ER α é expresso predominantemente no útero, estroma da próstata, células da teca dos ovários, células de Leydig dos testículos, epidídimo, osso, tecido mamário, fígado, rins, tecido adiposo branco e várias regiões do cérebro (Nilsson and Gustafsson, 2011). O gene ER β é expresso predominantemente no sistema imune, cólon, epitélio da próstata, testículos, células da granulosa dos ovários, medula óssea, glândulas salivares, endotélio vascular, pulmões, bexiga e algumas regiões do cérebro (Deroo and Buensuceso, 2010).

Dados epidemiológicos sugerem que homens apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de trauma, choque, hemorragia e complicações envolvendo essas patologias, como a falência de múltiplos órgãos. No entanto, a influência do gênero na incidência da sepse ainda permanece controversa. Enquanto alguns

estudos relatam menor incidência, mortalidade e gravidade da sepse em mulheres (Sands *et al.*, 1997; Angus *et al.*, 2001; Alberti *et al.*, 2002), outros sugerem pouca ou completa independência do gênero na severidade dessa alteração fisiopatológica (Martin *et al.*, 2003; Esper *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006; Adrie *et al.*, 2007; Dombrovskiy *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007). A discrepância entre esses achados pode estar relacionada a diferentes protocolos experimentais clínicos adotados, incluindo o diagnóstico (Eachempati *et al.*, 1999; Alberti *et al.*, 2002; Adrie *et al.*, 2007; Dombrovskiy *et al.*, 2007), o número limitado de amostragem de pacientes (Esper *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2007), inclusão de pacientes ambulatoriais ou ausência de distinção entre pacientes com sepse grave ou choque séptico (Adrie *et al.*, 2007; Dombrovskiy *et al.*, 2007). Além desses fatores, o prognóstico da sepse pode ser influenciado pela idade, hipotermia, febre, doenças pré-existentes, microrganismos causadores, foco primário da infecção e uso de antibioticoterapia adequada (Sands *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2002). Entretanto, o que é bem estabelecido é que as concentrações plasmáticas de estradiol total e de estradiol biodisponível estão aumentadas numa condição de sepse e choque séptico tanto em homens quanto em mulheres (Christeff *et al.*, 1992; Fourrier *et al.*, 1994; Kauffmann *et al.*, 2011; May *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2016).

Em modelo experimental de sepse polimicrobiana, fêmeas em proestro (fase do ciclo estral caracterizada por concentrações plasmáticas elevadas de estradiol) apresentam sobrevida maior em comparação aos machos (Homma *et al.*, 2005). Além disso, Christeff *et al.* (1994) e Nollan *et al.* (1965) demonstraram que o tratamento de ratos com estradiol exógeno minimiza os efeitos letais da endotoxina e também reduz a mortalidade dos animais de modo dose-dependente.

Em relação ao sistema cardiovascular, o estradiol administrado 1 hora após o LPS restaura o débito cardíaco em ratos machos endotoxêmicos (Palacios and Pang, 1998). Assim, o estradiol parece ter função protetora quando administrado antes ou imediatamente após a exposição à endotoxina. Um dos possíveis mecanismos de ação do estradiol pode ser a modulação da função de células do sistema imune, incluindo macrófagos e neutrófilos, alterando a fagocitose e a síntese de mediadores inflamatórios (Spitzer, 1999).

Além de atuar na modulação da função de macrófagos e neutrófilos, uma série de estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o estradiol regula também o efeito dos mastócitos em diversos tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas

(Thomas *et al.*, 2003; Harnish *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015; Moussa *et al.*, 2015). Adicionalmente, a presença dos receptores clássicos de estrógeno nos mastócitos indica que o estradiol pode exercer seus efeitos biológicos ao se ligar a esses receptores (Zhao *et al.*, 2001). Embora alguns modelos experimentais investigaram o efeito do estradiol na inflamação intestinal (Harnish *et al.*, 2003; Moussa *et al.*, 2015), nenhum estudo avaliou se em condição de inflamação sistêmica existe uma modulação negativa pelos mastócitos na mucosa intestinal.

No contexto da inflamação sistêmica, os hormônios gonadais também podem modificar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando a secreção de corticosterona e modulando a produção de citocinas em camundongos (Spinedi *et al.*, 1992). Além disso, estudos demonstram que os hormônios gonadais atenuam a hipotermia induzida por LPS durante o proestro e em fêmeas após a ovariectomia bilateral seguida por reposição hormonal (Saia *et al.*, 2008; Saia *et al.*, 2011).

Em conformidade ao possível efeito benéfico do estradiol, o declínio da função ovariana na menopausa está associado ao aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6 e TNF α (Pfeilschifter *et al.*, 2002). Schroder *et al.* (1998) relataram que mulheres que desenvolveram sepse após procedimentos cirúrgicos apresentaram produção aumentada de IL-10 e diminuída de TNF α , em comparação a homens.

A ação anti-inflamatória do estradiol pode estar relacionada à modulação na via do NF- κ B, um indutor potente da expressão de mediadores pró-inflamatórios e NO. Além da redução na ativação e translocação do NF- κ B para o núcleo, o estradiol pode atuar em diversos mecanismos, incluindo as interações diretas proteína-proteína, a inibição da ligação do NF- κ B ao DNA e a indução da expressão de I κ B (inibidor da ativação do fator nuclear) (Ray *et al.*, 1994; Stein and Yang, 1995; Deshpande *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 1997). Outro mecanismo inibitório possível de ação do estradiol é na alteração da expressão de moléculas de adesão celular ao endotélio. Esse hormônio pode diminuir a sua síntese endotelial, levando à diminuição da migração celular de leucócitos para os sítios inflamatórios e eventuais danos teciduais promovidos pela intensa infiltração celular.

Assim, os mecanismos de ação do estradiol na modulação da resposta inflamatória são múltiplos, incluindo a inibição de múltiplos genes que codificam citocinas e NO, enzimas e moléculas de adesão celular e também regulação de fatores de transcrição (Cuzzocrea *et al.*, 2000; Vegeto *et al.*, 2001; Pfeilschifter *et al.*, 2002;

Islander *et al.*, 2003; Lang, 2004; Bouman *et al.*, 2005; Ghisletti *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006; Straub, 2007).

Há evidências crescentes da influência dos esteroides sexuais na Fisiologia Gastrointestinal, regulando a motilidade gástrica, a velocidade de trânsito intestinal (Xiao *et al.*, 2005; Cong *et al.*, 2007), a secreção de íons cloreto (Condliffe *et al.*, 2001) e a arquitetura epitelial (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Os dois subtipos de ERs são normalmente expressos no trato gastrointestinal, isto é, na ausência da formação de tumores ou no curso de processos inflamatórios (Enmark *et al.*, 1997; Campbell-Thompson *et al.*, 2001; Konstantinopoulos *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 2004).

O estradiol também atua na manutenção da arquitetura do epitélio intestinal, agindo na diferenciação e na proliferação celulares (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Em células endoteliais humanas e epiteliais ectocervicais, o estradiol é capaz de regular a permeabilidade paracelular ao modular a expressão da ocludina (Ye *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2006; Gorodeski, 2007b; a). Em concordância, a mucosa ileal de ratas em proestro mantém a integridade da barreira epitelial intestinal preservada em comparação aos machos, bem como menor alteração na permeabilidade, durante condições de hipóxia e acidose (Homma *et al.*, 2005). No cólon, o estradiol atuando via ER β reduz a permeabilidade intestinal e aumenta a expressão de ocludina sugerindo um efeito protetor desse esteroide gonadal na estrutura do epitélio intestinal (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Em conformidade com esses dados, camundongos ER β -/- apresentam distribuição anormal e irregular dos contatos entre as células epiteliais do cólon (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Diante disso, uma nova função protetora do estradiol na preservação da barreira intestinal amplia seus efeitos benéficos no trato gastrointestinal, possivelmente atuando como mediador anti-inflamatório, reduzindo a infiltração de neutrófilos e produção de citocinas como observado na colite (Verdu *et al.*, 2002). Com isso, esses resultados sugerem que o estradiol afeta a permeabilidade colônica em condições fisiológicas por meio da regulação da integridade das TJ (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Apesar da expressão dos ERs ter sido demonstrada em células do sistema imune e enterócitos, a participação do estradiol na manutenção da integridade epitelial intestinal durante a inflamação sistêmica ainda é pouco conhecida, bem como os seus mecanismos de ação.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal induzida pela inflamação sistêmica em ratas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão dos receptores clássicos do estradiol (ER α e ER β) nas mucosas ileal e colônica.
- Avaliar o efeito do estradiol na permeabilidade intestinal e translocação bacteriana induzidas pela administração do LPS.
- Avaliar o efeito do estradiol na ativação de mastócitos na mucosa intestinal durante a inflamação sistêmica induzida por LPS, pela análise da degranulação dos mastócitos por histologia e liberação de proteases (como quimase e triptase) por *Western blot*. Além disso, analisar a permeabilidade intestinal após a estabilização farmacológica de mastócitos.
- Avaliar o efeito do estradiol na síntese de mediadores inflamatórios no plasma, íleo e cólon durante a inflamação sistêmica induzida por LPS, assim como a migração de neutrófilos para a mucosa intestinal.
- Analisar os fatores de transcrição (NF- κ B e I κ B) ativados por LPS envolvidos na produção de citocinas nas mucosas intestinais.
- Avaliar o efeito do estradiol na expressão de proteínas estruturais das TJ e JA, bem como na apoptose de células epiteliais do íleo e do cólon durante a inflamação sistêmica.
- Analisar a localização das proteínas constituintes das TJ e JA por imunofluorescência e a abertura das mesmas por microscopia eletrônica de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas *Wistar*, com massa corporal entre 200-250 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. As ratas foram mantidas em caixas plásticas coletivas (40x32x17cm), sob ciclo claro-escuro de 12:12 h (luz das 7:00 - 19:00 h) e temperatura controlada (25 ± 2 °C). Água e ração balanceada (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil) foram oferecidas *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Protocolo nº 164/2013). Os experimentos foram realizados no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

3.2 ANESTESIA E CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS

Nos experimentos 1, 2 e 3 (detalhados na seção 3.7) as ratas foram anestesiadas com uma solução de ketamina (cloridrato de cetamina, Agener, São Paulo, SP, Brasil; 55 mg/kg peso corporal, i.p.) e xilazina (Copazine, Coopers, Cotia, SP, Brasil; 10 mg/kg peso corporal, i.p.) para ovariectomia, teste de permeabilidade intestinal e coleta de tecidos. Já para a cirurgia de canulação da jugular, as ratas foram anestesiadas com 2,2,2-tribromoetanol (250 mg/kg i.p., dissolvido em PBS 0,1 M; Aldrich, Milwaukee, WI, EUA).

Como cuidados pós-cirúrgicos, após a ovariectomia os animais receberam profilaxia antibiótica (Pentabiótico®, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil; 0,1 mL/rato, i.m.) e analgésico (Flunixin, Banamine®, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil; 2 mg/Kg peso corporal, s.c.).

3.3 OVARIECTOMIA

Sob anestesia geral, as ratas foram ovariectomizadas bilateralmente, utilizando incisões laterais de cerca de 1 cm, por meio dos quais os ovários e o útero foram cuidadosamente expostos e após a ligadura entre essas duas estruturas os ovários

foram removidos. Depois da cirurgia, as ratas receberam tratamento profilático com antibiótico e analgésico, anteriormente descritos, e foram colocadas em caixas coletivas, onde permaneceram até o dia do experimento.

3.4 TRATAMENTO HORMONAL

Aproximadamente 10-12 dias após a ovariectomia, as ratas receberam tratamento hormonal com cipionato de estradiol (Pfizer, Paulínia, SP, Brasil), administrado por via subcutânea por 3 dias consecutivos em 2 doses diferentes, 50 ou 100 µg/kg em 0,1 mL. Os grupos controles receberam injeção subcutânea de óleo de milho, veículo utilizado para a diluição do cipionato de estradiol.

3.5 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

No dia anterior aos experimentos 1, 2 e 3; as ratas tiveram a veia jugular externa direita canulada para administração de drogas. Sob anestesia geral induzida com 2,2,2-tribromoetanol, um cateter de silicone (Silastic, Dow Corning, Midland, MI, EUA) foi introduzido no átrio direito através da veia jugular conforme técnica previamente descrita (Saia *et al.*, 2013).

3.6 COLETA DE SANGUE TOTAL

O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos de polipropileno contendo heparina sódica (1500 UI/tubo) e mantidos em gelo. Imediatamente após, o sangue foi centrifugado (3000 rpm, por 20 min, a 4°C) para separação e obtenção do plasma, o qual foi armazenado a -70°C até o momento de cada dosagem.

3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeito do estradiol na permeabilidade intestinal

As ratas foram ovariectomizadas e mantidas para recuperação durante 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram tratadas com cipionato de estradiol (50 ou 100 µg/kg, s.c.) ou óleo (controle), sendo o experimento

realizado no terceiro dia após o início do tratamento. As doses e as vias de administração do estradiol empregadas foram adotadas com base em estudo prévio (Ribeiro *et al.*, 2017).

No segundo dia de reposição com óleo ou estradiol foi feita a canulação da veia jugular para a administração de salina ou LPS. Já no terceiro dia, 1,5 h após a injeção de óleo de milho ou ECP, as ratas receberam uma injeção intravenosa de salina ou LPS (i.v., 1,5 mg/kg; *Escherichia coli* sorotipo O111:B4, Sigma, St. Louis, MO, EUA). A permeabilidade intestinal foi determinada 6h após a administração de LPS ou salina pela injeção de dextrana FITC 4 kDa (FD-4) no cólon ou no íleo. Após 1 h da injeção de FD-4 foi feita a coleta de sangue por punção cardíaca para posterior quantificação por espectrofluorimetria.

Experimento 2: Efeito do estradiol na preservação do epitélio intestinal

Este experimento teve por objetivo avaliar a importância do estradiol na translocação bacteriana, na produção de citocinas intestinais, na expressão e localização das proteínas constituintes das TJ e JA e no grau de dano na estrutura epitelial intestinal induzida pela administração do LPS. Para tanto, as ratas foram ovariectomizadas e mantidas para recuperação durante 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram tratadas com cipionato de estradiol (50 ou 100 µg/kg, s.c.) ou óleo (controle), sendo o experimento realizado no terceiro dia após o início do tratamento.

No segundo dia de reposição foi feita a canulação da veia jugular para a administração de salina ou LPS. Já no último dia da reposição, após 1,5 h as ratas receberam uma injeção i.v. de salina ou LPS e após 6 h dessa administração, foram anestesiadas para a coleta de sangue e tecidos. Os linfonodos mesentéricos foram coletados para análise microbiológica após 24 h de incubação sob condições aeróbicas. Os segmentos intestinais foram isolados, seccionados, coletados, lavados e a mucosa de cada órgão foi removida pela raspagem da superfície com auxílio de lâmina de microscopia. As amostras foram imediatamente congeladas em gelo seco e armazenadas a -70°C até o momento das dosagens. Além disso, pequenos segmentos intestinais (2-3 cm) foram também coletados e fixados para técnicas diferentes, como histologia por microscopia óptica, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (segmentos de 0,5 cm).

Experimento 3: Efeito da estabilização dos mastócitos na permeabilidade intestinal

As ratas foram ovariectomizadas e mantidas para recuperação durante 10-12 dias antes do experimento. No dia anterior ao experimento foi feita a canulação da jugular no período da manhã e às 19 h foi administrado intraperitonealmente (i.p.) o estabilizador de mastócitos doxantrazole (10 mg/kg, cedido por Dr. René M. van den Wijngaard, Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research, Academic Medical Center, Amsterdam, Holanda) que foi diluído em solução fisiológica contendo 0,5 % de NaHCO₃ (pH 7,5) ou o seu correspondente veículo (van den Wijngaard *et al.*, 2012). Outra dose de doxantrazole foi administrada às 7 h da manhã do dia seguinte e 30 min depois a endotoxemia foi induzida pela injeção de LPS. A permeabilidade intestinal foi determinada 6h após a administração de LPS ou salina pela injeção de dextrana FITC 4 kDa (FD-4), no cólon ou no íleo. Após 1 h da injeção de FD-4 foi feita a coleta de sangue por punção cardíaca para posterior quantificação por espectrofluorimetria.

3.8 PERMEABILIDADE INTESTINAL

Para avaliar a disfunção da barreira intestinal, o método adotado foi o *ex vivo*, no qual avalia o transporte paracelular de marcadores fluorescentes do lúmen para a circulação sistêmica (Ribeiro *et al.*, 2017). Para tanto, a partir dos procedimentos descritos nos experimentos 1 e 3, 6 h após a administração do LPS ou salina, as ratas foram anestesiadas profundamente com solução de ketamina e xilazina (n=4-8 ratas por grupo experimental) e as porções do íleo ou do cólon foram massageadas com cuidado para a remoção do conteúdo luminal. No íleo, uma alça foi formada a partir de um segmento (de 5 cm) à 2 cm de distância da válvula íleo-cecal, com auxílio de dois fios de sutura. No cólon, uma alça foi formada a partir de um segmento (de 3 cm) à 2 cm de distância da válvula íleo-cecal. Posteriormente, com uma agulha gengival foram injetados no lúmen da alça, 300 µL de PBS contendo dextrana-FITC (FD4 - 4,0 kDa, 25 mg/mL), evitando a distensão da parede intestinal. O intestino retornou à cavidade abdominal e o abdômen foi fechado. O animal permaneceu anestesiado, aquecido e a alça intestinal protegida com papel alumínio para evitar a desidratação e emissão da fluorescência.

Cerca de 1h após a injeção dos marcadores na alça, o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos heparinizados, centrifugado e o plasma separado. Além disso, foram coletados os úteros, bem como foi feito o esfregaço vaginal para avaliar a efetividade do tratamento hormonal. As concentrações plasmáticas do marcador foram dosadas por espectrofluorimetria (Molecular Diagnostics, Sunnyvale, CA, EUA), comparando-as com curva padrão de concentrações conhecidas dos fluoróforos diluídos em plasma de ratas. A absorbância da dextrana-FITC foi medida em $\lambda_{\text{excitação}} = 485 \text{ nm}$ e de $\lambda_{\text{emissão}} = 530 \text{ nm}$.

3.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As amostras de tecidos provenientes dos linfonodos mesentéricos foram coletadas em condições assépticas e pesadas para a análise microbiológica. Os linfonodos foram dissecados da gordura mesentérica e um total de 5-10 foi coletado por cada rato. As amostras foram homogeneizadas em 200 μL de PBS estéril, e posteriormente, 80 μL do homogenato foram semeados em duplicata em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia Labs, Mumbai, Índia). Após 24 h de incubação aeróbia a 37°C, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado e os resultados expressos como UFCs por massa do tecido. A análise microbiológica visa avaliar a translocação de microrganismos a partir do intestino (Wu *et al.*, 2011).

3.10 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

A técnica utilizada para as dosagens de citocinas tanto no plasma quanto no homogenato da mucosa do íleo e do cólon foi a de ensaio imunoenzimático (ELISA). As placas de 96 poços (Maxisorp, NUNC) foram sensibilizadas com 50 μL /poço de anticorpo de captura específico para cada citocina [anti-IFN- γ (2 $\mu\text{g/mL}$), anti-TNF α (4 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-10 (4 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-1 β (0,8 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-6 (4 $\mu\text{g/mL}$)], (OptEIA BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), diluídos em PBS e incubadas a 4°C por 18-22 h. As placas foram lavadas com PBS/ Tween-20 (0,05%) e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com 100 μL /poço de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) por 2 h à temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão da proteína recombinante de cada citocina (50 μL) foram adicionadas à placa e incubadas por 16-24 h a 4°C. Após este período, as

placas foram lavadas novamente, 50 µL do anticorpo biotilado (nas concentrações de IFN- γ = 150 ng/mL, TNF α = 225 ng/mL, IL-10 = 300 ng/mL, IL-1 β = 350 ng/mL, IL-6 = 400 ng/mL,) foram adicionados e incubados por 1-2 h à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo não-ligado foi removido por nova lavagem e, posteriormente, o conjugado avidina-peroxidase (1:5000) acrescido a cada poço por 30 min. As placas foram lavadas e, a seguir, 50 µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina; BD) misturado em partes iguais com solução de peróxido de hidrogênio, adicionado a cada poço. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N e a absorbância determinada em comprimento de onda de 450 nm (ELISA Plate Scanner; Molecular Devices Corporation). Os resultados foram expressos em pg /mL.

3.11 ATIVIDADE DA ENZIMA MPO

A atividade da enzima MPO é um marcador quantitativo para avaliar o grau de inflamação e estimar a infiltração de neutrófilos nos tecidos (Bradley *et al.*, 1982). Os produtos primários da ação de MPO, o ácido hipocloroso gera produtos secundários com amplas ações biológicas em eventos de apoptose e condução do processo inflamatório. As mucosas ileal e colônica foram dosadas por uma técnica adaptada proposta por Barone *et al.* (1992). Aproximadamente 100 mg de amostra da mucosa foi homogeneizada com Polytron em 200 µL tampão salino EDTA-fosfato de sódio-HCl, pH 4,7, centrifugado a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado em 500 µL de NaCl 0,2% gelado (para lisar as hemácias) e agitado no vórtex. Após 30 minutos foi adicionado 500 µL de solução NaCl 1,6% com glicose 5% gelado. A solução foi novamente centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuscitado com 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 5.4, contendo 0,5% de HTAB (Brometo de Hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio – Sigma), detergente iônico que solubiliza a MPO facilitando sua extração. A solução foi homogeneizada em Polytron e centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos 4°C. A atividade da MPO foi medida no sobrenadante por ensaio enzimático. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. O tampão fosfato de sódio 0,08 M foi adicionado à amostra em um volume total de 50 µL/ poço. Os procedimentos seguiram a adição de 25 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – Sigma) e adição de 100 µL de H₂O₂, em seguida foi incubado por 5 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 4M. A

absorbância das amostras foi medida a 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em DO (densidade óptica) por mg de proteína.

3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras do íleo e do cólon foram fixadas em formol tamponado a 10%. Em seguida foram submetidas a uma série de sessões de desidratação crescente e posteriormente embebidas em parafina. Após esse procedimento, as amostras foram seccionadas (6 μ m) e coradas com hematoxilina e eosina, ou azul de toluidina, descritas separadamente a seguir. Após as lâminas terem sido coradas, todas as secções foram fotografadas em microscópio óptico DMC 2900 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Nos cortes corados com hematoxilina e eosina foi avaliada a histologia intestinal no íleo e no cólon, às cegas, conforme escores determinados em estudos anteriores (Lobo *et al.*, 2003, Costantini *et al.*, 2010): grau 0 = mucosa normal; grau 1 = injúria leve, formação de espaço subepitelial/edema; grau 2 = injúria moderada, extensão do espaço subepitelial com moderada elevação da camada epitelial da *lamina propria*/necrose do vilo; grau 3 = injúria severa, massiva elevação epitelial abaixo das laterais das vilosidades, com evidência de infiltrado celular na submucosa; grau 4 = injúria grave, vilo desnudo com *lamina propria* e capilares dilatados expostos; grau 5 = digestão e desintegração da *lamina propria*, hemorragia e ulceração. Já a quantificação dos mastócitos se deu pela contagem das células coradas em roxo em virtude da heparina nos seus grânulos citoplasmáticos.

Os cortes corados com solução de azul de toluidina (1 g de azul de toluidina O-Sigma dissolvido em 70 % de etanol) foram utilizados para estimar a degranulação dos mastócitos (Nogueira *et al.*, 2017). 10 mL dessa solução foi então diluída em 90 mL de 0,5 N de HCl (pH = 0,5) e os cortes foram incubados por 7 dias, sendo a solução filtrada todos os dias.

O número total de mastócitos foi contado manualmente, às cegas, considerando três cortes por rata e dez campos por corte (onde o mais alto número de mastócitos foi visto). Os mastócitos foram quantificados de acordo com a coloração, nos quais a coloração mais escura sugere ser mastócitos granulados e os de coloração mais clara sugerem ser mastócitos degranulados. Os resultados foram expressos como o total de mastócitos por campo e também como a porcentagem de

mastócitos de coloração mais clara e mais escura pela quantidade total de mastócitos (Nogueira *et al.*, 2017).

3.13 DOSAGEM HORMONAL

As concentrações plasmáticas de corticosterona e 17 β -estradiol foram avaliadas pelo método de radioimunoensaio (RIE). Todas as amostras foram medidas no mesmo ensaio para evitar variações inter-ensaio. A corticosterona foi separada dos demais elementos plasmáticos por extração com álcool absoluto, liofilizada e armazenada em -20°C até a realização do radioimunoensaio, no qual utilizamos anticorpo primário e padrão adquiridos comercialmente (Sigma, St. Louis, MO, EUA), hormônio triciado Amersham (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA) e separação por carvão. O limite de detecção foi de 0,04 ng/mL e o valor de variação intra-ensaio foi de 5%.

As concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol foram determinadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo usando Kit MP Biomedical® Double Antibody (Eschwege, Alemanha). O limite de detecção e o valor de variação intra-ensaio foi de 1,5 pg/ml e 3,5 %, respectivamente.

