JOÃO ANTONIO GIMENES JÚNIOR

**PAPEL DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS
NA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA E NA
REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS APÓS
INSTILAÇÃO NASAL DE LPS
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

JOÃO ANTONIO GIMENES JÚNIOR

**PAPEL DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS
NA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA E NA
REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS APÓS
INSTILAÇÃO NASAL DE LPS
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gimenes Júnior, João Antonio.

Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos / João Antonio Gimenes Júnior. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Fisiopatologia da inflamação experimental.

Versão do título para o inglês: Role of female sex hormones in acute lung inflammation and airway reactivity after nasal instillation of LPS in mice.

1. Hormônios sexuais femininos 2. Lipopolissacarídeo 3. Inflamação pulmonar aguda 4. Reatividade das vias aéreas 5. Mecânica pulmonar I. Lima, Prof. Dr. Wothan Tavares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0196/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Antonio Gimenes Júnior.

Título da Tese: Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos.

Orientador(a): Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **113** nas fls. **75** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Wothan Tavares de Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos** do qual participou(aram) o(s) alunos **João Antonio Gimenes Junior e os pesquisadores Ricardo Martins de Oliveira Filho, Ana Paula Ligeiro de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **08.10.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 08 de outubro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 049.13

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 0113/2009.

"Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos "

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 08.10.2015**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador
CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

**Para João, Maria, Roseli e Marcelo.
Que nunca pouparam esforços para
me oportunizar escolhas.
Com amor e eterna gratidão, dedico.**

AGRADECIMENTOS

A vida, pela qual tenho me dedicado a estudar.

Ao Prof. Wothan, pela orientação, amizade e apoio. Me foram valiosos esses anos de convivência com você. Agradeço por ter guiado meus primeiros passos pelos caminhos da inflamação e ser uma inspiração que ilumina este caminho.

Ao Prof. Ricardo, sobretudo pelo carinho. As manhãs de experimento foram fantásticas ao seu lado. Obrigado pela oportunidade do estágio PAE e por ter me socorrido em todas as correções dos abstracts. Você é brilhante.

A Helô e a Zilma, pela companhia diária e amizade. Obrigado pelos cafezinhos que deixavam as tardes mais alegres.

Ao Prof. Henrique, por toda orientação nos experimentos de mecânica pulmonar. Pelo empenho, confiança e amizade. Trabalhar com você foi um prazer. Os resultados nas próximas páginas mostram que o nosso investimento valeu a pena.

A Luana, co-autora desta tese. Agradeço a vida pelo presente do reencontro e convivência com você nesses anos. Pelas imensuráveis e impagáveis ajudas. Também a Cida e a Lê, pela sempre calorosa acolhida. Obrigado por tudo.

A Biazinha, que participou comigo de todos os experimentos e esteve sempre disposta a me ajudar. Agradeço pela amizade e pela certeza de uma grande torcida.

A Adriana, que tanto contribuiu para esta tese. Agradeço sua ajuda e orientação, e muito obrigado por dividir de maneira tão generosa os seus conhecimentos.

A Ana Paula, pioneira junto com o Wothan da linha dos hormônios sexuais no laboratório. Muito obrigado pela amizade e apoio. Ao Jean, que está sempre disposto a dar uma força e que foi muito importante como membro da banca de ingresso no doutorado.

Ao Thiago, que além de colaborador da tese foi um dos melhores amigos que a vida me deu. Estaremos sempre juntos, valeu!

A Carol, pela amizade e torcida. Obrigado pela ajuda na análise histológica e peço desculpas pelo desaparecimento, mas foi por uma boa causa.

Ao Prof. João Palermo e todo o grupo de neuroimunomodulação. Pela acolhida e pela oportunidade de aprender mais com vocês.

A Isabeli, que dividiu comigo essa inquieta fase de final de tese. Valeu por ter sido companheira.

A Prof. Luciana, pela contribuição desde o exame de ingresso no doutorado até qualificação. Suas sugestões e análises nos permitiram trilhar por melhores caminhos.

A Prof. Iolanda e Ana Carolina, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Joilson, pela amizade e torcida. Você me serve como exemplo.

Ao Fabio Aoki, que se disponibilizou para me ajudar nos experimentos de mecânica pulmonar. Ainda a Caroline, que muito nos ajudou com o aperfeiçoamento do protocolo experimental.

Ao pessoal do laboratório agradeço pela convivência e ajuda. A Evelyn que me socorreu nos momentos de desespero quando eu precisava urgente de animais.