3.14 WESTERN BLOT

Nas amostras de mucosa de íleo e cólon foi avaliada a expressão dos receptores de estradiol (ER α e ER β), das proteínas constituintes das TJ (claudina-1, claudina-2, ocludina, e JAM-A), junção aderente E-caderina, dos fatores de transcrição [NF-kB (p65) e I κ B], das proteases de mastócitos quimase e triptase, e da caspase-3. Para controle da especificidade dos anticorpos anti-ER α e anti-ER β , tecidos positivos para a expressão dos receptores foram avaliados concomitantemente (útero e coração, respectivamente).

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 1% SDS), acrescido com 4% (volume/volume) de coquetel com inibidores de proteases (CComplete, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). O material homogeneizado foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C, por 30 minutos. A concentração de proteínas totais no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando soro albumina bovina como padrão. Alíquotas de proteínas (100 µg) foram desnaturadas (95°C por 4 min), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). As membranas contendo as amostras transferidas foram bloqueadas “*overnight*” a 4°C em tampão TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) contendo 5% BSA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada “*overnight*” a 4°C com um dos anticorpos primários: anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-ERα (1:150; Santa Cruz Biotechnology) anti-ERβ (1:150; Santa Cruz Biotechnology), anti-claudina-1 (1:250; Sigma), anti-occludina (1:350; Sigma), anti-JAM-A (1:350; Sigma), anti-triptase (1:150, Santa Cruz Biotechnology); e anticorpos monoclonais produzidos em camundongo anti-E-caderina (1:150; Santa Cruz Biotechnology), anti-NF-κB p65 (1:500; Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-IκB-α (1:150, Santa Cruz Biotechnology), anti-quimase (1:150, Santa Cruz Biotechnology), anti-Caspase-3 (1:200, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA); contendo 2,5% de BSA. Subsequentemente, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada por 1h à temperatura ambiente com um dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase: anti-IgG de coelho (1:10000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA) anti-IgG de camundongo (1:10000; Jackson ImmunoResearch). A banda representativa do complexo proteína alvo-anticorpo foi visualizada por quimioluminescência, através da incubação com luminol/ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e capturada em raio-X. A quantificação das bandas foi analisada por densitometria óptica usando o programa *Image J* (National Institute of Health, Bethesda, MA, EUA), sendo todas as marcações normalizadas com a β-actina constitutiva de cada tecido.

3.15 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A localização das proteínas constituintes das TJ foi determinada por imunofluorescência em cortes de 12 µm tanto para o íleo quanto para o cólon. A imunofluorescência já havia sido padronizada em nosso trabalho prévio (Ribeiro *et al.*, 2017). Os segmentos do íleo e do cólon foram fixados em em tampão fosfato salino pH: 7,4 (PBS) contendo paraformaldeído a 4%, por 6h à temperatura ambiente. Após esse tempo, os segmentos foram imersos em sacarose à 30% e armazenados por 3

dias à 4°C. Os segmentos foram então posicionados no criostato e seccionados. Os cortes foram lavados rapidamente com glicina (0,1M) para a remoção do excesso de paraformaldeído, permeabilizados com 0,5% de Triton X-100 por 10 minutos, lavados com PBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 5% de soro albumina bovina (BSA; Santa Cruz Biotechnology) em tampão fosfato salino pH: 7,4 e 0,5% de triton X-100 por 1h à temperatura ambiente. Depois disso, os cortes foram lavados e incubados *overnight* à 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-claudina-1 (1:25; Sigma), anti-occludina (1:25; Sigma), anti-JAM-A (1:25; Sigma); e anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-E-caderina (1:25; Santa Cruz Biotechnology); em solução com 5% de BSA em tampão fosfato salino pH: 7,4 e 0,5% de triton X-100. No outro dia, os cortes nas lâminas foram lavados 5 vezes e incubados com o secundário anti-coelho conjugado com Texas Red (1:300; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) ou anti-camundongo Alexa Fluor (1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Finalmente, a marcação nuclear foi feita com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 1 µg/mL, Sigma-Aldrich) por 10 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram então montadas sobre as lâminas usando Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) como meio de montagem, visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss KS 300, Thornwood, NY). Foi realizado o controle negativo dos anticorpos primários, em que os mesmos foram omitidos e os cortes foram somente incubados com os anticorpos secundários. Não foram observadas marcações nesses controles.

3.16 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os tecidos do íleo e cólon foram fixados em glutaraldeído a 3% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M durante 3 h à temperatura ambiente e lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M. Posteriormente, os tecidos foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, desidratados e embebidos em resina epoxi. As seções ultrafinas foram cortadas, coradas e examinadas em Jeol JEM -100CX (Peabody, MA, EUA), microscópio eletrônico equipado com um sistema digital para microscopia eletrônica de transmissão convencional. A morfologia da JA e da TJ foi avaliada em, pelo menos 15 regiões de junção/secção. O comprimento da abertura se deu na maior

abertura na região da JA e da TJ, e os valores foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Todas as amostras foram quantificadas no mesmo ensaio para evitar variação inter-ensaio. Os dados foram comparados usando o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) e as diferenças obtidas pelo pós-teste de Bonferroni (GraphPad Software version 5.0, San Diego-CA, USA). No experimento 3 foi realizado o teste *t* de Student não-pareado, devido a presença de somente uma variável. A injúria histológica foi analisada estatisticamente usando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Valores foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CIPIONATO DE ESTRADIOL NO MODELO ENDOTOXÊMICO

Inicialmente avaliou-se a efetividade do tratamento com o estradiol. Para tanto, o útero foi removido e o peso úmido foi calculado em relação à massa corporal (Figura 1A). As ratas tratadas com óleo apresentaram um peso de útero (OVX: $577 \pm 41,48$ mg/kg p.c.) inferior quando comparado ao útero dos animais tratados com cipionato de estradiol nas duas doses avaliadas (OVX+E2 50 μ g/kg: $1455 \pm 105,2$ mg/kgp.c. e OVX+E2 100 μ g/kg: $1882 \pm 162,8$ mg/kgp.c.) ($p < 0,05$). O peso uterino em ratas tratadas com cipionato de estradiol na dose de 100 μ g/kg foi maior do que em ratas tratadas na dose de 50 μ g/kg ($p < 0,05$).

Figura 1. Efeito do tratamento com cipionato de estradiol no peso relativo uterino e nas concentrações plasmáticas do estradiol. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas com óleo ou estradiol em duas concentrações: 50 μ g/kg (OVX+E2 50 μ g/kg) ou 100 μ g/kg (OVX+E2 100 μ g/kg), por 3 dias consecutivos. O útero foi removido e o peso úmido foi calculado em relação à massa corporal (A). As concentrações plasmáticas de estradiol foram quantificadas por radioimunoensaio (B). * $p < 0,05$ comparado com o grupo OVX e # e & $p < 0,05$ comparando com o grupo OVX+E2 50 μ g/kg. Dados são expressos como Média $\pm$ E.P.M. ($n = 7-10$ animais por grupo).

Além da avaliação do peso uterino foi realizada a dosagem de 17 β -estradiol para a monitorização das concentrações plasmáticas devido a administração do cipionato de estradiol. Esse tratamento aumentou as concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol de forma dose-dependente em comparação aos grupos com administração de óleo ($p < 0,05$) (Figura 1B). A indução da endotoxemia não alterou as concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol em comparação aos respectivos grupos controle tratados com salina.

Além da avaliação das concentrações plasmáticas de estradiol, também foram avaliadas as concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias. A administração intravenosa de LPS na dose de 1,5 mg/kg induziu a produção sistêmica de todas as citocinas avaliadas (IL-10, TNF α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β). Esses resultados estão de acordo com dados anteriormente publicados (Saia *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2017).

Para avaliar o possível efeito anti-inflamatório do estradiol, as ratas tratadas com as duas doses de cipionato de estradiol, previamente à administração do LPS, exibiram concentrações plasmáticas maiores da citocina anti-inflamatória IL-10 (OVX+E2 50 μ g/kg: 1107 $\pm$ 119,2 pg/mL; OVX+E2 100 μ g/kg: 1060 $\pm$ 82,6 pg/mL) quando comparadas àquelas tratadas com salina (OVX: 2,47 $\pm$ 1,58 pg/mL; OVX+E2 50 μ g/kg: 9,5 $\pm$ 5,12 pg/mL; OVX+E2 100 μ g/kg: 13,41 $\pm$ 9,7 pg/mL) e ratas ovariectomizadas tratadas com óleo e LPS (OVX: 678,1 $\pm$ 70,13 pg/mL) ($p < 0,05$) (Figura 2A).

As ratas tratadas com estradiol e LPS apresentaram tendência de redução das concentrações plasmáticas das citocinas TNF α , IL-6, e IFN- γ (Figura 2B, 2C e 2D; respectivamente). No entanto, apenas uma redução significativa de IL-1 β (Figura 2E) em ratas previamente tratadas com estradiol na maior dose (OVX+E2 100 μ g/kg: 102,7 $\pm$ 17,52 pg/mL) quando comparadas às ratas endotoxêmicas tratadas com óleo (OVX: 169,9 $\pm$ 17,51 pg/mL) ($p < 0,05$).

Figura 2. O estradiol reduz as concentrações plasmáticas de IL-1 β e aumenta as concentrações plasmáticas de IL-10 e corticosterona durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 μ g/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). O sangue foi coletado por punção cardíaca 6 h após a administração do LPS (1,5 mg/kg, i.v.) ou salina. As concentrações plasmáticas das citocinas [IL-10 (A), TNF α (B), IL-6 (C), IFN γ (D) e IL-1 β (E)] foram quantificadas por ELISA e as concentrações plasmáticas de corticosterona foram quantificadas por radioimunoensaio (F). * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX + LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n = 7-10$ animais por grupo).

Adicionalmente, as concentrações plasmáticas de corticosterona foram avaliadas (Figura 2F). A administração do LPS estimula o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo mecanismo envolvendo a liberação de citocinas, as quais ativam o sistema CRH-ACTH e com consequente aumento da secreção de glicocorticoide (Rivest, 2010). De fato, a administração do LPS estimulou a secreção de corticosterona em todos os grupos avaliados (OVX: $219,1 \pm 10,85$; OVX+E2 50 μ g/kg: $248,3 \pm 24,6$; OVX+E2 100

$\mu\text{g/kg}$: $331,6 \pm 58,9$) comparados aos seus respectivos grupos controle (OVX: $81,48 \pm 16,13$; OVX+E2 $50 \mu\text{g/kg}$: $115,9 \pm 25,9$; OVX+E2 $100 \mu\text{g/kg}$: $116,8 \pm 17,8$) ($p < 0,05$). O estradiol alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona, demonstrando a sua interação com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. As ratas endotoxêmicas tratadas com estradiol na maior dose apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona em comparação com as ratas tratadas com óleo e LPS ($p < 0,05$). Sugere-se que o aumento da corticosterona circulante, como observado no presente estudo em ratas tratadas com altas doses de estradiol, possui ação anti-inflamatória e efeito imunossupressor (Zhang and Daynes, 2007; Frank *et al.*, 2010).

4.2 ER α E ER β SÃO EXPRESSOS NAS MUCOSAS ILEAL E COLÔNICA E O ESTRADIOL PREVINE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDUZIDOS PELA ENDOTOXEMIA

Tendo em vista que as doses de estradiol foram efetivas em aumentar o peso uterino e as concentrações plasmáticas de 17β -estradiol, subsequentemente foi investigado o efeito desse hormônio gonadal no epitélio intestinal. Primeiramente, seria importante verificar a presença dos receptores de estrógeno nas mucosas ileal e colônica, assim como possíveis alterações em suas expressões durante a endotoxemia.

No íleo, a expressão do ER α e ER β não foram alteradas pelo tratamento com o estradiol e nem tampouco pela administração do LPS (Figuras 3A, 3B, 3D e 3E). Entretanto, no cólon, a reposição com estradiol aumentou a expressão dos dois subtipos de ER. O estradiol provocou a *upregulation* de ER α nos grupos controles em 11,7 e 13,28 vezes nas ratas tratadas com estradiol nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo (Figura 3C) ($p < 0,05$). Em relação aos animais endotoxêmicos, o estradiol provocou a *upregulation* de ER α em 12,82 e 2,26 vezes nos grupos de ratas OVX+E2 $50 \mu\text{g/kg}$ ($p < 0,05$) e OVX+E2 $100 \mu\text{g/kg}$, respectivamente (Figura 3C). O estradiol também induziu o aumento na expressão de ER β nos grupos tratados com LPS, havendo um aumento de 4,72 e 4,87 vezes nos grupos de ratas OVX+E2 $50 \mu\text{g/kg}$ e OVX+E2 $100 \mu\text{g/kg}$ ($p < 0,05$), respectivamente, em relação ao grupo de ratas tratadas com óleo. Em relação ao grupo tratado com óleo e salina, ocorreu uma *upregulation* de ER β de 4,14 e 4,28

vezes nos grupos de ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg ($p<0,05$) (Figura 3F).

Figura 3. O estradiol aumenta a expressão de ERβ no íleo e no cólon durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). As mucosas ileal e colônica foram coletadas, as proteínas totais foram extraídas e a expressão dos subtipos de ER foi determinada por *western blot*. A representação dos *imunoblots* de ERα (A) e ERβ (D) e a análise de densitometria das bandas (expressos como porcentagem em relação ao grupo controle) para ERα no íleo (B) e no cólon (C) e de ERβ no íleo (E) e no cólon (F). A expressão de β-actina foi utilizada como controle interno. * $p<0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p<0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n=3-6$ animais por grupo).

Após a confirmação da expressão dos receptores ERα e ERβ na mucosa intestinal, foi investigado o efeito do tratamento com estradiol na permeabilidade intestinal e na translocação bacteriana. A administração do LPS aumentou as concentrações plasmáticas de FD-4 tanto no íleo (OVX: $3,59 \pm 1,12$ µg/mL) quanto no cólon (OVX: $1 \pm 0,2$ µg/mL) em ratas tratadas com óleo ($p<0,05$) (Figura 4A e 4B, respectivamente). Além disso, o estradiol preveniu o aumento na permeabilidade intestinal induzido pela endotoxemia nas duas doses avaliadas no íleo (OVX+E2 50 µg/kg: $9,5 \pm 5,12$ µg/mL; OVX+E2 100 µg/kg: $0,47 \pm 0,14$ µg/mL) e no cólon (OVX+E2

50 µg/kg: $0,25 \pm 0,07$ µg/mL; OVX+E2 100 µg/kg: $0,72 \pm 0,12$ µg/mL) em relação ao grupo de ratas tratadas com óleo e LPS (OVX; íleo: $3,58 \pm 1,12$ µg/mL e cólon: $1,04 \pm 0,2$ µg/mL) ($p < 0,05$).

Figura 4. O estradiol reduz a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A permeabilidade intestinal foi determinada 6 h após a administração do LPS (1,5 mg/kg, i.v.) ou salina pela injeção de dextrana (FD-4) em alças formadas no íleo (A) e no cólon (B). As concentrações plasmáticas de FD-4 foram determinadas por espectrofluorimetria. Seguindo o mesmo protocolo experimental, porém em outro experimento independente, os linfonodos mesentéricos foram coletados, pesados, homogeneizados e semeados em duplicata em ágar infusão de cérebro e coração (BHI). Após 24 h de incubação aeróbia, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado e os resultados expressos como UFCs por massa do tecido. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6-10 animais por grupo).

O aumento na permeabilidade intestinal permite a passagem de enterobactérias, endotoxinas e peptídeooglicanos pelos linfonodos mesentéricos, circulação portal e distribui-se pelo organismo induzindo a disfunção de múltiplos órgãos (Deitch, 1990; Senthil *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2014). Em conformidade com esses dados, a administração do LPS aumentou a translocação bacteriana em ratas tratadas com óleo (OVX: $47,64 \pm 9,2$ UFC/g tecido) em comparação aos demais grupos (salina- OVX: $3,1 \pm 1,64$ UFC/g tecido; OVX+E2 50 µg/kg: $1,05 \pm 1,05$ UFC/g tecido; OVX+E2 100 µg/kg: $3,61 \pm 1,6$ UFC/g tecido) ($p < 0,05$). Entretanto, nas ratas tratadas previamente com as duas doses estradiol (50 µg/kg ou 100 µg/kg) não

ocorreu um aumento da quantidade de bactérias translocadas para os linfonodos mesentéricos tanto em relação aos grupos salinas quanto ao grupo OVX+LPS (Figura 4C). Esses dados sugerem que o estradiol atua protegendo o epitélio intestinal em condição de inflamação sistêmica, consequentemente impedindo que bactérias presentes no lúmen intestinal alcancem múltiplos órgãos a partir dos linfonodos mesentéricos.

4.3 O EFEITO DO ESTRADIOL NA PRESERVAÇÃO DA ARQUITETURA DO EPITÉLIO INTESTINAL

Em conformidade com os dados supracitados, os escores de lesão histológica demonstraram danos à mucosa epitelial ileal e colônica em ratas endotoxêmicas. Em contrapartida, em ratas com a administração prévia do estradiol, as mucosas intestinais apresentam-se mais próximas da normalidade (íleo: Figura 5B; cólon: Figura 6B) ($p < 0,05$). As Figuras 5I e 6I representam um epitélio normal das ratas tratadas com óleo e salina, já nas Figuras 5II e 6II, nas ratas tratadas com óleo e LPS, há uma injúria de escore moderado no epitélio intestinal, caracterizada por um aumento do espaço subepitelial com elevação da camada epitelial da *lamina propria*, redução na quantidade de células e glândulas, formação de edema e aumento da infiltração de células inflamatórias. Essas alterações foram reduzidas pela administração prévia com estradiol, havendo uma reversão quase completa da injúria ao epitélio intestinal nas ratas do grupo OVX+E2 100 µg/kg (íleo: Figura 5V; cólon: Figura 6V).

Figura 5. O estradiol diminui o escore de lesão induzido pela endotoxemia no íleo. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Um segmento do íleo foi removido, processado e corado com hematoxilina-eosina. Em A: I-ratas controle overiectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 ug/Kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 ug/Kg e LPS (20x de aumento). Escala: 100 µm. Em B: escore da injúria ileal. O escore de injúria intestinal foi determinada numa escala de 0 (normal) à 5 (severa) e a mediana foi determinada. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS (n=6-9 animais por grupo).

Figura 6. O estradiol diminui o escore de lesão induzido pela endotoxemia no cólon. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Um segmento do cólon foi removido, processado e corado com hematoxilina-eosina. Em A: I-ratas controle overiectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 ug/Kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 ug/Kg e LPS (20x de aumento). Escala: 100 µm. Em B: escore da injúria ileal. O escore de injúria intestinal foi determinada numa escala de 0 (normal) à 5 (severa) e a mediana foi determinada. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS (n=6-9 animais por grupo).

4.4 O ESTRADIOL PREVINE A ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO, LOCALIZAÇÃO E ABERTURA DAS TJ E JA NA ENDOTOXEMIA

A manutenção da integridade do epitélio intestinal depende dos complexos proteicos existentes nas TJ, responsáveis pela adesão célula-célula e seletividade no transporte paracelular (Groschwitz and Hogan, 2009; Markov *et al.*, 2010). Durante a

endotoxemia, várias citocinas sintetizadas contribuem diretamente para a disfunção na barreira intestinal (Al-Sadi *et al.*, 2008). Os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e NO) envolvem o aumento no transporte paracelular intestinal a marcadores adicionados ao lúmen, além da diminuição na resistência elétrica transepitelial. De modo geral, os mecanismos envolvidos estão associados à inibição na expressão de proteínas integrantes das TJ e JA (Yamamoto *et al.*, 2004; Al-Sadi *et al.*, 2008). Desta forma, avaliamos a expressão, localização de proteínas constituintes das TJ (claudina-1, ocludina, JAM-A) e da JA (E-caderina), bem sua abertura.

O tratamento com estradiol reverteu a disfunção da barreira epitelial induzida pela administração do LPS por meio do aumento da expressão das proteínas constituintes das TJ. No íleo, o LPS reduziu a expressão de claudina-1 (7,2 vezes; Figura 7B), ocludina (3,67 vezes; Figura 7C) e E-caderina (12,7 vezes; Figura 7E) em ratas tratadas com óleo em comparação a ratas tratadas com óleo e salina. O estradiol reverteu o efeito do LPS, aumentando a expressão de claudina-1 (OVX+E2 100 μ g/kg: 7,8 vezes), ocludina (OVX+E2 100 μ g/kg: 3,5 vezes), JAM-A (OVX+E2 50 μ g/kg: 4,5 vezes) e E-caderina (OVX+E2 100 μ g/kg: 16,4 vezes) quando comparada ao grupo de ratas tratadas com óleo. Adicionalmente, em ratas que receberam salina, o estradiol aumentou a expressão da claudina-1 (OVX+E2 100 μ g/kg: 3,5 vezes) e JAM-A (OVX+E2 50 μ g/kg: 3,5 vezes) em relação às ratas tratadas com óleo ($p < 0,05$).

Figura 7. O estradiol modula a expressão das proteínas constituintes das TJ na mucosa ileal durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 μg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa ileal foi coletada, as proteínas totais foram extraídas e a expressão das proteínas foram determinadas por *western blot*. Uma representação dos *imunoblots* (A) e os valores relativos de densitometria (expressos como porcentagem do controle) para claudina-1 (B), ocludina (C), JAM-A (D) e E-caderina (E) na mucosa lisada. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * p<0,05 comparado ao grupo OVX SAL, # p<0,05 em relação ao grupo OVX LPS e φ p<0,05 em relação ao grupo OVX+E2 100 μg/kg. Dados expressos em média ± E.P.M. (n=3-6 animais por grupo).

No cólon, o estradiol também atuou na modulação da expressão das proteínas constituintes das TJ, entretanto não alterou a expressão da proteína constituinte da JA. O LPS reduziu a expressão de claudina-1 (2,4 vezes; Figura 8B) e JAM-A (2,88 vezes; Figura 8D) em comparação às ratas tratadas com óleo e salina. Além disso, o LPS reduziu a expressão de ocludina (2,82 vezes; Figura 8C) em ratas tratadas com óleo em comparação às ratas do grupo OVX+E2 100 μg/kg (p<0,05) tratadas com salina. Em ratas do grupo OVX+E2 100 μg/kg houve reversão do efeito do LPS, aumentando a expressão de claudina-1 (2,8 vezes), ocludina (3,5 vezes) e JAM-A (3

vezes) em comparação às ratas tratadas com óleo ($p<0,05$). Entretanto, tanto a administração do estradiol quanto a de LPS não alterou a expressão de E-caderina (Figura 8E).

Figura 8. O estradiol modula a expressão das proteínas constituintes das TJ na mucosa colônica durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa ileal foi coletada, as proteínas totais foram extraídas e a expressão das proteínas foi determinada por *western blot*. Uma representação dos *immunoblots* (A) e os valores relativos de densitometria (expressado como porcentagem do controle) para claudina-1 (B), ocludina (C), JAM-A (D) e E-caderina (E) na mucosa lisada. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * $p<0,05$ comparado ao grupo OVX SAL, # $p<0,05$ em relação ao grupo OVX LPS e ϕ $p<0,05$ em relação ao grupo OVX+E2 100 µg/kg. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n=3-6$ animais por grupo).

Além da alteração na expressão das proteínas constituintes das TJ e JA, há alteração na localização das mesmas. Tanto na mucosa ileal quanto colônica, as proteínas claudina-1, ocludina, JAM-A e E-caderina dos grupos controles foram regularmente distribuídas continuamente ao longo das vilosidades (Figuras 9 e 10).

Contrariamente a esse padrão de organização das proteínas das TJ e JA, a administração de LPS reduziu não somente a intensidade da marcação, mas também tornou a disposição delas mais difusas, internalizando-as. Em ratas pré-tratadas com estradiol, há uma preservação maior do arranjo estrutural destas proteínas, pela manutenção da localização, possivelmente por uma menor clivagem das mesmas. De fato, a produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF α , promove a internalização de proteínas transmembrana das TJ (incluindo ocludina, JAM-1, claudina-1 e claudina-4), intensifica o desarranjo das TJ e também aumenta a atividade apoptótica do epitélio intestinal (Ma, Boivin, *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2006; Pacher *et al.*, 2007; Al-Sadi *et al.*, 2008; Boivin *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2010).

Figura 9. O estradiol previne a internalização das proteínas das TJ e JA no íleo durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Um segmento ileal foi removido, fixado e processado para imunofluorescência para claudina-1, ocludina, JAM-A e E-caderina (marcadas em vermelho) bem como o núcleo celular (azul). (40x de aumento). Escala: 50 µm. As setas indicam regiões com ausência ou internalização das TJ e JA.

Figura 10. O estradiol previne a internalização das proteínas das TJ e JA no cólon durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Um segmento do cólon foi removido, fixado e processado para imunofluorescência para claudina-1, occludina, JAM-A e E-caderina (marcadas em vermelho) bem como o núcleo celular (azul). (40x de aumento). Escala: 50 µm. As setas indicam regiões com ausência ou internalização das TJ e JA.

A análise ultraestrutural do epitélio intestinal por microscopia de transmissão mostrou um aumento na abertura na região das JA no íleo e na região das TJ e JA no cólon. Embora não houve diferença na abertura na região das TJ no íleo, a administração prévia de estradiol reduziu a abertura nessa região em 1,8 e 1,9 vezes nas ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg, respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo e LPS ($p<0,05$) (Figura 11B). Entretanto, na região das JA, a administração do LPS em ratas aumentou em 1,6 vezes a abertura em comparação ao grupo de ratas tratadas com óleo e salina ($p<0,05$). O estradiol reduziu a abertura na região das JA, em 1,89 e 1,78 vezes nas ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg, respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo ($p<0,05$) (Figura 11C).

Figura 11. O estradiol atenua a abertura das TJ e JA no íleo durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 ou 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Uma parte do íleo foi removida, fixada e analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Em A: I-ratas controle overiectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 µg/Kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 µg/Kg e LPS (40000x de aumento). Escala: 1 µm. Em B: quantificação da abertura na região das TJ e JA comparadas às ratas controle. As setas indicam as regiões analisadas com a presença de aberturas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M.

No cólon, o efeito da administração do LPS em ratas tratadas com óleo foi ainda mais evidente, visto que o grau de abertura foi aumentado tanto na região das TJ (1,43 vezes) quanto na região das JA (1,83 vezes) ($p < 0,05$). Porém, a administração prévia com estradiol reduziu a abertura na região das TJ em 1,66 e 1,77 vezes nas ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg, respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo e LPS ($p < 0,05$) (Figura 12B). Na região das JA, o estradiol reduziu a abertura em 1,58 e 2,38 vezes nas ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg,

respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo e LPS ($p < 0,05$) (Figura 12B).

Figura 12. O estradiol atenua a abertura das TJ e JA no cólon durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). Uma parte do cólon foi removida, fixada e analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Em A: I-ratas controle overiectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 ug/Kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 ug/Kg e LPS (40000x de aumento). Escala: 1 µm. Em B: quantificação da abertura na região das TJ e JA comparadas às ratas controle. As setas indicam as regiões analisadas com a presença de aberturas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M.

4.5 O EFEITO DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS MUCOSAS DO ÍLEO E DO CÓLON DURANTE A ENDOTOXEMIA.

Baseado nos resultados de redução de permeabilidade intestinal e de translocação bacteriana, uma das possíveis hipóteses de mecanismo de ação do estradiol poderia ser por meio de sua atividade anti-inflamatória, modulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6) envolvidas na disfunção da barreira epitelial intestinal.

Na mucosa ileal, a administração de LPS em ratas tratadas com óleo, provocou o aumento das concentrações de todas as citocinas avaliadas em relação aos grupos controle. As duas doses de estradiol reduziram as concentrações de TNF- α (Figura 13B) e IFN γ (Figura 13D) em comparação às ratas endotoxêmicas tratadas com óleo ($p < 0,05$). Entretanto, somente a dose maior de estradiol promoveu uma redução das concentrações de IL-1 β em comparação às ratas tratadas com óleo LPS ($p < 0,05$) (Figura 13E). Adicionalmente, o estradiol não alterou as concentrações da IL-10 (Figura 13A) e da IL-6 (Figura 13C).

Assim como na mucosa ileal, na mucosa colônica a administração prévia de estradiol não alterou as concentrações de IL-10. Entretanto, o estradiol promoveu uma redução de todas as citocinas pró-inflamatórias induzidas pela endotoxemia em comparação às ratas tratadas com óleo [TNF- α (Figura 14B), IL-6 (Figura 14C), IFN γ (Figura 14D) e IL-1 β (Figura 14E)] ($p < 0,05$). Esses dados sugerem que na mucosa intestinal, o estradiol exerce função moduladora na produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela endotoxemia.

Figura 13. O estradiol diminui a síntese de citocinas pró-inflamatórias na mucosa ileal durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa do íleo foi removida pela raspagem da superfície com auxílio de lâmina de microscopia e as concentrações das citocinas foram quantificadas por ELISA. As concentrações de IL-10 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), IFNγ (D) e IL-1β (E) foram determinadas 6h após a administração do LPS. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=5-10 animais por grupo).

Figura 14. O estradiol diminui a síntese de citocinas pró-inflamatórias na mucosa colônica durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa do cólon foi removida pela raspagem da superfície com auxílio de lâmina de microscopia e as concentrações das citocinas foram quantificadas por ELISA. As concentrações de IL-10 (A), TNFα (B), IL-6 (C), IFNγ (D) e IL-1β (E) foram determinadas 6h após a administração do LPS. * p<0,05 comparado aos grupos SAL e # p<0,05 em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média ± E.P.M. (n=5-10 animais por grupo).

A ação anti-inflamatória do estradiol pode estar relacionada à modulação na via do NF-kB, um importante fator de transcrição de mediadores inflamatórios. Além da redução na ativação e na translocação do NF-kB para o núcleo, o estradiol pode atuar em diversos mecanismos, incluindo as interações diretas proteína-proteína, a inibição da ligação do NF-kB ao DNA e a indução da expressão de IκB (inibidor da ativação do fator nuclear) (Ray *et al.*, 1994; Stein and Yang, 1995; Deshpande *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 1997). Para avaliar esse mecanismo de ação, a expressão de NF-kB (p65) e IκB foram determinadas nas mucosas intestinais.

A expressão de NF- κ B p65 foi aumentada em média 3 vezes no íleo (Figura 15B) e 2,5 vezes no cólon (Figura 15A e 15E) nas ratas tratadas com óleo e LPS em comparação às ratas tratadas com estradiol nas duas doses e salina ($p<0,05$). Já a administração prévia de estradiol reduziu a expressão do NF- κ B em 2,6 e 2,3 vezes nas ratas OVX+E2 50 μ g/kg e OVX+E2 100 μ g/kg, respectivamente, em comparação às ratas tratadas com óleo e LPS no íleo (Figura 15B) e no cólon (Figura 16B) ($p<0,05$).

Em relação à expressão do I κ B no íleo, nos grupos tratados com óleo, a administração de LPS reduziu a expressão I κ B em 3,96 vezes em comparação à administração de salina. Já em ratas OVX+E2 100 μ g/kg ocorreu um aumento de 3,36 vezes em comparação ao grupo óleo e LPS (Figura 15C) ($p<0,05$). Entretanto, tanto a administração do estradiol quanto a de LPS não alterou a expressão de I κ B no cólon (Figura 15F).

Figura 15. O estradiol reduz a expressão de NF-κB p65 no íleo e no cólon e aumenta a expressão de IκB no íleo durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 μg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). As mucosas ileal e colônica foram coletadas, as proteínas totais foram extraídas e a expressão das proteínas foi determinada por western blot. Uma representação dos *immunoblots* no íleo (A) e no cólon (D) e os valores relativos de densitometria (expressos como porcentagem do controle) para NF-κB no íleo (B) e cólon (E), para IκB no íleo (C) e no cólon (F) nos lisados. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n=3-6$ animais por grupo).

Para investigar a infiltração de neutrófilos e o grau da inflamação, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi avaliada. Somente em ratas tratadas com óleo, a administração do LPS aumentou a atividade da MPO em comparação às ratas cuja administração foi de salina, tanto na mucosa ileal (OVX: LPS = $0,36 \pm 0,09$ DO/mg proteína vs. SAL = $0,11 \pm 0,02$ DO/mg proteína; $P < 0,05$) quanto na mucosa colônica (OVX: LPS = $0,95 \pm 0,18$ DO/mg proteína vs. SAL = $0,41 \pm 0,13$ DO/mg proteína) ($p < 0,05$). O estradiol preveniu o aumento na atividade da MPO induzido pela administração do LPS no íleo (OVX+E2 50 μg/kg: $0,1 \pm 0,01$ DO/mg proteína; OVX+E2 100 μg/kg: $0,22 \pm 0,05$ DO/mg proteína) (Figura 16A). O mesmo perfil foi observado no cólon, ou seja, a administração de LPS não aumentou a atividade de MPO em ratas previamente tratadas com estradiol (OVX+E2 50 μg/kg: $0,1 \pm 0,01$ DO/mg proteína;

OVX+E2 100 µg/kg: $0,22 \pm 0,05$ DO/mg proteína) (Figura 16B). Sabe-se que a quantificação da enzima MPO é um bom marcador para avaliar o grau de inflamação (Bradley *et al.*, 1982), esses dados reafirmam um possível efeito anti-inflamatório do estradiol durante a endotoxemia.

Figura 16. O estradiol diminui a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na mucosa ileal e colônica induzida pela endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). As mucosas foram removidas 6 horas após a administração de salina ou LPS (1,5 mg/kg, i.v.) pela raspagem da superfície com auxílio de lâmina de microscopia e a atividade da enzima MPO foi avaliada em densidade óptica pela concentração de proteína. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=5-10 animais por grupo).

Yamada e colaboradores encontraram correlações significativas entre a atividade da MPO e a permeabilidade da mucosa colônica, sugerindo que os neutrófilos podem mediar a lesão da mucosa e a inflamação em modelo experimental de colite (Yamada *et al.*, 1991). Entretanto, os resultados indicam que não somente os neutrófilos são preponderantes para o aumento da permeabilidade intestinal, visto que a indução de neutropenia pela administração prévia de anti-soro direcionado aos neutrófilos não reduziu a permeabilidade intestinal. De fato, Moriez *et al.* (2007) sugeriram que os mastócitos e a degranulação de suas proteases (quimases e triptases) possui relação direta com o aumento de permeabilidade colônica em ratos. Neste trabalho, o aumento da permeabilidade intestinal foi induzido em ratos endotoxêmicos, entretanto, a administração prévia com doxantrazole (estabilizador de mastócitos) reduziu não somente a permeabilidade intestinal quanto a atividade da enzima MPO (Moriez *et al.*, 2007).

Inicialmente, foi determinado o número total de mastócitos presentes no epitélio intestinal. O número total de mastócitos não foi alterado pela administração de estradiol e de LPS no íleo (Figura 17B) e nem tampouco no cólon (Figura 19B). Entretanto, a quantificação das diferentes colorações adquiridas pelos mastócitos

mostrou que no íleo em ratas tratadas com óleo, a administração do LPS aumentou 2,5 vezes a porcentagem de mastócitos com coloração mais clara (sugestiva de degranulação) (Figura 17C), e reduziu 1,5 vez a porcentagem de mastócitos com coloração mais escura (sugestiva de granulação), em comparação com ratas que receberam salina (Figura 17B). O estradiol reduziu o aumento da porcentagem de mastócitos com coloração mais clara em ratas óleo tratadas com LPS em 1,81 e 2,6 vezes nos grupos de ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg ($p<0,05$), respectivamente. Em contrapartida, a administração prévia com estradiol aumentou em 1,5 vez a porcentagem de mastócitos com coloração mais escura nos grupos de ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg em comparação ao grupo óleo e LPS ($p<0,05$).

Figura 17. O estradiol não altera o número total, porém reduz a degranulação dos mastócitos no íleo durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). O íleo foi coletado, fixado, parafinizado, cortado e corado com azul de toluidina por 7 dias. Em A: I-ratas controle ovariectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 µg/Kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 µg/Kg e LPS (20x de aumento). Escala: 100 µm. Em B a quantificação dos mastócitos nos diferentes grupos experimentais. Em C a porcentagem de mastócitos com coloração escura e clara em relação ao número total de mastócitos. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6-10 animais por grupo).

Em conformidade com esses resultados no íleo, o estradiol provocou uma redução na expressão de quimase nos grupos salina, de 3,81 e 6 vezes nos grupos de ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg, respectivamente, em comparação ao grupo de ratas tratadas com óleo ($p < 0,05$). Já nos grupos tratados com LPS,

somente as ratas OVX+E2 50 µg/kg mostraram uma redução na expressão da quimase de 2,86 vezes comparado com as ratas tratadas com óleo ($p<0,05$) (Figura 18B). A administração do LPS aumentou a expressão da triptase nas ratas tratadas com óleo em comparação às tratadas com salina. O estradiol na dose de 100 µg/kg reduziu em 4 vezes o aumento de expressão induzido pelo LPS (Figura 18C).

Figura 18: O estradiol reduz a expressão de proteases de mastócitos no íleo durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa ileal foi coletada, as proteínas totais foram extraídas e a expressão das proteínas foi determinada por western blot. Uma representação dos *immunoblots* de quimase e triptase (A) e os valores relativos de densitometria (expressos como porcentagem do controle) para quimase (B) e triptase (C) na mucosa lisada. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * $p<0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p<0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média ± E.P.M. ($n=3-6$ animais por grupo).

No cólon, a administração de LPS aumentou 2,1 vezes a porcentagem de mastócitos com coloração mais clara, sugestiva de degranulação, em comparação com ratas que receberam salina ($p<0,05$). O aumento da porcentagem de mastócitos com coloração mais clara induzido por LPS em ratas tratadas com óleo foi reduzido em 2,42 e 2,89 vezes nos grupos de ratas OVX+E2 50 µg/kg e OVX+E2 100 µg/kg, respectivamente ($p<0,05$). Entretanto em relação à coloração mais escura, a administração de LPS reduziu 1,5 vez a porcentagem de mastócitos granulados em comparação com ratas que receberam salina ($p<0,05$). Já o tratamento com estradiol,

nas duas doses avaliadas, aumentou em 1,5 vez a porcentagem de mastócitos granulados comparado com ratas tratadas com óleo e LPS ($p<0,05$) (Figura 19C).

Em relação às proteases no cólon, a administração de LPS aumentou a expressão de quimase em 3,64 vezes nas ratas tratadas com óleo em comparação ao grupo controle salina ($p<0,05$). A expressão de quimase foi reduzida de 2,52 e 3,03 vezes nas ratas OVX+E2 50 $\mu\text{g/kg}$ e OVX+E2 100 $\mu\text{g/kg}$ ($p<0,05$), respectivamente, em comparação às ratas tratadas com salina (Figura 20B).

Em ratas tratadas com óleo, a administração de LPS também aumentou em 4,5 vezes a expressão da triptase em relação às ratas que receberam salina ($p<0,05$). O aumento da expressão de triptase induzido por LPS foi reduzido em 3,85 e 5,13 vezes nas ratas OVX+E2 50 $\mu\text{g/kg}$ e OVX+E2 100 $\mu\text{g/kg}$ em relação às ratas tratadas com óleo ($p<0,05$) (Figura 20C).

Figura 19: O estradiol não altera o número total, porém reduz a degranulação dos mastócitos no cólon durante a endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). O cólon foi coletado, fixado, parafinizado, cortado e corado com azul de toluidina por 7 dias. Em A: I-ratas controle overiectomizadas tratadas com óleo e salina, II ratas tratadas com óleo e LPS, III ratas tratadas com estradiol na dose de 50 ug/kg e LPS, e IV ratas tratadas com estradiol na dose de 100 ug/kg e LPS (20x de aumento). Escala: 100 µm. Em B a quantificação dos mastócitos nos diferentes grupos experimentais. Em C a porcentagem de mastócitos com coloração escura e clara em relação ao número total de mastócitos. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6-10 animais por grupo).

Figura 20: O estradiol reduz a expressão de proteases de mastócitos no cólon durante a endotoxemia Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). A mucosa colônica foi coletada, as proteínas totais foram extraídas e a expressão das proteínas foi determinada por western blot. Uma representação dos *immunoblots* da quimase e triptase (A) e os valores relativos de densitometria (expressos como porcentagem do controle) para quimase (B) e triptase (C) no lisado. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. ($n=3-6$ animais por grupo).

Os resultados sugerem que o estradiol exerce um efeito inibitório na degranulação dos mastócitos induzida pela endotoxemia nas mucosas ileal e colônica. Baseado nesses achados, a possível correlação entre as proteases dos mastócitos e o comprometimento da integridade da barreira epitelial intestinal foi investigada. Para essa finalidade, os animais receberam a administração prévia de doxantrazole (um estabilizador da degranulação de mastócitos) antes da indução da endotoxemia.

A figura 21 mostra o efeito da administração prévia de doxantrazole, no íleo (Figura 21A) e no cólon (Figura 21B), na permeabilidade intestinal em ratas endotoxêmicas. A administração de doxantrazole reduziu a permeabilidade em média 3 vezes em ambos segmentos intestinais em comparação às ratas que receberam salina ($p < 0,05$).

Figura 21: A administração de doxantrazole reduz a permeabilidade intestinal induzida pela endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. A doxantrazole foi administrada às 19h no dia anterior ao experimento e às 7h no dia do experimento. A permeabilidade intestinal foi determinada 6 h após a administração do LPS (1,5 mg/kg, i.v.) pela injeção de dextrana (FD-4) em alças formadas no íleo (A) e no colon (B). As concentrações plasmáticas de FD-4 foram determinadas por espectrofluorimetria. * P < 0,05 comparado às ratas OVX LPS SAL. Dados expressos em média ± E.P.M. (n=7-9 animais por grupo).

4.6 O ESTRADIOL ALTERA A APOPTOSE CELULAR NO ÍLEO E NO CÓLON

Durante a endotoxemia há um aumento significativo do número de ileócitos em processo de necrose e apoptose, acelerando a disfunção da barreira epitelial intestinal (Stallion *et al.*, 2005; Hotchkiss and Nicholson, 2006). Outro possível mecanismo de proteção do estradiol ficou evidenciado pela redução da expressão de caspase-3 ativa em 4,58 vezes no íleo (Figura 22C) e de 4,8 vezes no cólon (Figura 22F) em ratas OVX+E2 100 µg/kg tratadas com LPS, em comparação às ratas tratadas com óleo e LPS (p<0,05).

Figura 22. O estradiol reduz a expressão da caspase-3 ativa no íleo e no cólon induzida pela endotoxemia. Ratas foram ovariectomizadas e mantidas para recuperação por 10-12 dias antes do experimento. Por três dias consecutivos, as ratas foram pré-tratadas com cipionato de estradiol (50 or 100 µg/kg, s.c.) ou óleo de milho (veículo). As mucosas ileal e colônica foram coletadas, a proteína total foi extraída e a expressão das proteínas foi determinada por WB. Uma representação dos *imunoblots* no íleo (A) e no cólon (D) e os valores relativos de densitometria (expressado como porcentagem do controle) para pró-caspase no íleo (B) e cólon (E), para caspase-3 ativa (clivada) no íleo (C) e no cólon (F) nas mucosas lisadas. Os níveis de β-actina foram utilizados como controle interno. * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVX SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVX LPS. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=3-6 animais por grupo).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento prévio com estradiol atenua a disfunção da barreira epitelial intestinal induzida pela administração do LPS, evidenciada pelo aumento da permeabilidade intestinal no íleo e no cólon, aumento da translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos e exacerbação da resposta inflamatória. Além disso, o tratamento com estradiol preveniu os danos histológicos apresentados nos dois segmentos intestinais, bem como reverteu a redução, a alteração da localização e abertura das principais proteínas constituintes das TJ e JA. Adicionalmente, o estradiol reduziu a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β), migração de neutrófilos e degranulação dos mastócitos nas mucosas intestinais. Os esforços para melhor compreender os mecanismos subjacentes à disfunção da barreira epitelial induzida pelo LPS são importantes e, neste contexto, um possível efeito protetor do estradiol na integridade da barreira intestinal poderia melhorar um prognóstico clínico na sepse.

Antes de investigar o efeito do estradiol na disfunção da barreira epitelial intestinal, as duas doses de estradiol utilizadas no presente estudo foram padronizadas considerando o peso uterino e as concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol como parâmetros de referência. As ratas ovariectomizadas tratadas com óleo apresentaram um peso uterino menor comparado a ratas com reposição de estradiol. Adicionalmente, o aumento do peso uterino foi proporcional à dose administrada do hormônio. Esses dados corroboram a relação da dose do estradiol com o peso uterino, visto que o estradiol age na morfogênese, citodiferenciação e atividade secretória do epitélio uterino (Finn and Martin, 1973). Em ratas ovariectomizadas ou na fase de metaestro (fase do ciclo estral caracterizada por concentrações basais do estradiol), há uma intensa apoptose uterina induzindo a atrofia desse órgão (Sato *et al.*, 1997). Em contrapartida, o estradiol induz a hipertrofia e a hiperplasia celular (Quarmby and Korach, 1984).

Em conformidade com os resultados do peso uterino apresentados, o tratamento com estradiol aumentou as concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol. Os níveis plasmáticos das ratas ovariectomizadas tratadas com óleo foram similares às ratas na fase de metaestro (Marques *et al.*, 2015). A dose de 50 μ g/kg pode ser considerada uma dose fisiológica e mimetizou concentrações plasmáticas similares

às apresentadas em ratas na fase de proestro (fase do ciclo estral caracterizada pelo pico das concentrações plasmáticas do estradiol) (Marques *et al.*, 2015). Por outro lado, a dose de 100 µg/kg pode ser considerada supra-fisiológica, elevando os níveis plasmáticos acima daqueles encontrados durante o ciclo estral de ratas (Marques *et al.*, 2015).

Neste trabalho, o LPS induziu uma disfunção da barreira epitelial intestinal, caracterizada pelo aumento da permeabilidade, translocação bacteriana do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos, alteração das TJ (abertura e expressão das suas principais proteínas constituintes) e hiperativação da resposta inflamatória. A produção exacerbada de citocinas caracterizou uma condição de inflamação sistêmica. A injeção intravenosa de LPS tem sido utilizada amplamente na literatura por mimetizar as principais fisiopatologias na condição séptica, o que evidencia uma relevância clínica (Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Poli-De-Figueiredo *et al.*, 2008; Saia *et al.*, 2011). Tanto a via, dose e tempo de administração do LPS foram estabelecidas em resultados prévios do nosso laboratório, recentemente aceito para publicação (Ribeiro *et al.*, 2017).

Em virtude da íntima associação entre a produção de mediadores inflamatórios e a disfunção da barreira epitelial intestinal, os efeitos do estradiol na modulação da resposta inflamatória sistêmica foram investigados. O estradiol reduziu as concentrações plasmáticas de IL-1 β , porém não alterou as de TNF- α , IFN γ e IL-6. Isso pode ser devido à cinética de produção das citocinas pró-inflamatórias havendo o pico de sua liberação em fases iniciais da endotoxemia, a qual ocorre em torno de duas horas após a administração intravenosa de LPS (Kakizaki *et al.*, 1999). Em nosso trabalho, a coleta do plasma ocorreu 6h após a administração do LPS, sendo esse tempo tardio em relação a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias.

Por outro lado, as ratas tratadas com as duas doses do estradiol previamente à administração do LPS exibiram concentração plasmática maior da citocina anti-inflamatória IL-10 (Vanderpoll *et al.*, 1995). A IL-10 desempenha inúmeras ações regulatórias nos processos inflamatórios, incluindo a redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias. De fato, camundongos tratados com IL-10 recombinante apresentam menor mortalidade, associada à uma concentração plasmática maior de TNF α (Rongione *et al.*, 1997). Em contrapartida, em modelo de ligadura e perfuração cecal, a administração prévia de anti-IL-10 resulta em concentração plasmática maior

de TNF α (Vanderpoll *et al.*, 1995). Portanto, no tempo observado o estradiol atuou na modulação da resposta inflamatória sistêmica, no aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e na redução da citocina pró-inflamatória IL-1 β .

A interação do estradiol no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também foi avaliada pelas concentrações plasmáticas de corticosterona. O LPS é um potente agente estressor imunológico, induzindo a liberação de citocinas, as quais ativam o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal e aumentam a secreção de cortisol em humanos e corticosterona em ratos (Rivest, 2010). A corticosterona exerce um efeito bidirecional na regulação da resposta inflamatória, dependendo das suas concentrações plasmáticas. Quando em concentrações plasmáticas altas, como evidenciado pelo efeito estimulatório do estradiol em nosso estudo, esse hormônio possui efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, como descrito previamente em outros estudos (Liao *et al.*, 1995; Zhang and Daynes, 2007; Frank *et al.*, 2010).