A Mônica e a Camila, pelo bom humor que sempre me atenderam. A Livia, pela amizade e ajuda, e também companheira da correria de final de tese.

Ao João, Maria, Roseli e Marcelo. Pela entrega generosa de apoio, educação e luz, que permearam minha história e tornaram a vida mais forte, leve e doce. Pelo amor que as palavras não descrevem, mas tocam os nossos corações.

A Dani, que entrou para nossa família e tivemos a oportunidade de sair ganhando. Que o meu sobrinho venha com muita saúde.

Aos bons amigos, de São Paulo e de tantos outros lugares. Saibam que me foram muito importantes nesse processo. Desejo saúde! Que a vida nos reserve muitos brindes.

A sensação que fica é a de missão cumprida. E o desejo que bons ventos tragam outras fases da vida como essa que me foi reservada, em que fui muito feliz. Que venham as novas experiências!

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos 2009/52782-7 e 2009/51886-3 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Edital MCT/CNPq 14/2009 - Universal, Processo 477289/2009-6.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes. Ter problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.”

Henfil

RESUMO

GIMENES-JÚNIOR, J. A. **Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após instilação nasal de LPS em camundongos.** 2013. 161 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Lesão pulmonar aguda é caracterizada por infiltrado de células polimorfonucleares, lesão alveolar difusa, hipoxemia, alteração da reatividade das vias aéreas e edema pulmonar. Evidências clínicas e experimentais sugerem que os hormônios sexuais femininos (HSF) modulam processos inflamatórios. Nesse contexto, investigamos o papel dos HSF na inflamação pulmonar e na reatividade das vias aéreas após exposição de animais ao LPS. Camundongos fêmeas, C57BL/6, adultos, foram submetidos a cirurgia para ovariectomia (OVx) ou cirurgia sem remoção dos ovários (Sham). Decorridos 7 dias, foram submetidos a instilação nasal de LPS (100 µg/ml, 1 µg/g) ou salina (0,9%, 1 µl/g) e após 4 ou 24 h foram avaliados. Em paralelo, camundongos OVx receberam 17β-estradiol (280 µg/kg, s.c.) ou progesterona (200 µg/kg, s.c.) 12 h antes do LPS. Ainda, para o estudo da reatividade das vias aéreas, 1 h antes do LPS animais OVx receberam L-NAME (30 mg/kg, i.p.) ou aminoguanidina (50 mg/kg, i.p.). Foram avaliados o recrutamento celular para o pulmão, pela análise das células no lavado broncoalveolar (LBA), sangue e medula óssea; a presença de neutrófilos no tecido pela atividade da enzima mieloperoxidase; a permeabilidade microvascular pela quantificação do corante azul de Evans extravasado do parênquima; a arquitetura pulmonar pela análise histológica; a quantificação de mediadores da inflamação no sobrenadante de cultura de pulmão e a expressão gênica de TLR4 e NF-κB no pulmão por PCR em tempo real. A reatividade de segmentos de traquéia à metacolina foram realizados *in vitro* e a resistência e elastância pulmonar avaliadas no flexiVent, um ventilador mecânico para animais. Os resultados após 24 h do LPS mostraram aumento de neutrófilos no LBA e no tecido pulmonar, com maiores graus de lesão pulmonar dos animais OVx em relação aos Sham. Observamos aumento de IL-1β, de óxido nítrico (NO) e redução de IL-10 no pulmão. O tratamento com 17β-estradiol ou progesterona reduziu o número de neutrófilos, de IL-1β e NO no pulmão. A OVx não promoveu alteração na permeabilidade microvascular pulmonar e na expressão gênica de TLR4 e NF-κB. Os dados revelaram redução da reatividade da traquéia e redução da resistência e elastância pulmonar. O tratamento com 17β-estradiol ou progesterona foram efetivos em promover aumento tanto da reatividade traqueal como da resistência e elastância pulmonar. Ainda, o L-NAME ou aminoguanidina aumentaram a reatividade traqueal. Os dados não mostraram alteração nos parâmetros inflamatórios e de reatividade das vias aéreas entre animais OVx e Sham após 4 h da instilação nasal de LPS. Os resultados permitem sugerir que 24 h após a exposição ao LPS a inflamação pulmonar e a reatividade das vias aéreas possam ser modificadas pelo ambiente hormonal. A redução dos HSF promovida pela OVx modulam de forma diferente os eventos celulares e de contração do músculo liso, contribuindo para aumento do número de neutrófilos no pulmão e para redução da reatividade das vias aéreas, que podem ser explicados, ao menos em parte, pela elevação de IL-1β e NO no pulmão. À luz do exposto, pode-se concluir neste estudo que os HSF exercem papel anti-inflamatório, conferindo proteção ao organismo.