Na literatura, existe um paradoxo em relação ao efeito imunomodulador do estradiol. Há trabalhos que mostram a supressão da inflamação em vários modelos experimentais de doenças inflamatórias (Straub, 2007). Por outro lado, há o efeito pró-inflamatório em algumas doenças autoimunes crônicas em humanos (Talal, 1981). Essa contradição pode estar relacionada a alguns fatores, incluindo o estímulo imune e subsequente antígeno específico (por exemplo, células T inibidas por estradiol versus ativação de célula B) (Paavonen *et al.*, 1981; Clerici *et al.*, 1991; Gilmore *et al.*, 1997; Saia *et al.*, 2015), a fase reprodutiva da mulher (Olsen and Kovacs, 1996; Cutolo and Wilder, 2000; Pfeilschifter *et al.*, 2002), os tipos de células imunes envolvidas durante diferentes fases da doença (Rogers and Eastell, 2001; Latham *et al.*, 2003), o órgão alvo com sua especificidade (Cenci *et al.*, 2000; Erlandsson *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2004; Dimayuga *et al.*, 2005), tempo de administração do estradiol (Karpuzoglu-Sahin *et al.*, 2001) e a variabilidade na expressão dos receptores ER α e ER β dependendo do microambiente e tipo celular (Islander *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos sobre a expressão de ER α e de ER β no trato gastrointestinal foi realizada usando células cancerígenas do cólon (Singh *et al.*, 1998; Foley *et al.*, 2000; Campbell-Thompson *et al.*, 2001; Witte *et al.*, 2001; Oduwole *et al.*, 2002) ou células de linhagem (Fiorelli *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002), e confirmou a expressão do ER β , enquanto há controvérsia sobre a expressão do ER α . Kawano *et al.* (2004) identificaram a expressão dos dois

subtipos de receptores de estrogênio no íleo e no cólon em camundongos. Além disso, quanto a localização desses receptores, há um predomínio da expressão de ER α em macrófagos e células nervosas nos plexos de Auerbach e Meissner; enquanto que a expressão de ER β foi observada somente em células nervosas. Também identificaram o número de células positivas ao ER α e ER β nas fêmeas em diferentes fases do ciclo estral e ovariectomizadas com ou sem reposição com estradiol. Como resultado observaram que fêmeas com concentrações plasmáticas baixas de estradiol apresentaram uma expressão menor de ER α , enquanto em fêmeas com reposição de estradiol, há uma expressão maior no cólon e nenhuma alteração no íleo. Adicionalmente, o estado hormonal não influencia a expressão de ER β no íleo ou no cólon em condições fisiológicas (Kawano *et al.*, 2004).

Em conformidade com os resultados supracitados, nossos resultados indicaram um aumento na expressão de ER α somente no cólon em ratas tratadas com estradiol. Além disso, as administrações do estradiol e do LPS não alteraram a expressão de ER β no íleo e nos grupos salina no cólon. Entretanto, no cólon somente a administração de LPS aumentou sua expressão em ratas tratadas com estradiol. Isso mostra que em condições fisiológicas a expressão de ER β não varia de acordo com o estado hormonal da rata, mas sim em condições de inflamação sistêmica.

O ER β tem adquirido grande relevância no cólon por mediar efeitos anti-inflamatórios e anti-tumorigênicos, capazes de prevenir ou mesmo combater a doença inflamatória intestinal e sua progressão para o câncer colorretal (Harnish *et al.*, 2004; Kennelly *et al.*, 2008). Além disso, a terapia de reposição hormonal reduz a atividade da doença inflamatória intestinal, bem como o desenvolvimento de câncer no cólon em mulheres pós-menopausadas (Grodstein *et al.*, 1999). Em animais *knockout* para o ER β apresentam uma redução na expressão de catenina (proteína constituintes das junções aderentes), anormalidade nas TJ e alteração no número e formato dos desmossomos (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Portanto, o uso de agonistas seletivos de ER β pode ter um potencial preventivo ou terapêutico não só para doença inflamatória intestinal e no câncer de cólon, mas também em condições de inflamação sistêmica.

Nosso estudo mostrou pela primeira vez que o estradiol administrado previamente à endotoxemia diminuiu a permeabilidade intestinal induzida pela inflamação sistêmica no cólon e no íleo. Dentre os mecanismos possíveis desse efeito protetor está o fato de que o estradiol atua na manutenção da arquitetura do epitélio intestinal, promovendo a diferenciação e a proliferação celulares (Wada-Hiraike *et al.*,

2006). Braniste *et al.* (2009) demonstraram que a permeabilidade paracelular colônica pode ser alterada durante flutuações hormonais dependendo do estágio do ciclo estral da rata. Além disso, os resultados desse trabalho indicam que a permeabilidade paracelular é menor no estro e maior no diestro (menores níveis plasmáticos de estradiol e progesterona no ciclo estral).

Em modelo de hipóxia e acidose, Homma *et al.* (2005) evidenciam que a mucosa ileal de ratas em proestro mantém a integridade da barreira epitelial intestinal com menor alteração de permeabilidade em comparação aos machos. Adicionalmente, machos tratados com estradiol apresentam permeabilidade ileal menor nesse modelo experimental (Homma *et al.*, 2005).

O aumento da permeabilidade intestinal é acompanhado de maior translocação de enterobactérias, endotoxinas e peptideoglicanos para os linfonodos mesentéricos podendo contribuir para o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos (Deitch *et al.*, 1987). A administração prévia de estradiol reduziu o aumento de permeabilidade intestinal induzido pelo LPS. Assim sendo, nossos dados sugerem que o estradiol atua protegendo o epitélio intestinal durante a inflamação sistêmica, consequentemente impedindo com que bactérias presentes no lúmen intestinal alcancem múltiplos órgãos a partir dos linfonodos mesentéricos, podendo reduzir o agravamento da condição séptica (Doig *et al.*, 1998).

A escolha da coleta dos linfonodos mesentéricos para análise da translocação bacteriana se deu por compreenderem os maiores gânglios linfoides do corpo. Além disso, antígenos (em especial bactérias) capturados pelas células dendríticas nas placas de Peyer e lâmina própria são levados primeiramente para os linfonodos mesentéricos por vasos linfáticos aferentes e então apresentados para as células T, as quais são acumuladas devido a presença das moléculas de adesão L-selectina e $\alpha 4\beta 7$ -integrina (Wagner *et al.*, 1998).

A administração do LPS comprometeu significativamente a expressão, localização, arranjo estrutural e abertura das TJ e JA analisadas por *western blot*, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente. Esses resultados corroboram dados na literatura, os quais mostram que em condições de produção alta de citocinas pró-inflamatórias, há uma redução da expressão das principais proteínas constituintes das TJ e JA (Yamamoto *et al.*, 2004; Al-Sadi *et al.*, 2008), aumento da internalização das mesmas (Bruewer *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2004; 2005) e também abertura dessas estruturas, cujo mecanismo está intimamente

correlacionado a expressão da MLCK (Saile *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005; Al-Sadi, R. and Ma, T. Y., 2007). Em contrapartida, nossos achados demonstraram que a administração prévia de estradiol atenuou os efeitos da endotoxemia.

O estradiol parece reverter a redução da expressão das proteínas integrantes das TJ (claudina-1, ocludina e JAM-A) e da JA (E-caderina) provocada pela administração do LPS. De fato, tem sido sugerido o efeito do estradiol na expressão de proteínas constituintes das TJ e JA. Em células endoteliais humanas e epiteliais ectocervicais, o estradiol é capaz de regular a permeabilidade paracelular por meio da modulação de expressão da ocludina (Ye *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2006; Gorodeski, 2007b). A ovariectomia reduz a expressão da ocludina e da claudina-1 na vagina de ratas, a qual pode ser restaurada pela reposição estrogênica (Oh *et al.*, 2016). Em modelo de disfunção da barreira epitelial do esôfago, a administração prévia de estradiol reduziu a permeabilidade, aumentou a expressão da ocludina bem como reduziu a abertura na região das TJ (Honda *et al.*, 2016). Braniste *et al.* mostraram que em condições fisiológicas, há uma expressão maior de ocludina e da JAM-A no estro em relação ao diestro no cólon, sugerindo uma estrutura epitelial mais reforçada das TJ na presença do estradiol (Braniste *et al.*, 2009). Adicionalmente, camundongos com deleção do gene do ER β apresentam distribuição anormal e irregular dos contatos entre as células epiteliais colônicas (Wada-Hiraike *et al.*, 2006).

Em diversas condições patológicas como na doença de Crohn, colite ulcerativa, hepatite alcoólica, síndrome do intestino irritável e infecção bacteriana causada por *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* e *Vibrio cholera*, a barreira epitelial intestinal é comprometida permitindo o aumento da permeabilidade paracelular a antígenos luminais (Demeo *et al.*, 2002; Bruewer *et al.*, 2003; Turner, 2009). As citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a inflamação causam ruptura da barreira intestinal que resulta em um aumento adicional na permeabilidade intestinal (Nusrat *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2000; Bruewer *et al.*, 2003). Assim, além dos seus efeitos diretos sobre a ativação do sistema imune, as citocinas pró-inflamatórias também exacerbam o processo inflamatório, formando um “ciclo vicioso” de produção das citocinas, ao intensificarem o comprometimento das TJ (Nusrat *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2000; Bruewer *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram o efeito das citocinas na redução da resistência transepitelial e aumento da permeabilidade intestinal, comprometendo a barreira epitelial intestinal como um mecanismo que contribui para o desenvolvimento e agravamento da inflamação intestinal (Bruewer *et al.*, 2003; Shen

and Turner, 2006; Schwarz *et al.*, 2007). Portanto, a compreensão dos mecanismos intracelulares e moleculares que medeiam a modulação das citocinas na disfunção do epitélio intestinal é necessária para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

Perante o exposto, a avaliação do efeito anti-inflamatório do estradiol também foi feita localmente pela quantificação dos níveis de citocinas na mucosa intestinal. Nas mucosas ileal e colônica, a endotoxemia induziu a produção de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas no presente estudo (TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β). Em conformidade com esse resultado, ocorreu um aumento da expressão do NF- κ B p65 e uma redução da expressão do I κ B, vias antagônicas de controle da produção dos mediadores pró-inflamatórios. É sabidamente conhecido que as citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na exacerbação da resposta inflamatória sistêmica ao comprometerem a integridade da barreira epitelial intestinal (Mainous *et al.*, 1995).

A citocina IFN- γ foi a primeira citocina a ser relacionada com a disfunção da barreira epitelial intestinal causando um aumento da permeabilidade intestinal e uma redução da resistência elétrica transepitelial de forma dose e tempo dependente em células epiteliais T84 humanas (Madara and Stafford, 1989). A partir desse trabalho, outros pesquisadores têm confirmado as descobertas iniciais e têm estudado os mecanismos de ação envolvidos. Nusrat *et al.* (2000) demonstraram em uma série de estudos, a macropinocitose das proteínas da TJ (occludina, JAM-A, claudina-1) como potencial mecanismo através do qual o IFN- γ exerce seus efeitos de ruptura da barreira TJ (Bruewer *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2005). Usando microscopia confocal, esses pesquisadores demonstraram que o IFN- γ induz a internalização da ocludina e claudina-1 em grandes vacúolos revestidos com actina. As principais vias de sinalização intracelular que medeiam o efeito IFN- γ nas TJ foram relatadas em estudos *in vitro*. Demonstrou-se que o efeito do IFN- γ em induzir a ruptura da barreira epitelial intestinal não é mediada por necrose ou apoptose celular (Madara and Stafford, 1989; Bruewer *et al.*, 2003). O aumento induzido por IFN- γ na permeabilidade de células T84 foi associado à ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase, sendo a redução na resistência elétrica transepitelial e aumento de permeabilidade paracelular induzidas pelo IFN- γ inibidas pelo bloqueio farmacológico dessa via de sinalização (Boivin *et al.*, 2009). A ativação da fosfatidilinositol-3-quinase causou uma ativação retardada de NF- κ B e uma diminuição da expressão da proteína ocludina (Boivin *et al.*, 2009).

Em modelos *in vivo* de disfunção da barreira epitelial intestinal, o efeito deletério do IFN- γ também tem sido evidenciado. Em camundongos *knockout* para IL-10, o aumento da permeabilidade intestinal correlacionou-se com um aumento intestinal de IFN- γ (Madsen *et al.*, 1999), bem como em modelo de nutrição parenteral total (Yang *et al.*, 2002). Neste mesmo modelo, camundongos *knockout* para IFN- γ apresentaram redução na permeabilidade intestinal (Musch *et al.*, 2002). Da mesma forma, o choque séptico ou hemorrágico induz aumento na permeabilidade intestinal em camundongos, que foi associado aumento de IFN- γ (Carrithers *et al.*, 2005). A administração de anticorpo anti-IFN- γ reverteu os danos ao epitélio intestinal induzidos pelo choque hemorrágico (Luyer *et al.*, 2007). Portanto, os resultados desses estudos *in vivo* sugerem que o IFN- γ pode desempenhar um efeito significativo na disfunção da barreira epitelial intestinal em condições clinicamente relevantes, incluindo a sepse.

O TNF α tem sido considerado como o regulador chave da resposta inflamatória (Cavaillon, 1993; Vandermeide and Schellekens, 1996; Boehringer *et al.*, 1999; Atzeni *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* mostram uma redução da resistência elétrica transepitelial provocada pelo TNF α correlacionada com um aumento da permeabilidade paracelular (Fish *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Ma, Iwamoto, *et al.*, 2004). Os principais mecanismos relacionados com o efeito do TNF α nas TJ têm sido discutidos em diversos modelos. O tempo no qual o TNF α aumenta a permeabilidade de células Caco-2 está intimamente correlacionado com o aumento na expressão e atividade da MLCK (Ma *et al.*, 2005), uma proteína envolvida na contração do citoesqueleto de actina e abertura das TJ (Saile *et al.*, 2001).

A IL-6 é outra potente citocina pró-inflamatória secretada por diversos tipos celulares em resposta a estímulos pró-inflamatórios, particularmente TNF α e IL-1 β (Song and Kellum, 2005). Os estudos mostram-se antagônicos sobre a relação da IL-6 com a barreira epitelial intestinal. Por um lado, Tazuke *et al.* (2003) observaram que a IL-6 provocou uma redução na resistência elétrica transepitelial após 72h de incubação e um aumento na permeabilidade ao manitol em células Caco-2. Em contrapartida, Wang *et al.* (2007) mostraram que o tratamento com IL-6 em células Caco-2 por 48 h causou uma redução no fluxo paracelular de dextrana. Já em modelos *in vivo* de choque hemorrágico/reperfusão (Yang *et al.*, 2003) e de sepse (Wang *et al.*, 2001), camundongos *knockout* para IL-6 são protegidos da disfunção da barreira epitelial intestinal. Portanto, o efeito da IL-6 na permeabilidade intestinal parece

controversa, e dependente do tempo de incubação com a IL-6 e do tipo de estudo apresentando resultados distintos em estudos *in vitro* e *in vivo*.

A última citocina pró-inflamatória avaliada foi a IL-1 β , a qual é liberada por várias células imunes e desempenha um papel importante na patogênese da inflamação intestinal na doença inflamatória intestinal (IBD) (Dinarello, 1995; 1996). O conteúdo de IL-1 β é marcadamente elevado no intestino de pacientes portadores de IBD (Mahida *et al.*, 1989; Gwee *et al.*, 2003) e há correlação entre o conteúdo crescente de IL-1 β e o nível de inflamação intestinal (Reinecker *et al.*, 1991). A IL-1 β em concentrações fisiologicamente relevantes provoca um aumento da permeabilidade epitelial intestinal das TJ (Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y., 2007), além de uma queda tempo-dependente na resistência transepitelial de células Caco-2 (Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y., 2007). O aumento induzido por IL-1 β na permeabilidade de células Caco-2 foi precedido por um aumento na expressão de MLCK (Al-Sadi, R. and Ma, T. Y., 2007). Em relação à expressão das proteínas constituintes das TJ, a IL-1 β induziu um aumento da expressão da claudina-2 e hiperfosforilação da ocludina em hepatócitos de ratos, uma diminuição da expressão de ocludina e aumento da expressão de claudina-1 em astrócitos humanos e uma diminuição na expressão de ocludina em células Caco-2 (Yamamoto *et al.*, 2004; Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y., 2007).

Portanto, todas as citocinas pró-inflamatórias abordadas acima parecem contribuir no comprometimento da integridade da barreira epitelial intestinal. De fato, a administração de LPS aumentou a produção de todas as citocinas pró-inflamatórias no íleo e no cólon em ratas. Entretanto, a administração prévia com estradiol reduziu todas as citocinas pró-inflamatórias no cólon e quase todas no íleo, sendo somente a IL-6 não alterada. Da mesma forma, ocorreu uma redução da expressão do NF- κ B p65 no íleo e no cólon, e um aumento da expressão do I κ B no íleo. Esses resultados sugerem um dos possíveis mecanismos de atuação do estradiol. Em relação ao intestino, o efeito do estradiol na liberação de citocinas pró-inflamatórias tem sido avaliado principalmente em modelos de colite. O estradiol reduziu a expressão de IFN- γ , a atividade da MPO e danos macroscópicos e escores histológicos em modelo de colite (Verdu *et al.*, 2002). Em ratos transgênicos HLA-B27 com inflamação crônica tratados com estradiol por 5 dias, apresentaram uma redução nos escores clínicos e histológicos, no infiltrado de células inflamatórias, na fibrose, na redução do comprimento do cólon, conteúdo de MPO e de proteases de mastócitos. No mesmo

modelo de doença inflamatória intestinal, um agonista ER β (ERB-041) teve efeito protetor no cólon (Harris *et al.*, 2003). Nossos dados histológicos corroboram os efeitos protetores do estradiol na mucosa intestinal em modelos de inflamação local. Assim, ao reduzir a quantidade de citocinas pró-inflamatórias locais, o estradiol pode atuar na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal (Mainous *et al.*, 1995) na mucosa intestinal.

O efeito anti-inflamatório do estradiol tem sido demonstrado em diversos estudos *in vitro* (An *et al.*, 1999; Evans, Harris, *et al.*, 2002; Tyree *et al.*, 2002), bem como em vários modelos experimentais (Miyamoto *et al.*, 1999; Cuzzocrea *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001; Evans, Lai, *et al.*, 2002). Esta atividade anti-inflamatória pode estar atribuída a sua interferência com a translocação nuclear do NF-kB (Ray *et al.*, 1994; Stein and Yang, 1995). O bloqueio da ativação do NF-kB é usado terapeuticamente em doença inflamatória intestinal, por exemplo, pela administração de glicocorticoides e anticorpo recombinante anti-TNF α (Auphan *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995; Nikolaus, Folsch, *et al.*, 2000; Nikolaus, Raedler, *et al.*, 2000), o que pode melhorar os efeitos da inflamação intestinal (Neurath *et al.*, 1996; Fujihara *et al.*, 2000). Adicionalmente, o NF-kB ativado foi detectado em amostras de biópsia colônica de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa, o que sugere um papel patológico para esse fator de transcrição (Neurath *et al.*, 1996; Rogler *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Com isso, esses resultados indicam que a redução do NF-kB é uma estratégia interessante para casos de inflamação intestinal. Neste sentido, nossos resultados do efeito inibitório sobre expressão do NF-kB no íleo e no cólon adquirem importância clínica significativa.

O estado séptico é caracterizado por infecções em órgãos distantes e respostas inflamatória local e sistêmica exacerbadas (Doig *et al.*, 1998). Em relação ao intestino, muitos trabalhos têm correlacionado a produção exacerbada de mediadores inflamatórios com a injúria epitelial intestinal. No início de um processo inflamatório, as primeiras células atraídas ao sítio são os neutrófilos, seguidos pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos (Kay, 1970). A quantificação do neutrófilo, pela avaliação da atividade da sua enzima MPO, tem sido utilizada para estimar o grau de inflamação local ou a migração de neutrófilos para os tecidos. Nossos resultados indicam que o LPS aumentou a atividade de MPO no íleo e no cólon, enquanto o tratamento com estradiol reduziu a atividade da enzima em ambas mucosas. No entanto, a atividade da MPO não foi alterada apenas pela reposição

estrogênica em ratas saudáveis. De fato, Houdeau *et al.* (2005) reportam que não há diferença na atividade de MPO basal no intestino durante o ciclo estral das ratas, o que demonstra que em condições fisiológicas as populações de neutrófilos são insensíveis à condição hormonal. Entretanto, em modelo de isquemia e reperfusão e de choque hemorrágico, a administração prévia de estradiol reduz a atividade de MPO no intestino, o que está correlacionado com seu efeito anti-inflamatório (Ma *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2007). Nossos resultados de MPO também foram semelhantes aos apresentados em modelo de ligadura e perfuração cecal. Em animais controles, o estradiol não foi capaz de reduzir a quantidade de MPO, somente em animais que foram submetidos à ligadura e perfuração cecal (Sener *et al.*, 2005).

A presença abundante dos neutrófilos na mucosa intestinal tem sido usada como marcador de doenças inflamatórias intestinais. A infiltração dos neutrófilos para o interior das criptas está relacionada com a injúria ao epitélio intestinal observado histologicamente em pacientes com quadros graves de IBD. Os neutrófilos atuam na destruição tecidual por dano proteolítico e oxidativo. Quando recrutados, os neutrófilos são ativados e liberam quantidades altas de mediadores citotóxicos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na mucosa intestinal, onde podem desencadear lesão tecidual, bem como perpetuam a inflamação pela produção de mediadores inflamatórios (Brazil *et al.*, 2013).

Além da análise da infiltração de neutrófilos, a migração e granulação de mastócitos foram avaliadas por histologia e a expressão das suas proteases (triptase e quimase) por *western blot*. A ligação do LPS ao complexo de receptores TLR4-CD14-MD2, mencionada na introdução, está relacionada com a ativação dos mastócitos e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (Varadaradjalou *et al.*, 2003). Em adição, a expressão de receptores TLR4 na superfície de mastócitos peritoneais de ratos pode ser *up-regulated* na presença de LPS, intensificando dessa forma a síntese de mediadores inflamatórios (Pietrzak *et al.*, 2011). A ativação funcional dos mastócitos promove a degranulação de suas proteases, as quais induzem a clivagem de múltiplos substratos proteicos. Em comparação com outras patologias do trato gastrointestinal, o papel dos mastócitos na patogênese da disfunção da barreira epitelial intestinal durante a endotoxemia é pouco conhecida. A degranulação dos mastócitos comprova a sua relação direta com o aumento de permeabilidade colônica em ratos (Moriez *et al.*, 2007). Entretanto, a relação da degranulação dos mastócitos em fêmeas ainda é desconhecida.

As proteases presentes nos mastócitos comprometem a membrana basolateral das células epiteliais levando à alteração da integridade do epitélio intestinal, atuando principalmente através dos receptores PAR-2 localizados em células imunes (Jacob *et al.*, 2005). Wilcz-Villega *et al.* (2013) demonstraram que a triptase compromete a integridade epitelial, por meio da diminuição na resistência elétrica transepitelial, um aumento na permeabilidade à FITC-dextrana e uma diminuição na expressão das proteínas juncionais JAM-A, claudina-1 e ZO-1. Entretanto, um inibidor de triptase reduziu o efeito da degranulação dos mastócitos na proteína juncional JAM-A, na resistência elétrica transepitelial e permeabilidade intestinal (Wilcz-Villega *et al.*, 2013). A injeção intravenosa de rMCP-2 induz o aumento da permeabilidade epitelial intestinal e uma translocação de albumina sérica humana dos vasos sanguíneos para o lúmen intestinal em poucos minutos (Scudamore *et al.*, 1995) além de ser responsável por clivar a ocludina e a E-caderina (Fu *et al.*, 2005).

No presente estudo, a degranulação dos mastócitos e a expressão das proteases, quimase e triptase, foram aumentadas pela endotoxemia. Moriez *et al.* (2007) observaram um aumento na liberação de quimase após a administração de LPS. É importante salientar que os mastócitos expressam receptores funcionais para o estrógeno, sugerindo um possível efeito direto do estradiol nessa célula do sistema imune (Zhao *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002; Nicovani and Rudolph, 2002).

O caráter inibitório do estradiol em relação aos mastócitos tem sido evidenciado em diversos trabalhos, incluindo a redução da liberação de histamina (Munoz-Cruz *et al.*, 2015), diminuição da liberação de quimase no tecido cardíaco (Li *et al.*, 2015), atenuação do remodelamento cardíaco (Chancey *et al.*, 2005), inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Kim *et al.*, 2014) e diminuição do número de mastócitos em ratos com colite (Hussein *et al.*, 2014).

A partir dos resultados apresentados, a fim de constatar a dependência dos mastócitos na gênese do aumento da permeabilidade intestinal induzido pelo LPS em nosso modelo experimental, avaliamos a ação de um estabilizador de mastócitos, doxantrazole. A doxantrazole reduziu a permeabilidade intestinal induzida pelo LPS. Já foi demonstrado que a administração da doxantrazole reverte os efeitos da administração do LPS, dentre eles: o aumento na liberação de rMCP-2, assim como aumenta a atividade serina protease na porção luminal e de mieloperoxidase (Moriez *et al.*, 2007).

Outro mecanismo possível de ação do estradiol abordado em nosso estudo foi a apoptose, por meio da avaliação da expressão da caspase-3 clivada. A administração do LPS aumentou a clivagem da caspase-3, enquanto a administração prévia de estradiol reduziu a clivagem da mesma. De fato, Bruewer *et al.* (2003) descreveram a dependência da apoptose como mecanismo utilizado pelas citocinas pró-inflamatórias em induzir a disfunção da barreira epitelial intestinal. Adicionalmente, estudos mostram que o efeito protetor do estradiol em diversos tecidos pode estar relacionado com a redução da apoptose celular (Rau *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012).

Figura 23. Esquema hipotético do possível mecanismo de ação do estradiol na proteção do epitélio intestinal em condição de endotoxemia. Legenda: + efeito estimulatório, - efeito inibitório e X bloqueio ou redução da ação do LPS na disfunção da barreira epitelial intestinal pela administração prévia com estradiol.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em síntese, uma nova função protetora do estradiol na preservação da barreira intestinal amplia seus efeitos protetores no trato gastrointestinal, possivelmente atuando como mediador anti-inflamatório, reduzindo a infiltração de neutrófilos, degranulação dos mastócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela inflamação sistêmica. Além disso, o pré-tratamento com estradiol reverteu a disfunção da barreira epitelial induzida pelo LPS, ao atenuar os danos histológicos e aumentar a expressão e a preservação da localização da claudina-1, ocludina, JAM-A e E-caderina. Adicionalmente, o estradiol reduziu a abertura na região das TJ e JA. Esses achados podem ajudar a explicar a diferença entre gêneros em relação à lesão intestinal durante a sepse.

Em conclusão, nossos resultados indicam que o estradiol participa na proteção intestinal contra os efeitos deletérios da inflamação sistêmica, particularmente na preservação no epitélio intestinal. É uma contribuição importante para o estudo da patogênese da sepse e de novas estratégias terapêuticas, as quais podem atuar no aumento da sobrevida dos pacientes por ela acometidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K. et al. Engineering of a green-light inducible gene expression system in *Synechocystis* sp PCC6803. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 177-183, 2014.

ABRAHAM, S. N.; MALAVIYA, R. Mast cells in infection and immunity. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3501-3508, 1997.

ABRAHAM, S. N.; ST JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 440-452, 2010.

ADRIE, C. et al. Influence of gender on the outcome of severe sepsis - A reappraisal. **Chest**, v. 132, n. 6, p. 1786-1793, 2007.

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study (vol 28, pg 108, 2002). **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 4, p. 525-526, 2002.

ALBERTI, C. et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 1, p. 77-84, 2003.

AL-SADI, R. et al. Mechanism of IL-1 beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5653-5661, 2008.

AL-SADI, R. M.; MA, T. Y. IL-1 beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4641-4649, 2007.

AL-SADI, R.; MA, T. Y. Myosin light chain kinase (MLCK) mediates the IL-1 beta-induced increase in intestinal epithelial Tight Junction permeability. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. A8-A8, 2007.

AN, J. P. et al. Estradiol repression of tumor necrosis factor-alpha transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 15161-15166, 1999.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

ARAI, N. et al. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: Growth effects of estrogen and genistein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 2, p. 425-431, 2000.

ARRIETA, M. C. et al. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. **Gut**, v. 58, n. 1, p. 41-48, 2009.

ARTIS, D.; GRENCIS, R. K. The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 4, p. 252-264, 2008.

ATZENI, F. et al. Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 8, p. 529-536, 2007.

AUPHAN, N. et al. Immunosuppression by glucocorticoids inhibition of NF-Kappa-B activity through induction of I-Kappa-B synthesis. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 286-290, 1995.

AZIZ, M. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 3, p. 329-342, 2013.

BANKOVA, L. G. et al. Mouse Mast Cell Proteases 4 and 5 Mediate Epidermal Injury through Disruption of Tight Junctions. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 6, p. 2812-2820, 2014.

BARONE, F. C. et al. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene-B4 receptor-binding in rat focal ischemia. **Stroke**, v. 23, n. 9, p. 1337-1347, 1992.

BARROS, R. P. A.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen Receptors and the Metabolic Network. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 289-299, 2011.

BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): Lessons from an International Sepsis Registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222-232, 2009.

BENFEY, P. N.; YIN, F. H.; LEDER, P. Cloning of the mast-cell protease, RMCP-II – evidence for cell-specific expression and a multigene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5377-5384, 1987.

BILSBOROUGH, J.; VINEY, J. L. Gastrointestinal endritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. **Gastroenterology**, v. 127, n. 1, p. 300-309, 2004.

BISCHOFF, S. C. et al. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. **Gut**, v. 44, n. 5, p. 643-652, 1999.

BISCHOFF, S. C. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 185-205, 2009.

BLAIR, S. A. et al. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 2, p. 191-201, 2006.

BOEHRINGER, N. et al. Differential regulation of tumor necrosing factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 (IL-10) secretion by protein kinase and phosphatase inhibitors in human alveolar macrophages. **European Cytokine Network**, v. 10, n. 2, p. 211-217, 1999.

- BOGNAR, Z. et al. Extravascular lung water index as a sign of developing sepsis in burns. **Burns**, v. 36, n. 8, p. 1263-1270, 2010.
- BOIVIN, M. A. et al. Mechanism of Interferon-gamma-Induced Increase in T84 Intestinal Epithelial Tight Junction. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 1, p. 45-54, 2009.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.
- BOUMAN, A.; HEINEMAN, M. J.; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 411-423, 2005.
- BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 8, 2007.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation- estimation of neutrophil content with na enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRANISTE, V. et al. Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. **Journal of Physiology-London**, v. 587, n. 13, p. 3317-3328, 2009.
- BRAZIL, J. C.; LOUIS, N. A.; PARKOS, C. A. The Role of Polymorphonuclear Leukocyte Trafficking in the Perpetuation of Inflammation During Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 7, p. 1556-1565, 2013.
- BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 249-286, 2008.
- BRUEWER, M. et al. Interferon-gamma induced endocytosis of occludin, claudin-1 and -4: A role for macropinocytosis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. A108-A108, 2004.
- BRUEWER, M. et al. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. **Faseb Journal**, v. 19, n. 8, p. 923-933, 2005.
- BRUEWER, M. et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6164-6172, 2003.
- CAI, B. L.; DEITCH, E. A.; ULLOA, L. Novel Insights for Systemic Inflammation in Sepsis and Hemorrhage. **Mediators of Inflammation**, p. 10, 2010.
- CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 305-310, 2007.

- CAMPBELL-THOMPSON, M.; LYNCH, I. J.; BHARDWAJ, B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER beta isoforms in colon cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 2, p. 632-640, Jan 2001.
- CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2431-2447, 2003.
- CARRICO, C. J. et al. Multiple organ failure syndrome. **Archives of Surgery**, v. 121, n. 2, p. 196-216, 1986.
- CARRITHERS, M. et al. Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 1, p. 185-196, 2005.
- CAVAILLON, J. M. Contribution of cytokines to inflammatory processes. **Pathologie Biologie**, v. 41, n. 8BIS, p. 799-811, 1993.
- CENCI, S. et al. Estrogen deficiency causes bone loss through upregulated T cell production of TNF alpha. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, p. S167-S167, 2000.
- CHANCEY, A. L. et al. Modulation of cardiac mast cell-mediated extracellular matrix degradation by estrogen. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 1, p. H316-H321, 2005.
- CHOLERIS, E. et al. Estrogen receptor beta agonists in neurobehavioral investigations. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 9, n. 7, p. 760-773, 2008.
- CHRISTEFF, N. et al. Effect of estradiol on endotoxin-induced changes in steroid hormone levels and lethality in male rats. **Circulatory Shock**, v. 44, n. 3, p. 154-159, 1994.
- CHRISTEFF, N. et al. Relationship between changes in serum estrone levels and outcome in human males with septic shock. **Circulatory Shock**, v. 36, n. 4, p. 249-255, 1992.
- CLARK, J. M. et al. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, n. 6, p. 2076-2083, 1995.
- CLERICI, E. et al. Sex steroids and primary antibody response invitro. **Faseb Journal**, v. 5, n. 6, p. A1487-A1487, 1991.
- COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 1-16, 1997.
- CONDE, K. A. P. et al. Differences in Sepsis Treatment and Outcomes between Public and Private Hospitals in Brazil: A Multicenter Observational Study. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 11, 2013.

CONDLIFFE, S. B.; DOOLAN, C. M.; HARVEY, B. J. 17 beta-Oestradiol acutely regulates Cl⁻ secretion in rat distal colonic epithelium. **Journal of Physiology-London**, v. 530, n. 1, p. 47-54, 2001.

CONG, P. et al. Abnormalities of prostaglandins and cyclooxygenase enzymes in female patients with slow-transit constipation. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 445-453, 2007.

COOK, S. F. et al. Project IMPACT: Results from a pilot validity study of a new observational database. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 12, p. 2765-2770, 2002.

COSTANTINI, T.W. et al. Vagal nerve stimulation protects against burn - induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. **Am J Physiol**, v. 299, n. 6, p.1308-18, 2010.

CREWS, D. et al. Postnatal environment affects behavior of adult transgenic mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 9, p. 935-939, 2004.

CUI, W. et al. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 330-337, 2010.

CUTOLO, M.; WILDER, R. L. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 825-+, 2000.

CUZZOCREA, S. et al. 17 beta-estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1455-1463, 2000.

CUZZOCREA, S. et al. The protective role of endogenous estrogens in carrageenan-induced lung injury in the rat. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 7, p. 478-487, 2001.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: Critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DEITCH, E. A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Archives of Surgery**, v. 125, n. 3, p. 403-404, 1990.

DEITCH, E. A.; BERG, R.; SPECIAN, R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. **Archives of Surgery**, v. 122, n. 2, p. 185-190, 1987.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.

DEMEO, M. T. et al. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 34, n. 4, p. 385-396, 2002.

DEROO, B. J.; BUENSUCESO, A. V. Minireview: Estrogen Receptor-beta: Mechanistic Insights from Recent Studies. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 9, p. 1703-1714, 2010.

DESHPANDE, R. et al. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NPkB activation in murine macrophages. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, n. 1, p. 46-54, 1997.

DIMAYUGA, F. O. et al. Estrogen and brain inflammation: Effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 161, n. 1-2, p. 123-136, 2005.

DINARELLO, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Pathology of Septic Shock**, v. 216, p. 133-165, 1996.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist production during hemodialysis- which cytokine is a surrogate marker for dialysis-related complications. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 10, p. 25-28, 1995.

DOIG, C. J. et al. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 2, p. 444-451, 1998.

DOMBROVSKIY, V. Y. et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 5, p. 1244-1250, 2007.

DWORATZEK, E.; MAHMOODZADEH, S. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 119, p. 27-35, 2017.

EACHEMPATI, S. R.; HYDO, L.; BARIE, P. S. Gender-based differences in outcome in patients with sepsis. **Archives of Surgery**, v. 134, n. 12, p. 1342-1347, 1999.

ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N.; HULTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature**, v. 381, n. 6577, p. 75-77, 1996.

EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 428-442, 1993.

ENERBACK, L.; ALDENBORG, F. Histochemical-differentiation of mast-cell proteoglycans. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 34, n. 10, p. 1355-1355, 1986.

ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4258-4265, 1997.

ERLANDSSON, M. C. et al. Effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on thymus, T cell reactivity, and inflammation in mice. **Cellular Immunology**, v. 205, n. 2, p. 103-109, 2000.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 837-851, 2002.

ESPER, A. M. et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2576-2582, 2006.

EVANS, M. J. et al. Estrogen receptor alpha inhibits IL-1 beta induction of gene expression in the mouse liver. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2559-2570, 2002.

EVANS, M. J. et al. Estrogen receptors alpha and beta have similar activities in multiple endothelial cell pathways. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3785-3795, 2002.

EVANS, M. J. et al. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappa B activity in vivo. **Circulation Research**, v. 89, n. 9, p. 823-830, 2001.

FASANO, A. et al. *Vibrio-cholerae* produces a 2nd enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5242-5246, 1991.

FERRARIS, R. P.; DIAMOND, J. Regulation of intestinal sugar transport. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 1, p. 257-302, 1997.

FINN, C. A.; MARTIN, L. Endocrine control of gland proliferation in mouse uterus. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 585-588, 1973.

FIORELLI, G. et al. Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261, n. 2, p. 521-527, 1999.

FISH, S. M.; PROUJANSKY, R.; REENSTRA, W. W. Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 191-198, 1999.

FLORIAN, P. et al. Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. **Journal of Physiology-London**, v. 545, n. 2, p. 485-499, 2002.

FOGER, N. et al. Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 9, p. 1777-1787, 2011.

FOLEY, E. F. et al. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. **Cancer Research**, v. 60, n. 2, p. 245-248, 2000.

FOURRIER, F. et al. Sex steroid-hormones in circulatory shock, sepsis syndrome, and septic shock. **Circulatory Shock**, v. 43, n. 4, p. 171-178, 1994.

FRANK, M. G. et al. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. **Brain Behavior and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 19-30, 2010.

FRIEDMAN, G.; SILVA, E.; VINCENT, J. L. Has the mortality of septic shock changed with time? **Critical Care Medicine**, v. 26, n. 12, p. 2078-2086, 1998.

FU, Z. R.; THORPE, M.; HELLMAN, L. rMCP-2, the Major Rat Mucosal Mast Cell Protease, an Analysis of Its Extended Cleavage Specificity and Its Potential Role in Regulating Intestinal Permeability by the Cleavage of Cell Adhesion and Junction Proteins. **Plos One**, v. 10, n. 6, 2015.

FUJIIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 2, p. 171-194, 2003.

FUJIIHARA, S. M. et al. A D-amino acid peptide inhibitor of NF-kappa B nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 1004-1012, 2000.

FURUSE, M. et al. Occludin- a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6, p. 1777-1788, 1993.

GAIESKI, D. F. et al. Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167-1174, 2013.

GAO, H. et al. Estrogen attenuates vascular expression of inflammation associated genes and adhesion of monocytes to endothelial cells. **Inflammation Research**, v. 55, n. 8, p. 349-353, 2006.

GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 7, p. 741-757, 2007.

GHISLETTI, S. et al. 17 beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappa B intracellular localization. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 8, p. 2957-2968, 2005.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GIBSON, S.; MILLER, H. R. P. Mast-cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. **Immunology**, v. 58, n. 1, p. 101-104, 1986.

GILMORE, W.; WEINER, L. P.; CORREALE, J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 1, p. 446-451, 1997.

GITTER, A. H. et al. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. **Faseb Journal**, v. 14, n. 12, p. 1749-1753, 2000.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1306-1310, 2002.

GOGOS, C. A. et al. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: A marker for prognosis and future therapeutic options. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 176-180, 2000.

GORODESKI, G. I. Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 218-231, 2007a.

GORODESKI, G. I. Estrogen modulation of epithelial permeability in cervical-vaginal cells of premenopausal and postmenopausal women. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 14, n. 6, p. 1012-1019, 2007b.

GRAHAM, W. V. et al. Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events - Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26205-26215, 2006.

GRODSTEIN, F.; NEWCOMB, P. A.; STAMPFER, M. J. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: A review and meta-analysis. **American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5, p. 574-582, 1999.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 1, p. 3-20, 2009.

GUMBINER, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 8, p. 622-634, 2005.

GWEE, K. A. et al. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1 beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. **Gut**, v. 52, n. 4, p. 523-526, 2003.

HAMILTON, M. J. et al. Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 1, p. 290-295, 2011.

HARNISH, D. C. et al. Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 1, p. G118-G125, 2004.

HARRIS, H. A. et al. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4241-4249, 2003.

HARTSOCK, A.; NELSON, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 660-669, 2008.

HE, S. H.; WALLS, A. F. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 7, p. 1491-1500, 1998.

HELLMAN, L.; THORPE, M. Granule proteases of hematopoietic cells, a family of versatile inflammatory mediators - an update on their cleavage specificity, in vivo substrates, and evolution. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 15-49, 2014.

HIETBRINK, F. et al. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. **Shock**, v. 32, n. 4, p. 374-378, 2009.

HIGGINS, T. L. et al. Assessing contemporary intensive care unit outcome: An updated Mortality Probability Admission Model (MPM0-III). **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 3, p. 827-835, 2007.

HOMMA, H. et al. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 3, p. G466-G472, 2005.

HONDA, J. et al. Estrogen Enhances Esophageal Barrier Function by Potentiating Occludin Expression. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 4, p. 1028-1038, 2016.

HOTCHKISS, R. S. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230-1251, 1999.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. Medical progress: The pathophysiology and treatment of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 2, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS, R. S.; NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 813-822, 2006.

HOUDEAU, E. et al. Uterine motor alterations and estrous cycle disturbances associated with colonic inflammation in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 3, p. R630-R637, 2005.

HUANG, C. F. et al. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 4, p. 1910-1919, 1998.

HUSSEIN, I. H. et al. Estrogens control inflammation in experimental in experimental colitis. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 28, n. 2, p. 213-224, 2014.

IMAI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 310, n. 1-2, p. 3-10, 2009.

ISLANDER, U. et al. Influence of oestrogen receptor alpha and beta on the immune system in aged female mice. **Immunology**, v. 110, n. 1, p. 149-157, 2003.

IVANOV, A. I.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 1, p. 176-188, 2004.

IVANOV, A. I.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. **Bioessays**, v. 27, n. 4, p. 356-365, 2005.

IWASHYNA, T. J. et al. Population Burden of Long-Term Survivorship After Severe Sepsis in Older Americans. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 60, n. 6, p. 1070-1077, 2012.

JACOB, C. et al. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine - Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31936-31948, 2005.

JAIN, S. K.; ROGIER, K.; PROUTY, L. Protective effects of 17 beta-estradiol and trivalent chromium on interleukin-6 secretion, oxidative stress, and adhesion of monocytes: Relevance to heart disease in postmenopausal women. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1730-1735, 2004.

JIANG, Y. A. et al. Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 6, p. 1005-1008, 2002.

JOHANSSON, M. E.; HANSSON, G. C. Mucus protects the colon by separating bacteria from the epithelium. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. A516-A516, 2008.

JOHNSTON, J. D. et al. Gastrointestinal permeability and absorptive capacity in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1144-1149, 1996.

KAKIZAKI, Y. et al. Temporal profiles of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat: Estimation by push-pull perfusion. **Endocrine Journal**, v. 46, n. 4, p. 487-496, 1999.

KANG, H. S. et al. Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 402, n. 1-2, p. 30-34, 2006.

KARPUZOGLU-SAHIN, E. et al. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. **Cytokine**, v. 14, n. 4, p. 208-217, 2001.

KAUFFMANN, R. M. et al. Trends in Estradiol During Critical Illness Are Associated with Mortality Independent of Admission Estradiol. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 212, n. 4, p. 703-712, 2011.

KAUKONEN, K. M. et al. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 13, p. 1308-1316, 2014.

KAWANO, N. et al. Identification and localization of estrogen receptor alpha- and beta-positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 121, n. 5, p. 399-405, 2004.

KAY, A. B. Studies on eosinophil leucocyte migration .1. eosinophil and neutrophil accumulation following antigen-antibody reactions in guinea-pig skin. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 6, n. 1, p. 75-&, 1970.

KENNELLY, R. et al. Oestrogen and the colon: potential mechanisms for cancer prevention. **Lancet Oncology**, v. 9, n. 4, p. 385-391, 2008.

KIDO, H.; FUKUSEN, N.; KATUNUMA, N. Chymotrypsin-type and trypsin-type serine proteases in rat mast-cells-properties and functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 239, n. 2, p. 436-443, 1985.

KIM, D. H. et al. Genistein inhibits pro-inflammatory cytokines in human mast cell activation through the inhibition of the ERK pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1669-1674, 2014.

KONIGSRAINER, I. et al. The Gut is not only the Target but a Source of Inflammatory Mediators Inhibiting Gastrointestinal Motility During Sepsis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 753-760, 2011.

KONSTANTINOPOULOS, P. A. et al. Oestrogen receptor beta (ER beta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 9, p. 1251-1258, 2003.

KUDSK, K. A. et al. Enteral versus parenteral-feeding- effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. **Annals of Surgery**, v. 215, n. 5, p. 503-513, 1992.

KUHN, R. et al. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.

LAGU, T.; ROTHBERG, M. B.; SHIEH, M. S. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007 (vol 40, pg 754, 2012). **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 2932-2932, 2012.

LAMBERT, K. C. et al. Estrogen receptor alpha (ER alpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4(+) T cells while 17 beta-estradiol acts through

ER alpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4(+) T cells independent of antigen presentation. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5716-5723, 2005.

LANG, T. J. Estrogen as an immunomodulator. **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 224-230, 2004.

LATHAM, K. A. et al. Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 5820-5827, 2003.

LAUKOETTER, M. G. et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 13, p. 3067-3076, 2007.

LEE, M. Y. et al. Estradiol-17 beta protects against hypoxia-induced hepatocyte injury through ER-mediated upregulation of Bcl-2 as well as ER-independent antioxidant effects. **Cell Research**, v. 18, n. 4, p. 491-499, 2008.

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LETRONG, H.; NEURATH, H.; WOODBURY, R. G. Substrate specificity of the chymotrypsin like protease in secretory granules isolated from rat mast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 2, p. 364-367, 1987.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250-1256, 2003.

LI, J. P.; JUBAIR, S.; JANICKI, J. S. Estrogen Inhibits Mast Cell Chymase Release to Prevent Pressure Overload-Induced Adverse Cardiac Remodeling. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 328-U191, 2015.

LIAO, J. F. et al. Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat-liver. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 3, p. R699-R706, 1995.

LIN, F. S. et al. 17-Beta estradiol attenuates reduced-size hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibition apoptosis via mitochondrial pathway in rats. **Shock**, v. 37, n. 2, p. 183-190, 2012.

LOBO, S.M. et al. Gut mucosal damage during endotoxic shock is due to mechanisms other than gut ischemia. **J Appl Physiol**, v. 95, n. 5, p. 2047-54, 2003.

LUYER, M. D. et al. Exposure to bacterial DNA before hemorrhagic shock strongly aggravates systemic inflammation and gut barrier loss via an IFN-gamma-dependent route. **Annals of Surgery**, v. 245, n. 5, p. 795-802, 2007.

MA, T. Y. et al. Mechanism of TNF-alpha modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. **American**

Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 288, n. 3, p. G422-G430, 2005.

MA, T. Y. et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 3, p. G367-G376, 2004.

MA, T. Y.; BOIVIN, M. A.; SAID, H. M. Mechanism of TNF-alpha induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability: Role of NF-kappa B pathways. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. A520-A520, 2004.

MA, T. Y.; YE, D. M. TNF-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier requires NF-kappa B-dependent myosin light chain kinase (MLCK) activation. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. A518-A518, 2004.

MA, X. L. et al. Endothelial protective and antishock effects of a selective estrogen receptor modulator in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 2, p. H876-H884, 2001.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1920-1925, 2005.

MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **British Journal of Surgery**, v. 93, n. 1, p. 87-93, 2006.

MACFIE, J. et al. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 223-228, 1999.

MADARA, J. L.; STAFFORD, J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 2, p. 724-727, 1989.

MADSEN, K. L. et al. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 4, p. 262-270, 1999.

MAHIDA, Y. R.; WU, K.; JEWELL, D. P. Enhanced production of interleukin-1-Beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of crohns-disease. **Gut**, v. 30, n. 6, p. 835-838, 1989.

MAINOUS, M. R. et al. The gut- A cytokine-generating organ in systemic inflammation. **Shock**, v. 4, n. 3, p. 193-199, 1995.

MARKOV, A. G. et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 180, n. 4, p. 591-598, 2010.

MARQUES, D. A. et al. Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 1, p. 61-68, 2015.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; MOSS, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2006.

MARTIN-PADURA, I. et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. **Journal of Cell Biology**, v. 142, n. 1, p. 117-127, 1998.

MASYUK, A. I.; MARINELLI, R. A.; LARUSSO, N. F. Water transport by epithelia of the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 122, n. 2, p. 545-562, 2002.

MAY, A. K. et al. Estyadiol is associated with mortality in critically ill trauma and surgical patients. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 62-68, 2008.

MCNEIL, H. P. et al. Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease-7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 23, p. 11174-11178, 1992.

MEDZHITOV, R.; PRESTONHURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MIRZA, H. et al. Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. **Blood**, v. 90, n. 10, p. 3914-3922, 1997.

MIYAMOTO, N. et al. Estrogen protects against cellular infiltration by reducing the expressions of E-selectin and IL-6 in endotoxin-induced uveitis. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 1, p. 374-379, 1999.

MOKART, D. et al. Predictive perioperative factors for developing severe sepsis after major surgery. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, n. 6, p. 776-781, 2005.

MOLINARI, J. F. et al. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 3, p. 649-653, 1996.

MOLINO, M. et al. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4043-4049, 1997.

MORIEZ, R. et al. Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. **Shock**, v. 28, n. 1, p. 118-124, 2007.

MOUSSA, L. et al. A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 51-58, 2013.

MUNOZ-CRUZ, S. et al. Gender-Related Effects of Sex Steroids on Histamine Release and Fc epsilon RI Expression in Rat Peritoneal Mast Cells. **Journal of Immunology Research**, 2015.

MUSCH, M. W. et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 11, p. 1739-1747, 2002.

NAKAYAMA, Y. et al. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system. **Cancer Letters**, v. 161, n. 1, p. 63-71, 2000.

NEURATH, M. F. et al. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. **Nature Medicine**, v. 2, n. 9, p. 998-1004, 1996.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NICOVANI, S.; RUDOLPH, M. I. Estrogen receptors in mast cells from arterial walls. **Biocell**, v. 26, n. 1, p. 15-24, 2002.

NIKOLAUS, S. et al. Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. **Lancet**, v. 356, n. 9240, p. 1475-1479, 2000.

NIKOLAUS, S.; FOLSCH, U. R.; SCHREIBER, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. **Hepato-Gastroenterology**, v. 47, n. 31, p. 71-82, 2000.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 44-55, 2011.

NOGUEIRA, L. T. et al. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, p. 13, 2017.