Palavras-chave: Hormônios sexuais femininos. Lipopolissacarídeo. Inflamação pulmonar aguda. Reatividade das vias aéreas. Mecânica pulmonar.

ABSTRACT

GIMENES-JÚNIOR, J. A. **Role of female sex hormones in acute lung inflammation and airway reactivity after nasal instillation of LPS in mice.** 2013. 161 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Acute lung injury is characterized by lung polymorphonuclear cells infiltration, diffuse alveolar damage, hypoxemia, changes in airway reactivity and edema. Clinical and experimental evidences suggest that the female sex hormones (FSH) modulate the inflammation. In this context, we investigate the role of FSH in lung inflammation and airway reactivity after LPS exposure. Adult, female C57BL/6 mice were subjected to ovaries removal (OVx) or not (Sham). After 7 days were nasally instilled with LPS (100 µg/ml, 1 µg/g) or saline (0,9%, 1 µl/g) and 4 or 24 h later the experiments were carried. In parallel, OVx animals received 17β-estradiol (280 µg/kg, s.c.) or progesterone (200 µg/kg, s.c.) 12 h before the LPS. Furthermore, to study the airways reactivity, OVx animals received, 1 h before LPS, L-NAME (30 mg/kg, i.p.) or aminoguanidine (50 mg/kg, i.p.). We evaluated the cellular recruitment in bronchoalveolar lavage fluid (BAL), blood and bone marrow; the presence of neutrophils in tissue by the activity of myeloperoxidase enzyme; the pulmonary microvascular permeability by quantification of the Evans blue dye extravasation; the pulmonary architecture by histological analysis; the quantification of inflammatory mediators in lung culture medium and the gene expression of TLR4 and NF-κB in lung by real-time PCR. The reactivity of tracheal segments to methacholine were done *in vitro* and the pulmonary resistance and elastance evaluated using the flexiVent, a mechanic ventilator for animals. The results, 24 h after the LPS, show increase of neutrophils in BAL and in the lung parenchyma and higher lung injury score in OVx animals than in Sham. In OVx group, we also observed increase of IL-1β and nitric oxide (NO) and reduction of IL-10 in lung explant. The treatment of OVx with 17β-estradiol or progesterone before LPS reversed these effects. The OVx did not change the microvascular permeability neither the TLR4 e NF-κB gene expression. We also noted reduced tracheal reactivity and lung resistance and elastance in OVx animals. In this case, the treatment with 17β-estradiol or progesterone increased these parameters. Furthermore, the L-NAME or the aminoguanidine increased the tracheal reactivity. The data show that 4 h after LPS, the OVx does not promote inflammation and airway reactivity. Our results suggest that 24 h after the LPS exposure, the lung inflammation and the airway reactivity could be modify by the hormones. The reduction of the FSH by OVx modulates differentially the cellular events and the smooth muscle contraction, contributing to increase in lung neutrophils and reduction in the airway reactivity, which can be explained, at least in part, by the high levels of IL-1β and NO in lung. Considering the above, we can conclude that FSH have anti-inflammatory effects, protecting the organism.

Keywords: Female sex hormones. Lipopolysaccharide. Acute lung inflammation. Airway reactivity. Lung mechanics.