NOLAN, J. P.; OCONNEL, C. J. Vascular response in isolated rat liver.I. endotoxin direct effects. **Journal of Experimental Medicine**, v. 122, n. 6, p. 1063, 1965.

NUSRAT, A.; TURNER, J. R.; MADARA, J. L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 5, p. G851-G857, 2000.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Sepsis syndromes: Understanding the role of innate and acquired immunity. **Shock**, v. 16, n. 2, p. 83-96, 2001.

ODUWOLE, O. O. et al. Downregulation of estrogen-metabolizing 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression correlates inversely with Ki67 proliferation marker in colon-cancer development. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2002.

OGLE, C. K. et al. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. **European Journal of Surgery**, v. 163, n. 1, p. 45-51, 1997.

OH, K. J. et al. Estrogen Modulates Expression of Tight Junction Proteins in Rat Vagina. **Biomed Research International**, 2016.

OHTSU, H. Pathophysiologic Role of Histamine: Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 158, p. 2-6, 2012.

OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 4, p. 369-384, 1996.

OPAL, S. M.; HUBER, C. E. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. **Critical Care**, v. 6, n. 2, p. 125-136, 2002.

PAAVONEN, T.; ANDERSSON, L. C.; ADLERCREUTZ, H. Sex-hormone regulation of invitro immune-reponse-estradiol enhances human B-cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. **Journal of Experimental Medicine**, v. 154, n. 6, p. 1935-1945, 1981.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALACIOS, B.; PANG, C. C. Y. Protective effects of ethynylestradiol on the hemodynamic changes induced by lipopolysaccharide in anesthetized rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 479-483, 1998.

PANES, J. Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 173, n. 1, p. 159-165, 2001.

PAPE, H. C. et al. INCREASED GUT PERMEABILITY AFTER MULTIPLE TRAUMA. **British Journal of Surgery**, v. 81, n. 6, p. 850-852, 1994.

PEJLER, G. et al. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 4981-4990, 2010.

PFEILSCHIFTER, J. et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 90-119, 2002.

PIETRZAK, A. et al. Surface TLR2 and TLR4 Expression on Mature Rat Mast Cells Can Be Affected by Some Bacterial Components and Proinflammatory Cytokines. **Mediators of Inflammation**, 2011.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30, p. 53-59, 2008.

QIU, Y. et al. Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. **Journal of Endocrinology**, v. 174, n. 3, p. 369-377, 2002.

QUARMBY, V. E.; KORACH, K. S. The influence of 17-Beta –estradiol on patterns of cell-division in the uterus. **Endocrinology**, v. 114, n. 3, p. 694-702, 1984.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAU, S. W. et al. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 36, p. 11420-11426, 2003.

RAY, A.; PREFONTAINE, K. E.; RAY, P. Down-modulation of interleukin-6 gene-expression by 17-Beta-estradiol in the absence of high-affinity DNA-binding by the estrogen-receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 17, p. 12940-12946, 1994.

RAY, P. et al. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: Inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. **Febs Letters**, v. 409, n. 1, p. 79-85, 1997.

REINECKER, H. C. et al. Proinflammatory cytokines in intestinal-mucosa. **Immunologic Research**, v. 10, n. 3-4, p. 247-248, 1991.

REINO, D. C. et al. Trauma Hemorrhagic Shock-Induced Lung Injury Involves a Gut-Lymph-Induced TLR4 Pathway in Mice. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 8, 2011.

REYNOLDS, D. S. et al. Cloning of the cDNA and gene of mouse mast-cell protease-6 transcription by progenitor mast cells and mast cells of the connective tissue subclass. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 6, p. 3847-3853, 1991.

RIBEIRO, A. B. et al.. Dexamethasone Prevents Lipopolysaccharide-Induced Epithelial Barrier Dysfunction in Rat Ileum. **SHOCK**, 2017.

RIVEST, S. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. In: MARTINI, L.;CHROUSOS, G. P., et al (Ed.). **Neuroendocrinology: the Normal Neuroendocrine System**. Amsterdam: Elsevier Science Bv, v.181, p.43-53, 2010.

ROGERS, A.; EASTELL, R. The effect of 17 beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. **Bone**, v. 29, n. 1, p. 30-34, 2001.

ROGLER, G. et al. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p. 357-369, 1998.

RONGIONE, A. J. et al. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 70, n. 2, p. 107-112, 1997.

RYAN, C. M. et al. Additive effects of thermal-injury and infection on gut permeability. **Archives of Surgery**, v. 129, n. 3, p. 325-328, 1994.

SAIA, R. S. et al. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. **Shock**, v. 39, n. 1, p. 104-112, 2013.

SAIA, R. S. et al. Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. **Regulatory Peptides**, v. 169, n. 1-3, p. 21-30, 2011.

SAIA, R. S.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CARNIO, E. C. Hypothermia during endotoxemic shock in female mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Shock**, v. 29, n. 1, p. 119-126, 2008.

SAIA, R. S.; GARCIA, F. M.; CARNIO, E. C. Estradiol protects female rats against sepsis induced by *Enterococcus faecalis* improving leukocyte bactericidal activity. **Steroids**, v. 102, p. 17-26, 2015.

SAILE, B. et al. The bcl, NF kappa B and p53/p21(WAF1) systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 8, p. 554-561, 2001.

SALES Jr, H.R. et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, p. 9-17, 2006.

SANDS, K. E. et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 278, n. 3, p. 234-240, 1997.

SATO, T. et al. Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. **Anatomical Record**, v. 248, n. 1, p. 76-83, 1997.

SCHEINMAN, R. I. et al. Role of transcriptional activation of I-Kappa-B-alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 283-286, 1995.

SCHMITZ, H. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 1, p. 137-146, 1999.

SCHOTTE, L. et al. Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 761-765, 2000.

SCHREIBER, R. et al. Electrolyte transport in the mouse trachea: No evidence for a contribution of luminal K⁺ conductance. **Journal of Membrane Biology**, v. 189, n. 2, p. 143-151, 2002.

SCHREIBER, S.; NIKOLAUS, S.; HAMPE, J. Activation of NF kappa B in inflammatory bowel disease - Reply. **Gut**, v. 43, n. 4, p. 588-588, 1998.

SCHRODER, J. et al. Gender differences in human sepsis. **Archives of Surgery**, v. 133, n. 11, p. 1200-1204, 1998.

SCHULZKE, J. D. et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1669, n. 1, p. 34-42, 2005.

SCHWARZ, B. T. et al. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2383-2394, 2007.

SCUDAMORE, C. L. et al. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rats mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 6, p. 1871-1881, 1995.

SEEMANN, S.; ZOHLES, F.; LUPP, A. Comparison of three different animal models for systemic inflammation. **Infection**, v. 45, p. S13-S14, 2017.

SENER, G. et al. Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 128, n. 1, p. 70-78, 2005.

SENTHIL, M. et al. Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model. **Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care**, v. 60, n. 5, p. 958-965, 2006.

SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 762-774, 2016.

SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 775-787, 2016.

SHEN, L. et al. Tight, Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. **Annual Review of Physiology, Vol 73**, v. 73, p. 283-309, 2011.

SHEN, L.; TURNER, J. R. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 4, p. G577-G582, 2006.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777-1782, 1999.

SILBERSTEIN, G. B. et al. Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system. **Journal of Endocrinology**, v. 190, n. 2, p. 225-239, 2006.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251-R260, 2004.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SINGER, P. et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Intensive care. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 387-400, 2009.

SINGH, S. et al. Expression of oestrogen receptor and oestrogen-inducible genes pS2 and ERD5 in large bowel mucosa and cancer. **Journal of Pathology**, v. 184, n. 2, p. 153-160, 1998.

SINGH, S. P. et al. Impaired Estrogen Feedback and Infertility in Female Mice with Pituitary-Specific Deletion of Estrogen Receptor Alpha (ESR1). **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 488-496, 2009.

SOGAYAR, A. M. C. et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.

SONG, M. C.; KELLUM, J. A. Interleukin-6. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. S463-S465, 2005.

SPERANDEO, P.; DEHO, G.; POLISSI, A. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 7, p. 594-602, 2009.

SPINEDI, E. et al. Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2430-2436, 1992.

SPITZER, J. A. Gender differences in some host defense mechanisms. **Lupus**, v. 8, n. 5, p. 380-383, 1999.

STALLION, A. et al. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 40, n. 3, p. 470-477, 2005.

STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. **Science**, v. 289, n. 5483, p. 1352-1355, 2000.

STEIN, B.; YANG, M. X. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen-receptor is mediated by NF-Kappa-B and C/EBP-Beta. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 9, p. 4971-4979, 1995.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521-574, 2007.

SUN, X. Y. et al. Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 1, p. G139-G147, 2008.

TALAL, N. Sex steroid-hormones and systemic lupus-erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 24, n. 8, p. 1054-1056, 1981.

TANRIOVER, M. D. et al. Epidemiology and outcome of sepsis in a tertiary-care hospital in a developing country. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 2, p. 315-322, 2006.

TAZUKE, Y. et al. Interleukin-6 changes tight junction permeability and intracellular phospholipid content in a human enterocyte cell culture model. **Pediatric Surgery International**, v. 19, n. 5, p. 321-325, 2003.

THOMAS, T. N. et al. A comparison of the anti-inflammatory activities of conjugated estrogens and 17-beta estradiol. **Inflammation Research**, v. 52, n. 11, p. 452-460, 2003.

TSANG, G. et al. Bioavailable estradiol concentrations are elevated and predict mortality in septic patients: a prospective cohort study. **Critical Care**, v. 20, 2016.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 285-293, 2001.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

TYREE, C. M.; ZOU, A. H.; ALLEGRETTO, E. A. 17 beta-estradiol inhibits cytokine induction of the human E-selectin promoter. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, n. 3, p. 291-297, 2002.

VAN DEN WIJNGAARD, R. M. et al. Peripheral a-helical CRF (9-41) does not reverse stress-induced mast cell dependent visceral hypersensitivity in maternally separated rats. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 3, p. 274-E111, 2012.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. In: (Ed.). **Annual Review of Physiology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.68, p.403-429, 2006. .

VANDERMEIDE, P. H.; SCHELLEKENS, H. Cytokines and the immune response. **Biotherapy**, v. 8, n. 3-4, p. 243-249, 1996.

VANDERPOLL, T. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 11, p. 5397-5401, 1995.

VANITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 1113-1121, 1997.

VARADARADJALOU, S. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 4, p. 899-906, 2003.

VEGETO, E. et al. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 1809-1818, 2001.

VERDANT, C. L. et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: A quantitative analysis. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2875-2881, 2009.

VERDU, E. F. et al. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 1, p. G27-G36, 2002.

VILLA, P. et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis-induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 5, p. 549-553, 1995.

VISINTIN, A. et al. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12156-12161, 2001.

WADA-HIRAIKE, O. et al. Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta(-/-) mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48, p. 18350-18355, 2006.

WAGNER, N. et al. L-selectin and beta 7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 11, p. 3832-3839, 1998.

WALSH, S. V.; HOPKINS, A. M.; NUSRAT, A. Modulation of tight junction structure and function by cytokines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 3, p. 303-313, 2000.

WANG, F. J. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 2, p. 409-419, 2005.

WANG, L. X. et al. Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells - Potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 11, p. 8219-8227, 2007.

WANG, Q.; FANG, C. H.; HASSELGREN, P. O. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 3, p. R1013-R1023, 2001.

WATANABE, N.; MIURA, K.; FUKUDA, Y. Chymase inhibitor ameliorates eosinophilia in mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 128, n. 3, p. 235-239, 2002.

WERSHIL, B. K.; FURUTA, G. T. Gastrointestinal mucosal immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. S380-S383, 2008.

WILCZ-VILLEGA, E. M.; MCCLEAN, S.; O'SULLIVAN, M. A. Mast Cell Tryptase Reduces Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) Expression in Intestinal Epithelial Cells: Implications for the Mechanisms of Barrier Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome. **American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 7, p. 1140-1151, 2013.

WILHELMS, S. B. et al. Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes: Difficulties with methods and interpretation of results. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1442-1449, 2010.

WITTE, D. et al. Estrogen receptor beta is expressed in human colorectal adenocarcinoma. **Human Pathology**, v. 32, n. 9, p. 940-944, 2001.

WOOF, J. M.; MESTECKY, J. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 64-82, 2005.

Wu, L.L. et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta. **Critical care medicine**, v. 39, n. 9, p. 2087-2098, 2011.

XIAO, Z. L. et al. Role of progesterone signaling in the regulation of G-protein levels in female chronic constipation. **Gastroenterology**, v. 128, n. 3, p. 667-675, 2005.

YAMADA, T. et al. ROLE OF NEUTROPHILS IN ACETIC ACID-INDUCED COLITIS IN RATS. **Inflammation**, v. 15, n. 5, p. 399-411, 1991.

YAMAMOTO, T. et al. IL-1 beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. **Experimental Cell Research**, v. 299, n. 2, p. 427-441, 2004.

YANG, H. et al. Interferon-gamma expression by intraepithelial lymphocytes results in a loss of epithelial barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. **Annals of Surgery**, v. 236, n. 2, p. 226-234, 2002.

YANG, R. K. et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 3, p. G621-G629, 2003.

YE, D. M.; MA, I.; MA, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 3, p. G496-G504, 2006.

YE, L. et al. Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, n. 2, p. 362-369, 2003.

YOUNAN, G. et al. The Inflammatory Response after an Epidermal Burn Depends on the Activities of Mouse Mast Cell Proteases 4 and 5. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7681-7690, 2010.

YU, H. P. et al. Mechanism of the nongenomic effects of estrogen on intestinal myeloperoxidase activity following trauma-hemorrhage: up-regulation of the PI-3K/Akt pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 774-780, 2007.

ZELLWEGER, R. et al. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 1, p. 106-110, 1997.

ZHANG, T. Y.; DAYNES, R. A. Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2517-2526, 2007.

ZHAO, X. J. et al. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. **Thorax**, v. 56, n. 3, p. 205-211, 2001.

Protective effect of estradiol on intestinal epithelial barrier dysfunction induced by endotoxemia

Aline Barbosa Ribeiro¹, Humberto Giusti¹, Celso Rodrigues Franci¹ and Rafael Simone Saia¹.

¹ Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Abbreviated title: Role of estradiol on the intestinal barrier in endotoxemic female rats

Key words: Tight junctions, inflammatory response, Lipopolysaccharide, Neutrophil, estradiol, intestinal epithelium

Number of figures: 10

* Corresponding Author and Reprint Requests: Rafael Simone Saia, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School/USP. Avenida dos Bandeirantes, 3900. 14049-900 - Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602-0221 Phone: +55 16 3315-3199

Email:

rssaia@fmrp.usp.br

Financial support: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP (FAEPA).

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

ABSTRACT

Intestinal injury is one of the serious systemic inflammation complications associated with the loss of intestinal barrier integrity characterized by the disruption of the tight junction (TJ). Estradiol has been demonstrated as an anti-inflammatory hormone, responsible for maintaining the architecture of the intestinal epithelium and the two subtypes of estradiol receptors (ER α e ER β) are normally expressed in the intestinal mucosa. Our aim was to investigate the role of estradiol on lipopolysaccharide (LPS)-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, subcutaneous) or corn oil. At 6h after endotoxemia (LPS, 1.5 mg/kg, intravenous) induction, the intestinal permeability was evaluated by injecting FITC-dextran 4 kDa in the ileum or the colon and bacterial translocation and also cytokines were quantified in the plasma and intestinal mucosa by ELISA technique. Additionally, mast cells and neutrophils were quantified in the ileum and the colon and the integrity of the tight junctions was determined by transmission electron microscopy, histological analysis, the expression of TJ proteins (occludin, claudin-1, JAM-A) and adherens junction (AJ, E-cadherin) as well as their localization. Our results demonstrated that estradiol reduced intestinal permeability as well as prevented bacterial translocation induced by LPS administration. The concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β), neutrophils and mast cells degranulation in ileum and colon mucosa were reduced in estradiol-treated rats. Estradiol treatment reverted the LPS-induced epithelial barrier dysfunction, increasing the expression of TJ, reducing TJ and AJ opening and attenuating the histological damages. Together these results suggest clearly a protective role for estradiol preventing the intestinal barrier dysfunction induced by systemic inflammation, possibly modulating the inflammatory response.

Key-words: estradiol, sepsis, tight junctions, bacterial translocation, neutrophils, mast cells, cytokines, intestinal permeability.

Introduction

Sepsis represents the systemic inflammatory response to the infection and remains as major cause of mortality and morbidity on Intensive Care Units around the world (1-3). Sepsis consists of a complex critical illness that may often evolve into a progressive and severe condition known as multiple organ dysfunction syndrome (MODS) (4, 5). The rat endotoxin/lipopolysaccharide (LPS- from cell membranes of Gram-negative bacteria) model has been commonly used as an experimental model that mimics some aspects of human septic shock. LPS-induced endotoxemia promotes a sepsis-like condition characterized by hypotension, fever and widespread tissue damage mainly in the gut (6-8). Many studies have explored the effect of gender and sex hormones on the severity, prognosis, morbidity and mortality of septic patients, suggesting that women are more resistant than men (9-12). Clinical evidences demonstrate that septic postmenopausal women (with decreased estradiol levels) have a higher mortality rate compared with men (13, 14). In this context, it has been postulated that the increased resistance of women against sepsis may be related to gonadal hormones, such as estradiol. In an experimental model of polymicrobial sepsis, females in proestrus (phase of the estrous cycle characterized by high plasma concentrations of estradiol) have higher survival rate than males (15). Furthermore, Christeff *et al.* showed that treatment with exogenous estradiol minimizes the lethal effects of endotoxin in a dose-dependent manner and also reduces mice mortality (16).

One of the possible mechanisms of action of estradiol may be the modulation of immune cell function, including macrophages, neutrophils and mast cells, altering phagocytosis and the synthesis of inflammatory mediators (17,18). This immunomodulatory role of estradiol has been reinforced by the expression of estradiol receptors (ERs) in leukocytes (19-21). ER exist in two forms, ER α and ER β , which are widely expressed in multiple tissues under physiologic and pathophysiologic conditions. In the context of systemic inflammation, gonadal hormones may also modify the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increasing secretion of corticosterone and modulating cytokine production in mice (22). Furthermore, gonadal hormones

attenuate LPS- induced hypothermia during proestrus and in ovariectomized female rats under hormone replacement therapy (23, 24).

Clinical and experimental studies have shown that the gut plays an important role in the development of MODS (4, 5). The primary function of the intestinal epithelium is form a barrier that prevents the dissemination of microorganisms and microbial derived toxins from the gut lumen (25). The integrity of this barrier is composed by adherens (AJ) and tight junctions (TJ), which provide adhesive contacts between adjacente epithelial (25, 26). Furthermore, the intestinal TJ exists as a complex multiproteic structure, including occludin, members of claudin family and junctional adhesion molecule (JAM-A) (25). The AJ form a continuous belt below the TJ and play a role in stabilizing the TJ by interactions of a variety of cytoskeletal proteins including nectins, catenins and E-cadherin (27-29). However, the integrity of the TJ structure may be compromised by several factors, including bacterial toxins, diet, overgrowth of the intestinal microbiota and inflammatory mediators, resulting in increased intestinal permeability (26).

Mast cells are described as key cells controlling inflammation and permeability of the intestine, since increased intestinal permeability and inflammation of the intestine are reduced by mast cell stabilizers (30). These immune cells are an important source of proinflammatory mediators such as TNF α (31) and also of serine proteases (tryptase and chymase), inducing infiltration and to activate neutrophils and other immune cells (32, 33). The inflammatory mediators produced during the initial phase of the systemic inflammation mediate the intestinal barrier disruption, changing the expression of TJ protein constituents, as well as its structural arrangement. Furthermore, pro-inflammatory cytokines, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α , promote internalization of the transmembrane proteins of the TJ and also increase the apoptotic activity of the intestinal epithelial cells (34-38).

Estradiol has been demonstrated as an anti-inflammatory hormone and responsible for maintaining the architecture of the intestinal epithelium (39), driving cell differentiation and proliferation (39). Both ER α and ER β are expressed in the gastrointestinal tract (40), and ER β knockout mice have an irregular shape and features of TJ (41). Additionally, estradiol decreased colonic permeability through ER β -mediated up-regulation of occludin and JAM-A in epithelial cells

(41). These experimental evidences suggest that estradiol exerts an important role in the TJ integrity under physiological conditions. Although the expression of ER have been demonstrated in immune cells and enterocytes, the participation of estradiol in the maintenance of the intestinal epithelial integrity and their mechanisms of action during systemic inflammation is poorly known. For this reason, our aim was to investigate the possible role of estradiol on LPS- induced intestinal epithelial barrier dysfunction, as well its ability to modulate the systemic and local inflammatory responses and the expression of TJ proteins. We also evaluated the ability of a mast cell stabilizer, doxantrazole, to block the increase intestinal permeability induced by LPS.

Materials and methods

Animals

Adult female Wistar rats weighing 220-230 g were obtained from the Animal Care Facility of the Ribeirão Preto Medical School (FMRP). The animals were housed under a 12:12 h light/dark cycle (lights on 06.00 h) in a ventilated and controlled temperature room ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Food and water were provided *ad libitum*. All procedures were conducted in accordance with the Ethical Guidelines of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil (protocol number 164/2013).

Experimental design

Approximately 10-12 days after ovariectomy, the rats received hormonal treatment with estradiol cypionate (ECP) (Pfizer, Paulinia, SP, Brazil), administered subcutaneously for 3 consecutive days in two different doses, 50 or 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$, to evaluate its effect on intestinal permeability, bacterial translocation, inflammatory response and expression of tight junction proteins. The doses and estradiol route of administration employed were adopted on the basis of previous study (42). The control groups received subcutaneous injection of corn oil (OVX) as the vehicle used for dilution of estradiol cypionate. On the third day, 1.5 h after the estradiol or vehicle administration, the rats received an intravenous injection

of LPS at a dose 1.5 mg/kg (*Escherichia coli* serotype O111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) or an equivalent volume of sterile isotonic saline. One group of rats received the mast cell stabilizer doxantrazole (10 mg/kg in 5% NaHCO₃, pH 7.4; a kind gift of Renee M. Van Dan Wijngaard, Tytgat Institute for Liver and Intestinal research, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands) or its vehicle, via intraperitoneal injection 1 day (7:00 PM) and 30 min (7:00 AM in the next day) before LPS administration. At 6 h after LPS administration, rats were deeply anesthetized (ketamine and xylazine at 55 and 10 mg/kg, respectively, i.p.) for intestinal mucosa permeability and bacterial translocation analyses or sample collection, as detailed in the subsequent sections. Moreover, the excised ileum and colon were placed on ice and opened longitudinally to collect mucosal samples by scraping the surface with a microscope slide. Uterus was collected, weighted and vaginal smear was taken to evaluate the effect of hormonal treatment. Mucosal samples were frozen immediately in dry ice, and stored at -70°C for further analysis of cytokines, TJ, JA, and myeloperoxidase (MPO) activity. The blood was collected by cardiac puncture in chilled 15-ml tubes (containing 1.500 IU/tube of sodium heparin), gently homogenized, kept on ice and centrifuged for 20 min at 2,000g at 4 °C for quantification of fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa (FD-4), cytokines and corticosterone. The blood samples were rapidly distributed in multiple aliquots and stored at -70 °C.

Bilateral ovariectomy

Rats were anesthetized (ketamine and xylazine at 55 and 10 mg/kg, respectively, i.p.). The ovaries were accessed by a small incision made between the last rib and the upper pelvic ridge. A small portion of the uterus was knotted with sterile cotton suture and the ovaries were removed. After surgery, all animals were treated with antibiotics (100,000 UI of benzylpenicillins and 50 mg of streptomycin, i.m.) and analgesic flunixin (2.5 mg/kg, s.c.; Banamine, Schering, São Paulo, SP, Brazil). They were returned to collective cages and allowed a recovery period of 10–12 days before the experiment took place.

Jugular vein cannulation and LPS administration

One day before the experiment, the jugular vein was cannulated for intravenous administration of LPS. Under tribromoethanol anesthesia (250 mg/kg bw, ip), a SILASTIC cannula (Dow Corning Corp., Midland, MI) was inserted through the external jugular vein into the right atrium. On the day of the experiment, 1.5 h after the estradiol administration, the LPS (1.5 mg/kg, iv) or Saline were administered in rats.

Intestinal permeability

Intestinal mucosa permeability to FD-4 was assessed using the *ex vivo* method and evaluated as the paracellular flux of FD-4 into the blood. In this experiment, 6 h after LPS administration, the rats were deeply anesthetized (ketamine and xylazine at 55 and 10 mg/kg, respectively, i.p.) and a midline abdominal incision was made. The portions of the ileum and colon were gently massaged to remove the luminal content. In the terminal ileum, the last 5 cm were identified (distant 3 cm from the ileocecal valve) using two sutures. In the colon, a sac was formed with 3 cm and 2 cm distant from the ileocecal valve. Thus, a solution with PBS containing FITC-dextran (10 mg/animal) was injected into the lumen sac. The intestine was returned to the abdominal cavity, which was covered with saline and aluminum foil to prevent dehydration and fluorescence emission. Approximately 1 h after the injection of the FITC-dextran, the blood was collected by cardiac puncture in chilled 15-ml tubes (containing 1,500 IU/tube of sodium heparin), gently homogenized, kept on ice and centrifuged for 20 min at 2,000 g at 4 °C. Plasma concentrations of FITC-dextran were determined by spectrofluorometry (Molecular Diagnostics, Sunnyvale, CA, USA). The absorbance of FITC-dextran was measured in $\lambda_{\text{excitation}} = 475 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}} = 530 \text{ nm}$. A standard curve of FD-4 was diluted in rat plasma and its detection limit was 0.015 $\mu\text{g/ml}$.