LISTA FIGURAS

Figura 1 - (A) representa os principais componentes de uma bactéria Gram-negativa; (B) mostra os principais constituintes do LPS	28
Figura 2 - Cascata de sinalização pela ativação do TLR4 por patógeno (e.g. LPS)	30
Figura 3 - Indução da inflamação pulmonar aguda promovida pelo LPS	42
Figura 4 - Estrutura molecular dos hormônios esteróides: (A) estradiol e (B) progesterona..	46
Figura 5 - Delineamento experimental proposto para o estudo.....	55
Figura 6 - Delineamento experimental proposto para o tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona.....	55
Figura 7 - Delineamento experimental utilizado para o tratamento farmacológico com L-NAME ou aminoguanidina.....	56
Figura 8 - Desenho esquemático da anatomia macroscópica de um pulmão de camundongo. As setas indicam as regiões pulmonares utilizadas nos experimentos	61
Figura 9 - Fotografias do aparelho utilizado para avaliação da reatividade da traquéia	68
Figura 10 - Fotografias do flexiVent com nebulizador para protocolo de MCh via inalatória	70
Figura 11 - Fotografias do flexiVent para protocolo de MCh via i.v. e aquisição de dados...	71
Figura 12 - Determinação da massa uterina (A) e dos níveis séricos de 17 β -estradiol (B) e progesterona (C) após a remoção dos ovários	74
Figura 13 - Fotomicrografias das fases do ciclo estral de um camundongo fêmeas com ovários intactos (A-D) e de um animal 7 dias após a OVx (E)	75
Figura 14 - Efeito da OVx sobre o número de células recuperadas no LBA 4 (A-C) e 24 (D-F) h após a instilação nasal de LPS	77
Figura 15 - Efeito da OVx sobre o número de células no compartimento sanguíneo 4 (A-C) e 24 (D-F) h após a instilação nasal de LPS	79
Figura 16 - Efeito da OVx sobre o número de células totais encontradas na medula óssea 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS	80
Figura 17 - Efeito da OVx sobre a permeabilidade microvascular pulmonar avaliada pelo extravasamento do corante AE 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS	81
Figura 18 - Efeito da OVx sobre a atividade da enzima MPO em homogenatos de pulmão 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS	82
Figura 19 - Efeito da OVx sobre o dano pulmonar avaliado em secções histológicas 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS.....	83
Figura 20 - Imagens representativas do efeito da OVx sobre a arquitetura pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS	84

Figura 21 - Efeito da OVx sobre a reatividade de anéis de traquéia 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS	85
Figura 22 - Efeito da OVx sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via inalatória) 4 (A e B) e 24 (C e D) h após a instilação nasal de LPS.....	86
Figura 23 - Efeito da OVx sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS	88
Figura 24 - Efeito da OVx sobre o quantificação de mediadores da inflamação em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS	90
Figura 25 - Efeito da OVx sobre o quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS	91
Figura 26 - Efeito da OVx sobre a expressão gênica de TLR4 e NF- κ B1 no tecido pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS	92
Figura 27 - Determinação da massa uterina (A) e dos níveis séricos de 17 β -estradiol (B) e progesterona (C) após tratamento farmacológico.....	94
Figura 28 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o número de células recuperadas no LBA 24 h após a instilação nasal de LPS.....	96
Figura 29 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o número de células no compartimento sanguíneo 24 h após a instilação nasal de LPS	97
Figura 30 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o número de células totais encontradas na medula óssea 24 h após a instilação nasal de LPS.....	98
Figura 31 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre a atividade da enzima MPO em homogenatos de pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS.....	99
Figura 32 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o dano pulmonar avaliado em secções histológicas 24 h após a instilação nasal de LPS	100
Figura 33 - Imagens representativas do efeito do tratamento com 17 β -estradiol (C) ou progesterona (D) sobre sobre a arquitetura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS ...	101
Figura 34 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre a quantificação de IL-1 β e IL-10 em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS....	102
Figura 35 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre a quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS	103
Figura 36 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona (A) e L-NAME ou aminoguanidina (B) sobre a reatividade de anéis de traquéia 24 h após a instilação nasal de LPS	104
Figura 37 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS	106
Figura 38 - Efeito do tratamento com L-NAME sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE - Azul de Evans

AECC - Conferência Americana e Européia de Consenso em SDRA

AP-1 - *activator protein-1*

arctan - arco tangente

ATS - *American Toracic Society*

BCRs - receptores de células B

BHR - hiperreatividade brônquica

Ca²⁺ - cálcio

CaM - calmodulina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CINC-1 - quimioatraente-1 de neutrófilos

CO₂ - gás carbônico

COD - coeficiente de determinação

CRF - capacidade residual funcional

CSIF - *cytokine-synthesis inhibitory factor*

DAG - diacilglicerol

DCs - células dendríticas

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA - ácido desoxirribonucleico

E.P.M. - erro padrão da média

E1 - estriol

E2 - estradiol

E3 - estrona

EDRF - fator de relaxamento derivado do endotélio

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*

EMSA - *electrophoretic mobility shift assay*

e-NANC - não-adrenérgico não-colinérgico excitatório

e-NOS - óxido nítrico-sintase endotelial

E_{RS} - elastância pulmonar

ER α - receptor de estrógeno alfa

ER β - receptor de estrógeno beta

FC - frequência cardíaca
FiO₂ - fração inspirada de oxigênio
FR - frequência respiratória
G - caracteriza a dissipação de energia no tecido pulmonar
H - caracteriza a energia acumulada no tecido pulmonar
h - hora
HSF - hormônios sexuais femininos
HTAB - *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*
i.m. - via intramuscular
i.n. - via nasal
i.p. - via intraperitoneal
i.v. - via intravenosa
I/R-i - isquemia e reperfusão intestinal
I_{aw} - inertância das vias aéreas
IFNs - *interferons*
IKK - *I-κB kinase complex*
IKKε - *IκB kinase-ε*
IL-1R - receptor de interleucina 1
IL-1β - interleucina-1beta
IL - interleucina
i-NANC - não-adrenérgico não-colinérgico inibitório
i-NOS - óxido nítrico-sintase induzida
IP₃ – trifosfato de inositol
IRAK - *IL1-receptor-associated-kinase*
IRF3 - *IFN regulatory factor-3*
IκB - *inhibitor of κB*
JNK - *c-Jun N-terminal Kinase*
KC - quimiocina derivada de queratinócitos
KHS - *Krebs-Henseleit solution*
LBA - lavado broncoalveolar
LBP - *lipopolysaccharide binding protein*
L-NAA - N⁰-amino-L-arginina
L-NAME - N⁰-nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIO - N-imino-etil-L-ornitina

L-NMMA - N^o-monometil-L-arginina
L-NOARG - N^o-nitro-L-arginina
LPA - lesão pulmonar aguda
LPS - lipopolissacarídeo
LV - lavado vaginal
M1 - receptor muscarínico 1
M3 - receptor muscarínico 3
Mal - *MyD88-adaptor-like*
MAPK - *mitogen-activated protein kinase*
MCh - metacolina
MCP-1 - proteína quimioatraente para monócitos-1
MD-2 - *myeloid differentiation protein-2*
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
min - minuto
MIP-2 - proteína inflamatória de macrófago-2
MLC - myosin light chain
MLCK - quinase de cadeia leve da miosina
MPO - enzima mieloperoxidase
MyD88 - *myeloid differentiation factor 88*
NANC - não-adrenérgico não-colinérgico
NEMO - *NF-κB essential modifier*
NF-κB - fator nuclear kappa B
NK - células natural killer
NLRs - *nod-like receptors* (NLRs)
NLS - *nuclear localization sequence*
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico-sintase
O₂ - oxigênio
°C - graus Celsius
OVx - remoção bilateral dos ovários (ovariectomia)
P₀ - constante de correção de erros
P4 - progesterona
PaCO₂ - pressão arterial de gás carbônico
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PaO₂ - pressão arterial de oxigênio

PBS - *phosphate buffered saline*

PCR-RT - *Reverse transcription polymerase chain reaction*

PEEP - pressão positiva no final da expiração

PIP₂ - fosfatidilinositol

PLC - fosfolipase C

PR-A - receptor A de progesterona

PR-B - receptor B de progesterona

RHD - *Rel homology domain*

RIP1 - *receptor-interacting protein 1*

RLRs - *retinoic acid-inducible-gene-1 (RIG-I)-like receptors*

R_N - resistência das vias aéreas

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

RRRs - *pattern-recognition receptors*

R_{RS} - resistência do sistema respiratório

s - segundo

s.c. - via subcutânea

SDRA - síndrome do desconforto respiratório agudo

Sham - falsa operação (não OVx)