Bacterial translocation

At 6 hours after LPS administration, rats were deeply anesthetized (ketamine and xylazine at 55 and 10 mg/kg, respectively, i.p.) for mesenteric lymph nodes collection under aseptically conditions. Mesenteric lymph nodes (5-

10 per rat) were dissected from fat, weighted and the samples were homogenized in 200 μ L of sterile PBS. Eighty μ L of the homogenate was plated in duplicates on brain heart infusion agar (BHI, Himedia Labs, Mumbai, India) and incubated at 37 °C under aerobic condition for 24h (43). The number of viable bacteria in all samples was counted and the results were expressed as the number of colony forming units (CFU) per g of tissue.

Histology

Segments of ileum and colon were washed in PBS, fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Tissue sections (6 μ m) were mounted, deparaffinized, rehydrated with alcohol and water and stained using Hematoxylin and Eosin. The tissue sections were examined in blinded fashion under the DMC 2900 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The morphological criteria were evaluated based in previous studies (46, 47). The score was based on the following criteria (score: 0–5): normal epithelium (score 0), subepithelial space formation (score 1); extension of the subepithelial space with moderate lifting of the epithelial layer from the lamina propria (score 2); massive epithelial lifting down the sides of the villi (score 3); denuded villi with lamina propria and dilated capillaries exposed (score 4); and digestion and disintegration of the lamina propria, hemorrhage, and ulceration (5).

In addition, other sections were stained with toluidine blue solution (1 g of toluidine blue dissolved in 70% ethanol), for evaluation of mast cells (48). Mast cell granules stain purple in color due to the presence of heparin and histamine, therefore purple stain was recognized as a positive staining for mast cells. The total number of mast cells (granulated and degranulated) were counted manually, considering three specimens per group and ten fields per slide. Intensely toluidine blue-stained granulated cells, as well as cells exhibiting different degrees of degranulation that paralleled lighter staining (degranulated), were observed. The results were expressed as the percentage of mast cells degranulated by total amount (48).

Cytokines levels measurements

The plasma concentrations and gut mucosa ileal (and colonic) contents of IL-10, TNF α , IL-6, IFN- γ and IL-1 β were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (OptEIA BD Biosciences, San Diego- CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg (each cytokine) / mL or pg (each cytokine)/ mg of total protein. The IL-10, TNF α , IL-6, IFN- γ and IL-1 β detection kits limits were 10, 5, 10, 10, 5 pg/mL, respectively.

Myeloperoxidase (MPO) assay

Neutrophil infiltration in the ileal and colonic mucosa was indirectly determined using the myeloperoxidase (MPO) activity assay (43). MPO activity has widely accepted as an enzyme marker to quantify the degree of inflammation (44). Approximately 100 mg of sample mucosa were homogenized on ice with Polytron in 200 μ L of ice cold pH 4.7 buffer (NaCl 0.1 M, NaPO₄ 0.02 M, NaEDTA 0.015 M), and centrifuged at 30,000 g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was subjected to hypotonic lysis (500 μ L of cold 0.2% NaCl solution). After 30 minutes were added 500 μ L of 1.6% NaCl solution with cold 5% glucose. After centrifugation, the pellet was resuspended in 500 μ L 0.05M NaPO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium (HTAB) and re-homogenized with Polytron and centrifuged at 30,000 g for 15 minutes at 4°C. MPO activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the optical density (OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM, Sigma) and H₂O₂ (0.5 mM). The results were expressed as OD (optical density) per mg total protein, which was measured by the colorimetric Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Corticosterone and estradiol radioimmunoassay

Plasma corticosterone concentrations were measured using double-antibody radioimmunoassay, according to the technique previously described (45). Plasma was extracted using absolute ethanol, lyophilized and stored at -20°C until the radioimmunoassay. All samples were measured at the same assay

to avoid interassay variation using specific antibody (Sigma, St. Louis- MO, USA) and ^3H -corticosterone (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). The lower limit of detection was 0.04 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation was 5%. Estradiol concentrations were determined by double-antibody radioimmunoassay with Kit MP Biomedical® Double Antibody (Eschwege, Germany). The lower limits of detection for estradiol concentrations were 1.5 pg/mL and the intra-assay coefficient of variation was 3.5%.

Western blot in ileum and colon

The sample's total protein content was measured by the colorimetric Bradford method. The protein amounts of the ileal and colonic mucosa (100 μg) were dissolved in Laemmli buffer, denatured (95°C for 5 min) and separated by SDS-polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE). Subsequently, the gel were transblotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Fairfield-CT, USA) (100 V for 1 h) using a transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol). After transfer was completed, blots were washed in Tris-buffered saline (TBS-T; 160 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% Tween 20) and incubated overnight at 4°C in blocking buffer [5% bovine serum albumin (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) dissolved in TBS-T. Membranes were washed and incubated overnight at 4°C with one primary antibody, all diluted in TBS-T containing 5% BSA: rabbit polyclonal anti-ER α (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-ER β (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-occludin (1:350; Sigma, St. Louis, MO, USA), rabbit polyclonal anti-claudin-1 (1:250, Sigma, St. Louis, MO, USA), rabbit polyclonal anti-JAM-A (1:350; Sigma, St. Louis, MO, USA), mouse monoclonal anti-E-cadherin (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-NF- κB p65 (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA), mouse monoclonal anti-I κB - α (1:150, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), mouse monoclonal anti-chymase (1:150, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-tryptase (1:150, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and mouse monoclonal anti-Caspase-3 (1:200, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). After these procedures, membranes were washed to remove the unbound antibody excess

and incubated for 1h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody anti-rabbit IgG (1:10000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and anti-mouse IgG (1:10000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). The immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) reagents (Bio-Rad) for 5 min and captured on X-ray film. The bands intensity was quantified using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA), which was normalized with the respective β -actin signals.

Immunofluorescence

The localization of claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin in the ileum and colon was investigated by immunofluorescence performed on 12 μ m thick cryostat sections. The sections were prepared *according* to the method reported in our previous study (49). Nonspecific binding was blocked with PBS containing 5% BSA (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and 0.5% triton X-100 for 1 h at room temperature. Thus, the section were washed and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: rabbit polyclonal anti-occludin (1:25; Sigma, St. Louis, MO, USA), rabbit polyclonal anti-claudin-1 (1:25, Sigma, St. Louis, MO, USA), rabbit polyclonal anti-JAM-A (1:25; Sigma, St. Louis, MO, USA), mouse monoclonal anti-E-cadherin (1:25; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). In the next day, sections were washed and incubed with anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to Texas Red (1:300; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or anti-mouse Alexa Fluor (1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h. Finally, the nuclear staining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1 mg/mL; Sigma) and slides were mounted on an antifade médium (Fluoromount G; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). The section were analyzed under fluorescence examination using na imaging system connected to na epifluorescent microscope (Zeiss KS 300, Thornwood, NY).

Transmission electron microscopy

The sections were fixed according to the method reported in our previous study (49). Posteriorly, tissue was postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in epoxy resin, as previously described (50, 51). Then, semithin sections at 0.5mm were cut and stained with 1% toluidine blue to assist in selecting the appropriate area to make the ultrathin sections. The ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Jeol JEM -100CXII (Peabody, Mass) electron microscope equipped with a digital system for conventional transmission electron microscopy. The TJ and JA morphology was evaluated in two ultrathin sections per animal, at least 20 junctional regions/section, being seven representative TJ photographed randomly. Morphologically, an open TJ was considered a dilatation in the apical or the close region of the junctional complex. Results were expressed as percentage of opened TJ e JA compared to control.

Statistical Analysis

All values are expressed as means $\pm$ S.E.M. Data showed in figures are representative of at least two or three independent experiments. All samples were measured in the same session to reduce experimental inter-assay variation. Data were compared using two-way analyses of variance (ANOVA) and significant differences were obtained using the Bonferroni post-hoc test (GraphPad Software version 5.0, San Diego-CA, USA). For doxantrazole experiment the data were analyzed by Student t test. The morphological injury was statistically analysed using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn post-test because they were not normally distributed. For all tests, statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Effect of estradiol on intestinal permeability and bacterial translocation during endotoxemia

We first investigated the effect of estradiol in uterine weight (DATA NOT SHOW) and in plasma 17β -estradiol concentrations. As expected, ovariectomy

induced uterine atrophy and reduced plasma 17β -estradiol concentrations. However, estradiol treatments caused an increase in uterine weight and on plasma 17β -estradiol concentrations in a dose-dependent manner at compared with oil administration ($P < 0.05$) (Figure 1A). Plasma estradiol levels were higher in ovariectomized rats treated with 100 $\mu\text{g/kg}$ estradiol at compared with ovariectomized rats treated with oil and estradiol at 50 $\mu\text{g/kg}$ ($P < 0.05$). In addition, 100 $\mu\text{g/kg}$ of estradiol resulted in estradiol plasma levels that are higher than normal maximal values during the estrous cycle (52).

Analysis of the ER expression by Western blot revealed that in colonic mucosa, estradiol treatments caused an increase in ER α and ER β expression. (Figure 1C and Figure 1D, respectively; $P < 0.05$). No effect of estradiol or LPS was found in ER α and ER β expression in ileum under these experimental conditions (DATA NOT SHOW).

Figure 1 also shows the effect of LPS administration in ileal (Figure 1E) and colonic (Figure 1F) permeability in ovariectomized female rats. In those rats treated with oil, the LPS administration increased plasma FD-4 levels compared the saline administration in ileum and colon ($P < 0.05$). However, in endotoxemic rats treated with estradiol at 50 $\mu\text{g/kg}$ or 100 $\mu\text{g/kg}$, the plasma FD-4 levels were reduced when compared to ovariectomized rats treated with oil ($P < 0.05$). In nonendotoxemic rats, however the estradiol pretreatment did not change the plasma FD-4 levels in comparison to the control group receiving oil.

Bacterial translocation from the gut lumen to MLN has been considered another important method to determine the integrity of the intestinal mucosal barrier (53). The endotoxemia increased the number of bacteria in the homogenate of MLN ($P < 0.05$). On the other hand, the bacterial translocation induced by LPS administration was significantly reduced in those ovariectomized rats treated with the two doses of estradiol tested 50 or 100 $\mu\text{g/kg}$ (Figure 1G).

Estradiol modulates the systemic inflammatory response during endotoxemia

The estradiol pretreatment *per se* had no effect on cytokine plasma concentrations (Table1). However, in plasma, the LPS administration increased all cytokines evaluated compared with rats administered saline ($P < 0.05$). Interestingly, a significant increase of plasma IL-10 levels was detected in

ovariectomized rats treated with estradiol at 50 and 100 µg/kg compared with endotoxemic rats treated with oil ($P < 0.05$). Furthermore, only the higher dose of estradiol decreased the plasma IL-1 β levels compared with oil-treated rats ($P < 0.05$). On the other hand, the plasma levels of the others pro-inflammatory cytokines evaluated, TNF- α , IL-6 and IFN- γ , were not changed compared to endotoxemic groups.

Table 1 also shows the effect of estradiol on plasma corticosterone concentrations during endotoxemia. The LPS administration increased the corticosterone levels compared with saline group ($P < 0.05$). Plasma corticosterone levels were higher in ovariectomized rats treated with 100 µg/kg estradiol at compared with ovariectomized rats treated with oil and estradiol at 50 µg/kg ($P < 0.05$).

Estradiol prevents histological injury in ileum and colon during endotoxemia

Figure 2 depicts the histological damages in the ileum and the colon. In endotoxemic female rats, the light microscopic evaluation demonstrated diferente degrees of structural changes ranging from subepithelial space formation to extension of the subepithelial space with moderate lifting of the epithelial layer to the exposure of the *lamina propria*. In contrast, the specimens from ovariectomized rats treated with 100 µg/kg of the estradiol showed reduction of the damages induced by LPS ($P < 0.05$).

Estradiol increases claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin expression in ileum and colon mucosa during endotoxemia

The intestinal epithelial tight junctions, claudin-1 (Figure 3B, 4B; ileum and colon; respectively), occludin (Figure 3C, 4C; ileum and colon; respectively), JAM-A (Figure 3D, 4D; ileum and colon; respectively), and E-cadherin (Figure 3E, 4E; ileum and colon; respectively) were examined to explore the mechanisms that estradiol modulates the integrity of the intestinal epithelial barrier during endotoxemia. In endotoxemic rats, the expression of claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin was drastically reduced in comparison to the control groups treated with saline or estradiol in ileum ($P < 0.05$). However, in colonic mucosa,

the disruption of the intestinal epithelial barrier was associated only with a significant decrease in the expression of constituent proteins of the TJ, including occludin, claudin-1, and JAM-A.

The estradiol pretreatment at the higher dose significantly restored the expression of claudin-1, occludin, JAM-A (only colonic mucosa) and E-cadherin (only ileal mucosa) ($P < 0.05$). However, the JAM-A expression was increased by estradiol pretreatment at the lower dose ($P < 0.05$). The E-cadherin was not affected by LPS and estradiol in colonic mucosa (Figure 4E). In nonendotoxemic rats, the expression of almost all TJ and JA proteins was not affected by hormone replacement.

Estradiol treatment prevents derangements in tight junction and adherens junction localization and opening induced by endotoxemia

To morphologically confirm our Western blot findings, immunofluorescence for claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin were performed on ileal (Figure 5A) and colonic (Figure 5B) sections. In ovariectomized rats treated with oil and saline, claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin (red) can be seen between the epithelial cells lining the epithelial surface of the ileum and colon, and its crypts. The same pattern can be seen in ovariectomized rats treated with estradiol (50 or 100 $\mu\text{g/kg}$) and LPS. In contrast, this pattern of TJ and JA proteins organization was modified in sections obtained from ovariectomized rats treated with oil and LPS, exhibiting a decrease in the protein staining over the entire epithelium and also a diffuse structure in the intracellular compartment. The nuclear stain indicates the presence of epithelial cells even in the endotoxemic rats, demonstrating that the loss of claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin in LPS treated animals was not because of loss of epithelial cells.

Figure 6 depicts transmission electron micrographs showing the opening of TJ and JA in ileum and colon. LPS administration increased the opening of TJ and JA in ileum (Figure 6B and 6C, respectively) and colon (Figure 6D and 6E, respectively) ($P < 0.05$). In contrast, estradiol administration reduced the ultrastructural damages and LPS-induced opening ($P < 0.05$).

Estradiol modulates the local inflammatory response during endotoxemia

The estradiol pretreatment *per se* had no effect on cytokine neither in ileal mucosa (Table 2) nor colonic mucosa (Table 3). However, in ovariectomized rats treated with the LPS administration increased all cytokines evaluated compared with rats administered saline ($P < 0.05$). In endotoxemic rats, the mucosa contents of TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β in the ileum were significantly reduced in estradiol-treated rats (Table 2, $P < 0.05$). However, estradiol treatment did not change IL-6 and IL-10 levels in ileal mucosa from endotoxemic rats in comparison to the control group.

In colonic mucosa, the estradiol treatment significantly reduced the production of TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-1 β induced by LPS administration (Table 3, $P < 0.05$). Differently in comparison to the pro-inflammatory mediators, the estradiol treatment did not change the IL-10 levels in the colonic mucosa ($P < 0.05$).

Table 2 and 3 also shows the myeloperoxidase (MPO) activity in the mucosa of the ileum and colon. In ovariectomized rats, the LPS administration increased MPO activity in ileal and colonic mucosa, suggesting an increase of recruitment of neutrophils to these inflamed intestinal tissues ($P < 0.05$). In addition, endotoxemic rats treated with the two doses of estradiol reduced the MPO activity in ileal and colonic mucosas ($P < 0.05$). However, in the control groups that received saline, the MPO activity did not change by the estradiol pretreatment in the both mucosas evaluated.

Estradiol mast cell degranulation during endotoxemia

We determined whether the LPS administration induces mast cell degranulation in our experimental model. In order to evaluate LPS-induced mast cell degranulation in the ileum and colon, sections of rat intestinal segments were prepared and histologically stained for mast cells. Figure 7A shows a representative histological section. Histology showed that mast cells from saline injected rats were deep blue stained demonstrating a slight degranulation in ileum (Figure 7C) and colon (Figure 7E, $P < 0.05$). In contrast, mast cells from rats

treated with LPS plus oil, were light blue stained were higher at compared with ovariectomized rats treated with oil and estradiol at 50 and 100 µg/kg demonstrating degranulation ($P < 0.05$). No effect of estradiol or LPS was found in total mast cell numbers in ileum (Figure 7B) and colon (Figure 7D) under these experimental conditions.

Mast cells are critical effectors in inflammatory diseases. These cells exert their physiological and pathological activities by releasing granules containing histamine, cytokines, chemokines, and proteases, including mast cell-specific chymases and tryptases (32, 33).

In ileal mucosa, the estradiol treatment significantly reduced the expression of chymase (Figure 8B) compared with ovariectomized rats treated with oil plus saline and oil plus LPS ($P < 0.05$). Moreover, ovariectomized rats treated with LPS increased tryptase (Figure 8C) expression, however pretreatment at the dose of 50 and 100 µg/kg significantly down-regulated the expression of tryptase.

In colonic mucosa, LPS administration induced chymase (Figure 8D) and tryptase (Figure 8E) expression. ($P < 0.05$). The estradiol pretreatment at both doses significantly reduced tryptase and chymase expression in ileum and colon ($P < 0.05$).

To determine the role of mast cell activation in LPS-mediated intestinal permeability, we evaluated the pretreatment with a mast cell stabilizer (doxantrazole) in plasma FD-4 concentration in ileum (Figure 8F) and colon (Figure 8G). The doxantrazole administration reduced the effect of LPS on intestinal permeability in both intestinal segments ($P < 0.05$).

Effects of estradiol and LPS on NF-KB pathway and apoptosis

Having established the anti-inflammatory role of estradiol administration in endotoxemic rats, we also investigated the mechanisms of estradiol's effects on local inflammatory responses. The synthesis of pro-inflammatory cytokines is dependent on NF-kB (p65) activation and IκB inhibition.

Figure 9 and 10 demonstrated that the anti-inflammatory role of estradiol in ileal mucosa (Figure 9B) and colonic mucosa (Figure 10B) may be mediated by the inhibition of a NF-kB (p65) dependent pathway ($P < 0.05$). In contrast, in

non-endotoxemic rats, the estradiol administration did not modify the NF- κ B (p65) expression.

In ileum (Figure 9C) and colon (Figure 10C), LPS administration decreased I κ B expression, meantime the pretreatment with estradiol increased the I κ B expression in both intestinal segments however ($P < 0.05$).

Intestinal injury is usually associated with cell apoptosis. We also investigated the anti-apoptotic role of estradiol in endotoxemic condition. As shown in figure 9E and 10E, the expressions of active caspase-3 were markedly decreased in endotoxemic rats treated with estradiol at 100 μ g/kg in ileum and colon, respectively ($P < 0.05$).

Discussion

Together these results suggest that the estradiol treatment attenuated the LPS-induced intestinal injury, evidenced by increased intestinal permeability in ileum and colon, increased bacterial translocation to the mesenteric lymph nodes, and also elevated neutrophil infiltration and mast cells degranulation in the intestinal mucosa. One possible mechanism for action of estradiol may include the modulation of the systemic and local inflammatory responses by NF- κ B downregulation. Additionally, treatment with estradiol reverted the LPS-induced epithelial barrier dysfunction, up-regulating the expression of TJ and JA in ileum (claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin) and colon (claudin-1, occludin and JAM-A), and attenuating the histological damages and LPS-induced opening of TJ and JA in ileum and colon. Efforts to better understand the underlying mechanisms of LPS-induced epithelial barrier dysfunction are important, and in this context, a possible beneficial role of estradiol on the integrity of intestinal barrier could open a valuable clinical prospect in sepsis.

Intestinal injury is one of the serious sepsis complications associated with motility disorder, decreased nutrients absorption and barrier dysfunction (54). The loss of intestinal barrier integrity characterized by the disruption of the paracellular tight junction may lead to the translocation of microorganisms from the intestinal lumen through the epithelial mucosa into the mesenteric lymph nodes and possibly other organs (11). Our results evidence endotexemia as a primary injury for the intestinal epithelium as previously reported (50), increasing

ileal and colonic permeability. The sepsis induces barrier dysfunction by injuring epithelial cells and tight junctions between adjacent epithelial cells, may often leads to a progressive condition known as multiple organ dysfunction syndrome (MODS) (34, 35). The mechanisms of action of inflammatory mediators in intestinal barrier dysfunction are multiple. The pro-inflammatory cytokines, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α promotes dramatic reorganization of TJ proteins, with internalization of transmembrane proteins (including occludin, JAM-1, claudin-1 and claudin-4) (36-38). In addition, cytokine-induced apoptosis has also been implicated in compromising mucosal barrier function (26, 34).

Previous studies demonstrated the influences of sex hormones, mainly the estradiol, on systemic inflammatory condition. The presence of high plasma levels of estradiol minimize the lethal effects of sepsis in females, increasing their survival when compared to males (15, 16). Thus, understanding the mechanisms by which sepsis leads to MODS, as well as the role of sex hormones in modulating this inflammatory response is of great significance in the pathophysiology of sepsis. Although there is growing evidence that estradiol plays a role in the architectural maintenance and intestinal epithelium proliferation (39), the influence of this hormone on intestinal permeability and bacterial translocation in endotoxemia induced by LPS administration has received poor attention.

Our study demonstrated for the first time, that estradiol reduced intestinal permeability and prevented bacterial translocation induced by LPS. In physiological conditions, previous studies have shown the influence of estradiol on the paracellular permeability in human endothelial and epithelial ectocervical cells (55, 56). Additionally, Braniste *et al.* showed that paracellular permeability is lower in estrus than in diestrus and also that decreased paracellular permeability under high levels of estradiol is associated with a concomitant increase in the colonic trans-epithelial resistance (41). Consistent with this suggestion, Homma *et al.* demonstrated that female in proestrus had lower intestinal permeability as compared to male under hypoxia and acidosis, a gender difference abrogated by estradiol pretreatment in males (57).

The attenuation of epithelial barrier dysfunction in ovariectomized female rats treated with estradiol may be associated with a profound reduction in pro-inflammatory cytokines in ileal and colonic mucosas and also the increase of

plasma IL-10 levels. Two mechanisms of action of estradiol may be involved in an inflammatory condition: a direct and an indirect. The first mechanism is reinforced by presence of classical receptors of estradiol, ER α and ER β , in leukocytes (19) and macrophages (58), altering phagocytosis and the synthesis of inflammatory mediators (19). In the present study, we confirmed the expression of ER α and ER β in ileum and colon. Estradiol treatments caused an increase in ER α and ER β expression in colon, however no effect of estradiol or LPS was found in ER α and ER β expression in ileum. Studies have shown that ER β -specific agonists can influence cytokine production (59, 60) and ER α -specific agonists influence leukocyte rolling and adhesion to protect against sepsis in the colon (61). Moreover, estradiol modulates macrophage apoptosis via differential signalling through ER α and ER β (60). Consistent with this suggestion, our data showed the anti-apoptotic role of estradiol in endotoxemic condition.

The second mechanism can be the interaction of estradiol in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, increasing secretion of corticosterone (18, 58). LPS stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by a mechanism involving the release of cytokines, which activate the CRH-ACTH system and, as result, increase glucocorticoid secretion. Glucocorticoid plays a bidirectional role in regulating the inflammatory response, depending on the levels of corticosterone. High plasma corticosterone levels, as showed in ovariectomized rats treated with the higher estradiol dose, have powerful anti-inflammatory and immunosuppressive effects (62, 63). Moreover, glucocorticoid treatment has been shown to induce retightening of the intestinal TJ barrier defect in Crohn's disease patients (64).

A protective role of estradiol as an immunomodulatory hormone enlarges its beneficial effects on intestinal barrier function. In the present study, endotoxemic rats treated with both doses of estradiol exhibited the high plasma concentrations of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The IL-10 production during endotoxemic shock is part of a protective mechanism that involves the cross-talk between the inhibitory effect of IL-10 and TNF α synthesis (65). In addition, treatment with IL-10 can prevent the increase in mucosa permeability during sepsis (66). In plasma, endotoxemic rats treated with estradiol showed a trend of decreased plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines TNF, IL-6, and IFN- γ , and a significant reduction in IL-1 β levels compared to endotoxemic

rats treated with oil. This result can be related in the time kinetics of plasma cytokine production following LPS administration. Several studies have shown that TNF α , IL-6, and IFN- γ are produced within an hour or two hours after LPS administration, while the higher plasma concentrations of IL-1 β might require as long as 5h (67, 68).

Pro-inflammatory cytokines are involved in the exacerbation of the systemic inflammatory response involved in the compromise of the intestinal epithelial barrier (69). Although this inflammatory exacerbation is harmful, the number of *in vivo* studies on the role of these cytokines in intestinal dysfunction is still limited. In the present study, the estradiol treatment acted on the modulation of inflammatory responses in ileum and colon mucosas, reducing the production of pro-inflammatory cytokines, excepting IL-10. We identified that increase of intestinal permeability LPS-induced is dependent upon mast cells degranulation as previous data (70-72). The results obtained in our study are consistent with the hypothesis that mast cells and their mediators contribute to the intestinal barrier dysfunction after LPS administration, since the effects of LPS on intestinal permeability were blocked by doxantrazole. Our histological data clearly shows mast cells degranulation by i.p. LPS administration in ileum and colon. How LPS activates mast cells degranulation in our model to promote intestinal permeability increase is still unclear, but several hypotheses may explain this delayed effect.

LPS is known to activate mast cells via an indirect or a direct pathway because Toll-like receptor 4 signaling receptors are present on mast cell surface. Moreover, functional activation of mast cells leads to degranulation of their mediators preformed and stored in secretory granules or to de novo synthesis mediators. Our results corroborate with these important findings, since ovariectomized rats treated with LPS increased chymase and tryptase expression. Tryptase constitutes the major protein released on mucosal mast cell degranulation and can activate PAR-2, a receptor highly expressed throughout the gastrointestinal tract and its activation leads to intestinal inflammation and impairment of intestinal permeability (73).

The mast cells products may increase permeability indirectly by stimulating the influx of inflammatory cells such as neutrophils. Our data showed the presence of elevated MPO activity in both mucosas in endotoxemic rats and its

can indicate the contribution of neutrophil infiltration in LPS-induced tissue damage. In many inflammatory responses, important components of pathological process are linked to the ability of neutrophils to destroy normal cells and dissolve connective tissue by cytotoxic and other products release (74).

The present study shows that estradiol reduces the amount of local/mucosal pro-inflammatory cytokines production by modulation of NF- κ B and I κ B expression, increases systemic anti-inflammatory IL-10 and decreases MPO activity, suggesting a role of this gonadal hormone in the maintenance of the intestinal epithelial barrier. Hence, the increased expression of TJ and JA in ileum (claudin-1, occludin, JAM-A and E-cadherin) and colon (claudin-1, occludin and JAM-A), ameliorates epithelial barrier integrity by estradiol administration. The claudins, a large family of intercellular adhesion molecules (75), have been shown to enhance paracellular sealing in the ileum and colon (76-78). Moreover, estradiol may also regulates the expression of other proteins involved in the epithelial TJ complex such as occludin and junctional adhesion molecule-A (41).

Modulatory effects of estradiol, including improvement of histological injury, reducing protein derangement and attenuating the LPS-induced TJ opening were observed and possibly explain some beneficial effects attributed to female sex. These results positively correlate with reductions in the intestinal permeability, bacterial translocation, and gut inflammatory response induced by LPS.

Conclusion

Therefore, a new protective function of estradiol in the preservation of gut barrier extends its beneficial effects on the gastrointestinal tract, possibly acting as anti-inflammatory mediator, reducing neutrophil infiltration, mast cells degranulation and cytokine production induced by systemic inflammation. Furthermore, pre-treatment with estradiol reverted the LPS-induced epithelial barrier dysfunction, increasing the expression and opening of TJ and JA and attenuating the histological damages. These findings may help to explain the difference between gender in relation to the intestine injury during sepsis. In conclusion, our results provide additional data that estradiol participates in the

gut protection against the deleterious effects of systemic inflammation, particularly in the intestinal epithelium.

Acknowledgements

We would like to thank Rubens Fernando de Mello and Marina Holanda for the technical assistance. We also thank Maria Dolores Seabra Ferreira and Jose´ Augusto Maulim (Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos) for their help with the transmission electronic microscopy.

References

1. **ENGEL C, et al.** Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*, 2007; 33 (4): 606-618.
2. **IWASHYNA TJ, et al.** Population Burden of Long-Term Survivorship After Severe Sepsis in Older Americans. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2012; 60 (6): 1070-1077.
3. **GAIESKI DF, et al.** Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States. *Critical Care Medicine*, 2013, 41 (5): 1167-1174.
4. **NIEUWENHUIJZEN GAP, DEITCH EA, GORIS RJA.** Infection, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *European Journal of Surgery*, 1996; 162 (4): 259-273.
5. **NIEUWENHUIJZEN GAP, DEITCH EA, GORIS, RJA.** The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *Journal of Anatomy*, 1996; 189: 537-548.
6. **FURUSE M, et al.** Occludin – a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 1993;123 (6): 1777-1788.
7. **JOHNSTON JD, et al.** Gastrointestinal permeability and absorptive capacity in sepsis. *Critical Care Medicine*, 1996; 24 (7):1144-1149.
8. **HARTSOCK A, NELSON WJ.** Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008; 1778 (3): 660-669.

9. **SANDS KE, et al.** Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 1997; 278 (3): 234-240.
10. **ANGUS DC, et al.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 2001; 29 (7): 1303-1310.
11. **ALBERTI C, et al.** Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Medicine*, 2002; 28 (4): 525-526.
12. **ANNANE D, et al.** Current epidemiology of septic shock - The CUB-Rea network. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2003; 168 (2): 165-172.
13. **WATANAKUNAKORN C.** Staphylococcus aureus endocarditis at a community teaching hospital, 1980 TO 1991 – na analysis of 106 cases. *Archives of Internal Medicine*, 1994; 154 (20): 2330-2335.
14. **MCLAUCHLAN GJ, et al.** Outcome of patients with abdominal sepsis treated in na intensive care unit. *British Journal of Surgery*, 1995; 82 (4): 524-529.
15. **ZELLWEGER R, et al.** Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Critical Care Medicine*, 1997; 25 (1): 106-110.
16. **CHRISTEFF N, et al.** Effect of estradiol on endotoxin-induced changes in steroid hormone levels and lethality in male rats. *Circulatory Shock*, 1994; 44 (3): 154-159.
17. **KAY AB.** Studies on eosinophil leucocyte migration eosinophil and neutrophil accumulation following antigen-antibody reactions in guinea-pig skin. *Clinical and Experimental Immunology*, 1970; 6 (1): 75.
18. **BISCHOFF SC.** Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Seminars in Immunopathology*, 2009; 31 (2):185-205.
19. **GULSHAN S, MCCRUDEN AB, STIMSON WH.** Estrogen receptors in macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1990; 31 (6): 691-697.

20. **ZHAO XJ, et al.** Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax*, 2001; 56 (3): 205-211.
21. **JIANG YA, et al.** Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression and of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 2002; 8 (6): 1005-1008.
22. **SPINEDI E, et al.** Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Endocrinology*, 1992; 131 (5): 2430-2436.
23. **SAIA RS, ANSELMO-FRANCI JA, CARNIO EC.** Hypothermia during endotoxemic shock in female mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Shock*, 2008; 29 (1):119-126.
24. **SAIA RS, GARCIA FM, CARNIO EC.** Estradiol protects female rats against sepsis induced by *Enterococcus faecalis* improving leukocyte bactericidal activity. *Steroids*, 2015; 102: 17-26.
25. **TURNER JR.** Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2009; 9 (11): 799-809.
26. **TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M.** Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001; 2 (4): 285-293.
27. **Adams CL, et al.** Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol*, 1998; 142: 1105–1119.
28. **Vasioukhin V, et al.** Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 2000; 100: 209–219.
29. **Yonemura S, et al.** Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, ICAM-2. *J Cell Biol*, 1998; 140: 885–895.
30. **Santos J, et al.** Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*, 2001; 48: 630-636.
31. **Bischoff SC, et al.** Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut*, 1999 (44): 643-652.

32. **He S, Peng Q, Walls AF.** Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol*, 1997; 159: 6216-6225.
33. **He S, Walls AF.** Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br J Pharmacol*, 1998; 125: 1491-1500.
34. **Bruewer M, et al.** Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 2003; 171 (11): 6164-6172.
35. **Boivin MA, et al.** Mechanism of interferon-gamma-induced increase in T84 intestinal epithelial tight junction. *J Interferon Cytokine Res: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 2009; 29 (1): 45-54.
36. **Al-Sadi R, et al.** Mechanism of IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*, 2008; 180 (8): 5653-5661.
37. **Ye D, Ma I, Ma TY.** Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol*, 2006; 29 (3): 496-504.
38. **Ma TY, et al.** TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am J Physiol Gastroint liver Physiol*, 2004, 286 (3): 367-376.
39. **Wada-Hiraike O, et al.** Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103(48):18350-18355.
40. **Kawano N, et al.** Identification and localization of estrogen receptor α - and β -positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels. *Histochem Cell Biol*, 2004; 121:399–405.
41. **Braniste V, et al.** Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol*, 2009; 587:3317–3328.
42. **Saia RS, et al.** Estradiol and thermoregulation in adult endotoxemic rats exposed to lipopolysaccharide in neonatal life. *Acta Physiolog*, 2011, 203(4):429-439.

43. **Barone, FC et al.** Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke*, 1992; 23(9): 1337-1347.
44. **Bradley, PP et al.** Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 1982; 78(3): 206-209.
45. **Genaro G, et al.** Plasma hormones in neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. *Res. Vet Sci*, 2007; 82: 263-270.
46. **Lobo SM, et al.** Gut mucosal damage during endotoxic shock is due to mechanisms other than gut ischemia. *J Appl Physiol*, 2003; 95(5): p. 2047-54.
47. **Costantini TW, et al.** Vagal nerve stimulation protects against burn - induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol*, 2010; 299(6):1308-18.
48. **NOGUEIRA LT, et al.** The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. *Journal of Neuroinflammation*, 2017, 14: 13.
49. **Ribeiro AB, et al.** Dexamethasone Prevents Lipopolysaccharide-Induced Epithelial Barrier Dysfunction in Rat Ileum. *Shock*, 2017.
50. **Li Q, et al.** Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis in vivo. *J Pathol*, 2009; 218(2):210–221.
51. **Yue C, et al.** Lipopolysaccharide-induced bacterial translocation is intestine site-specific and associates with intestinal mucosal inflammation. *Inflammation*, 2012; 35(6): 1880–1888.
52. **MARQUES DA, et al.** Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. *Journal of Applied Physiology*, 2015;119 (1): 61-68.
53. **Costantini TW, et al.** Vagal nerve stimulation protects against burn - induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol*, 2010; 299(6): 1308-18.
54. **Kreymann JF, et al.** ESPEN guidelines on enteral nutrition: intensive care. *Clin Nutr.*, 2006; 25: 210-223.
55. **Ye L, et al.** Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cellular Physiol*, 2003; 196(2): 362-369.

56. **Gorodeski GI.** Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. *Endocrinology*, 2007; 148 (1): 218-231.
57. **Homma H, et al.** The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005; 288: 466–472.
58. **Vegeto E, et al.** Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci.*, 2001; 21: 1809–1818.
59. **Huang SY, et al.** Estrogen receptor beta agonist diarylpropionitrile inhibits lipopolysaccharide-induced regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) production in macrophages by repressing nuclear factor kappaB activation. *Fertil Steril.*, 2013; 100: 234–240.
60. **Subramanian M, Shaha C.** Oestrogen modulates human macrophage apoptosis via differential signalling through oestrogen receptor-alpha and beta. *J Cell Mol Med.*, 2009; 13: 2317–2329.
61. **Sharawy N, et al.** Estradiol receptors agonists induced effects in rat intestinal microcirculation during sepsis. *Microvasc Res.*, 2013; 85: 118–127.
62. **Rivest.** Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Progr Brain Res.*, 2010; 181: 43-53.
63. **Frank MG, et al.** Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain, Behav Immunity*, 2010; 24: 19–30.
64. **Liao J, et al.** Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol*, 1995; 268: 699–706.
65. **Zhang TY, Daynes RA.** Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *J Immunol.*, 2007; 178: 2517–2526.
66. **Boivin MA, et al.** Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2007; 292(2): 590-598.
67. **van der Poll T, et al.** Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*, 1995; 155 (11): 5397-5401.

68. **Wang Q, et al.** Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol: Regul, Integr Comp Physiol*, 2001; 281 (3): 1013-1023.
69. **Prabhakar U, et al.** Correlation of protein and gene expression profiles of inflammatory proteins after endotoxin challenge in human subjects. *DNA Cell Biol.*, 2005; 24: 410–431.
70. **Han X, et al.** Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock*, 2004; 21: 261-270.
71. **O'Dwyer ST, et al.** A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. *Arch Surg*, 1988; 123: 1459-1464.
72. **Moriez R, et al.** Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol*, 2005; 167: 1071-1079.
73. **Cenac N, et al.** Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol*, 2002;161: 1903–1915.
74. **Brown JF, et al.** Role of mast cells, neutrophils and nitric oxide in endotoxin-induced damage to the neonatal rat colon. *Br J Pharmacol*, 1998; 123: 31-38.
75. **Van Itallie CM, Anderson JM.** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 2006; 68: 403–429.
76. **Li N, et al.** Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004; 287: 726–733.
77. **Amasheh S, et al.** Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 45–50.
78. **Suzuki T, Hara H.** Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin4 in Caco-2 cells. *J Nutr.* 2009; 139: 965–974.

Figure Legend

Figure 1. ER α and ER β are expressed in the intestinal mucosa and estradiol prevents intestinal permeability and bacterial translocation induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pre-treated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration, the intestinal permeability test was assessed by injecting FD-4 in gut (E, F ileum and colon, respectively), or the mesenteric lymph nodes were collected for microbiological analysis and results were expressed as the number of CFU per g of tissue (G). The plasma concentrations of estradiol (A) were quantified by radioimmunoassay as positive control for hormonal replacement. The ileal (C) and colonic (D) mucosa were collected, the total protein content was extracted and the expression of ER α and ER β proteins was determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were showed for ER α and ER β (B) in the mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. Plasma FD-4 concentrations were quantified by spectrofluorometry. * $P < 0.05$ compared to OVX + SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX + LPS. Data shown as mean $\pm$ SEM. $n = 5-10$ animals per group. The uterus and heart homogenates were included as a positive control.

Figure 2. Estradiol attenuates the histological damages induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pre-treated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). Sections of ileum and colon (6 μ m) were stained with Hematoxylin and Eosin. The photomicrographs (A) and the representatives histological injury scores were divided into the following groups: (B) ileum and (C) colon. * $P < 0.05$ compared to the SAL group and # $P < 0.05$ compared to LPS group OVX. Median and Kruskal–Wallis test followed by the Dunn post-test. Magnification, 20X and scale bar= 100 μ m. $n = 5-10$ animals per group.

Figure 3. Estradiol prevents epithelial barrier dysfunction induced by endotoxemia, increasing the expression of TJ and JA in ileum. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pre-treated with estradiol cypionate (50 or 100 µg/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). The ileal mucosa were collected, the total protein content was extracted and the expression of claudin-1 (B), occludin (C), JAM-A (D) and E-cadherin (E) was determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were showed for TJ and JA in mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. * $P < 0.05$ compared to the OVX+SAL group, $\Phi P < 0.05$ compared to OVX+100 µg/Kg SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX+LPS group OVX. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $n = 4-7$ animals per group.

Figure 4. Estradiol prevents epithelial barrier dysfunction induced by endotoxemia, increasing the expression of TJ and JA in colon. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pre-treated with estradiol cypionate (50 or 100 µg/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). The colonic mucosa were collected, the total protein content was extracted and the expression of claudin-1 (B), occludin (C), JAM-A (D) and E-cadherin (E) was determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were showed for TJ and JA in mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. * $P < 0.05$ compared to the OVX+SAL group, $\Phi P < 0.05$ compared to OVX+100 µg/Kg SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX+LPS group OVX. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $n = 4-7$ animals per group.

Figure 5. Estradiol prevents disruption of the tight junction structures induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 µg/kg, s.c.) or corn oil. At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration intestinal segments

were collected and fixed. Sections of ileum and colon were fixed for indirect immunofluorescence analysis of claudin-1, occludin, JAM-A, and E-cadherin (all in red) as well the cell nuclei (blue). Representative photomicrographs of the experimental treatments from each section are shown (X40 magnification). Scale bar= 50 μ m. n = 3-4 animals per group. JAM indicates junctional adhesion molecule; LPS, lipopolysaccharide.

Figure 6. Estradiol attenuates epithelial tight junctional opening induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, s.c.) or corn oil. At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration intestinal segments were collected and fixed. Representative transmission electromicrographs showing TJ and JA region close to microvillus of enterocytes (A) in ileum and colon. The evident disruption of TJ (arrow) may be found in endotoxemic rats and the distance of the TJ was measured in relation to the control group in ileum (B) and colon (C). Scale bar= 0.1mm. n = 4-7 animals per group. LPS indicates lipopolysaccharide.

Figure 7. Estradiol decreases mast cell degranulation induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, s.c.) or corn oil. At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration intestinal segments were collected and fixed. Sections of ileum and colon (6 μ m) were stained with toluidine blue solution. The photomicrographs (A) and the mast cell granulation (B, ileum; D, colon) degranulation (C, ileum; E, colon). * P <0.05 compared to OVX + SAL and # P <0.05 compared to OVX + LPS. Data shown as mean $\pm$ SEM. N = 5-10 animals per group.

Figure 8. Estradiol decreases the expression of proteases induced by endotoxemia. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, s.c.) or corn oil. One group

of rats received the mast cell stabilizer doxantrazole or its vehicle, via i.p. injection 1 day (7:00 PM) and 30 min (7:00 AM in the next day) before LPS administration. At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration the ileal and colonic mucosas were collected, the total protein content was extracted and the expression of chymase (B, D, ileum and colon, respectively) and tryptase (C, E, ileum and colon, respectively). In female rats pretreated with doxantrazole the intestinal permeability test was assessed by injecting FD-4 in gut (F, G, ileum and colon, respectively). Chymase and tryptase proteins was determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were showed for chymase and tryptase (A) in the mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. Plasma FD-4 concentrations were quantified by spectrofluorometry. * $P < 0.05$ compared to OVX + SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX + LPS. Data shown as mean $\pm$ SEM. $n = 5-10$ animals per group.

Figure 9. Estradiol modulates NF- κ B, I κ B and active caspase-3 expression in ileal mucosa. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration the ileal mucosa was collected, the total protein content was extracted and the expression of NF- κ B (B), I κ B (C), procaspase-3 (D) and active caspase-3 (E). These proteins was determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were showed for NF- κ B, I κ B, procaspase-3 and active caspase-3 (A) in the mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. * $P < 0.05$ compared to OVX + SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX + LPS. Data shown as mean $\pm$ SEM. $n = 4-7$ animals per group.

Figure 10. Estradiol modulates NF- κ B, I κ B and active caspase-3 expression in colonic mucosa. The female rats were ovariectomized and allowed to recover for 10-12 days before the experiment. For three consecutive days, rats were pretreated with estradiol cypionate (50 or 100 μ g/kg, subcutaneous) or corn oil (vehicle). At 6h after LPS (1.5 mg/kg, intravenous) or saline administration the

colonic mucosa was collected, the total protein content was extracted and the expression of NF- κ B (B), I κ B (C), procaspase-3 (D) and active caspase-3 (E). These proteins were determined by western blot technique. Representative immunoblots and the densitometry values (expressed as percentage of the control group) were shown for NF- κ B, I κ B, procaspase-3 and active caspase-3 (A) in the mucosa lysates. The β -actin levels were used as an internal control. * $P < 0.05$ compared to OVX + SAL and # $P < 0.05$ compared to OVX + LPS. Data shown as mean $\pm$ SEM. $n = 4-7$ animals per group.

Figure 1.

Table 1.

Plasma estradiol, IL-10, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-1 β (pg/mg total protein) and corticosterone (cortico: ng/mL) concentrations of ovariectomized rat treated with oil (OVX), estradiol (50 μ g/kg or 100 μ g/kg) plus LPS or salina.

Group	OVXSAL	OVE+50 μ g/kgSAL	OVE+100 μ g/kgSAL	OVXLPS	OVE+50 μ g/kgLPS	OVE+100 μ g/kgLPS
IL-10	2.5 $\pm$ 1.6	9.5 $\pm$ 5.1	3.4 $\pm$ 9.7	678 $\pm$ 70.1*	1107 $\pm$ 119.2*#	1046 $\pm$ 82.6*#
TNFα	0.4 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 1.5	89.1 $\pm$ 14.6*	97.4 $\pm$ 17.7*	72.6 $\pm$ 13.2*
IL-6	N.D.	N.D.	N.D.	4481 $\pm$ 933*	3578 $\pm$ 893*	3042 $\pm$ 913*
IFNγ	29.4 $\pm$ 20	50 $\pm$ 25.6	9.8 $\pm$ 6	6563 $\pm$ 330*	6231 $\pm$ 436.7*	4783 $\pm$ 910*
IL-1β	1.2 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	170 $\pm$ 17.5*	117 $\pm$ 17.1*	102.7 $\pm$ 17*#
Cortico	81.5 $\pm$ 16	116 $\pm$ 26	117 $\pm$ 17.8	219.1 $\pm$ 11*	248.3 $\pm$ 24.6*	331.6 $\pm$ 59*#

* P <0.05 compared to the OVX + SAL group and # P <0.05 compared to OVX + LPS group.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. n = 5-10 animals per group.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Table 2.

Ileal mucosa contents of IL-10, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-1 β (pg/mg total protein) and MPO (OD/ mg total protein) concentrations of ovariectomized rat treated with oil (OVX), estradiol (50 μ g/kg or 100 μ g/kg) plus LPS or salina.

Group	OVXSAL	OVE+50 μ g/kgSAL	OVE+100 μ g/kgSAL	OVXLPS	OVE+50 μ g/kgLPS	OVE+100 μ g/kgLPS
IL-10	24.3 $\pm$ 5	32.3 $\pm$ 12	25.3 $\pm$ 2	75.5 $\pm$ 21	57.5 $\pm$ 11	57.6 $\pm$ 14
TNFα	13.2 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2.7	10.4 $\pm$ 3.2	34.3 $\pm$ 6.8*	16.3 $\pm$ 1.5 [#]	13.5 $\pm$ 1.2 [#]
IL-6	153 $\pm$ 32	245 $\pm$ 42	220.6 $\pm$ 46	369 $\pm$ 57.5*	290 $\pm$ 24.9	282.7 $\pm$ 18.9
IFNγ	100 $\pm$ 22	140 $\pm$ 29	94.6 $\pm$ 12	314 $\pm$ 36.2*	195.5 $\pm$ 26.3 [#]	200.3 $\pm$ 14.8 [#]
IL-1β	10 $\pm$ 2.8	7.6 $\pm$ 2.5	7.6 $\pm$ 4.4	29.8 $\pm$ 3.1*	19.7 $\pm$ 1.3	16.9 $\pm$ 2.3 [#]
MPO	0.1 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.1*	0.1 $\pm$ 0.02 [#]	0.2 $\pm$ 0.05 [#]

* P <0.05 compared to the OVX + SAL group and # P <0.05 compared to OVX + LPS group.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *n* = 5-10 animals per group.

Table 3.

Colonic mucosa contents of IL-10, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-1 β (pg/mg total protein) and MPO (OD/mg total protein) concentrations of ovariectomized rat treated with oil (OVX), estradiol (50 μ g/kg or 100 μ g/kg) plus LPS or salina.

Group	OVXSAL	OVE+50 μ g/kgSAL	OVE+100 μ g/kgSAL	OVXLPS	OVE+50 μ g/kgLPS	OVE+100 μ g/kgLPS
IL-10	84 $\pm$ 31	105 $\pm$ 37	170 $\pm$ 20	285 $\pm$ 55.9	253.1 $\pm$ 33.7	272.8 $\pm$ 40.9
TNFα	58 $\pm$ 20	53 $\pm$ 20	83.2 $\pm$ 13	258.2 $\pm$ 61*	113 $\pm$ 16.9	87.1 $\pm$ 36 [#]
IL-6	21.3 $\pm$ 9	38 $\pm$ 12.6	43.6 $\pm$ 6.4	113 $\pm$ 35.6*	30.3 $\pm$ 7.5 [#]	27.5 $\pm$ 8.3 [#]
IFNγ	171 $\pm$ 62	304 $\pm$ 78	329 $\pm$ 20.5	764.7 $\pm$ 245*	330.4 $\pm$ 68 [#]	167.6 $\pm$ 82.6 [#]
IL-1β	14 $\pm$ 6.1	17 $\pm$ 7.4	22 $\pm$ 3.1	110 $\pm$ 31.4*	40 $\pm$ 9.7 [#]	35.5 $\pm$ 11.9 [#]
MPO	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.2*	0.35 $\pm$ 0.07 [#]	0.3 $\pm$ 0.03 [#]

* P <0.05 compared to the OVX + SAL group and # P <0.05 compared to OVX + LPS group.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *n* = 5-10 animals per group.

Figure 7.

Figure. 8

Figure 9.

Figure. 10