TAB2 - *TAK1 binding protein 2*

TAB3 - *TAK1 binding protein 3*

TAK1 - *transforming growth factor-β-activated kinase 1*

TANK - *TRAF family member associated NF-κB activator*

TBK1 - *TANK-binding kinase 1*

TCRs - receptores de células T

TICAM1 - *TIR-domain-containing adaptor molecule 1*

TICAM2 - *TIR-domain-containing adaptor molecule 2*

TIR - *toll/IL-1 receptor domain*

TIRAP - *toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor molecule*

TLR4 - *toll-like receptor 4*

TLRs - *toll-like receptors*

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

TRAF3 - *TNF-receptor-associated factor-3*

TRAF6 - *TNF-receptor-associated factor-6*

TRAM - *TRIF-related-adaptor-molecule*

TRIF - *TIR domain-containing adapter inducing interferon- β*

UTI - Unidades de Terapia Intensiva

v.o. - via oral

V' - fluxo calculado pela derivada do volume

Z_{rs}(f) - impedância da via aérea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Síndrome do desconforto respiratório agudo e sepse	22
1.2 Imunidade inata e lipopolissacarídeo	25
1.3 NF- κ B, neutrófilos e mediadores da inflamação	29
1.4 Inflamação pulmonar e reatividade das vias aéreas	41
1.5 Hormônios sexuais femininos, sistema imune e inflamação	45
1.6 Modelo experimental e justificativa do estudo	53
2 OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivos específicos	54
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 Delineamento experimental.....	55
3.1.1 Identificação dos grupos de estudo	55
3.1.2 Tratamentos farmacológicos	55
3.1.3 Grupos experimentais dos animais submetidos ao tratamento farmacológico.....	56
3.2 Preparação dos animais	56
3.2.1 Animais	56
3.2.2 OVx	57
3.2.3 Validação da eficácia da OVx	57
3.2.3.1 Análise das células presentes no lavado vaginal (LV)	57
3.2.3.2 Determinação da massa uterina	57
3.2.3.3 Dosagem dos níveis séricos de 17 β -estradiol e progesterona	58
3.2.4 Indução da inflamação pulmonar aguda pela instilação nasal de LPS.....	58
3.2.5 Tratamentos farmacológicos	59
3.2.5.1 Fármacos utilizados	59
3.3 Quantificação de células totais e diferenciais	59
da aorta abdominal foi realizada para dessangramento e eutanásia do animal.	59
3.3.1 Determinação e avaliação do número de células presentes no LBA	59
3.3.2 Quantificação e avaliação do número de leucócitos circulantes.....	60
3.3.3 Quantificação do número total de células da medula óssea	61
3.4 Regiões pulmonares utilizadas no estudo	61
3.4.1 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar	62
3.4.2 Determinação da atividade da enzima MPO pulmonar	62
3.4.3 Análise histológica	63
3.4.4 Quantificação de mediadores da inflamação gerados pelo pulmão	63
3.4.4.1 Explante pulmonar - Cultura de tecido pulmonar	63
3.4.4.2 Quantificação das citocinas e quimiocinas no explante pulmonar	64
3.4.4.3 Quantificação de nitritos no explante pulmonar.....	64
3.4.5 Análise de expressão gênica (PCR em tempo real).....	64
3.4.5.1 Extração de RNA.....	65
3.4.5.2 Quantificação e determinação da integridade do RNA total (eletroforese e nanodrop)	65
3.4.5.3 Transcrição Reversa	65
3.4.5.4 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real	66
3.4.5.5. Assays (Primers).....	66
3.5 Estudo da reatividade das vias aéreas	66
3.5.1 Avaliação da reatividade de segmentos isolados de traquéia in vitro	66
3.5.1.1 Obtenção dos segmentos de traquéia.....	66

3.5.1.2 Avaliação da reatividade de traquéia.....	67
3.5.2 Avaliação da mecânica pulmonar <i>in vivo</i>	68
3.5.2.1 Anestesia e traqueostomia dos animais	69
3.5.2.2 Avaliação da mecânica pulmonar - MCh via inalatória	70
3.5.2.3 Avaliação da mecânica pulmonar - MCh via i.v.	71
3.6 <i>Análise estatística</i>	72
4 RESULTADOS	73
4.1 Efeito da OVx sobre a massa uterina, níveis séricos hormonais e ciclo estral	73
4.2 Número de células presentes no LBA 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS.....	76
4.3 Número de células presentes no sangue 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS.....	78
4.4 Número de células presentes na medula óssea 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS.....	80
4.5 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS	81
4.6 Atividade da enzima MPO no tecido pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS	82
4.7 Avaliação da arquitetura pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS	83
4.8 Avaliação da reatividade traqueal <i>in vitro</i> 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS	85
4.9 Avaliação da mecânica pulmonar (MCh via inalatória) após 4 e 24 h da instilação nasal de LPS	86
4.10 Avaliação da mecânica pulmonar (MCh via i.v.) após 24 h da instilação nasal de LPS	87
4.11 Avaliação de mediadores da inflamação gerados no pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS	89
5 DISCUSSÃO	108
CONCLUSÃO.....	126
REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do desconforto respiratório agudo e sepse

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi inicialmente descrita em 1967, quando Ashbaugh et al. (1967) apud Tsushima et al., 2009) estudaram 12 pacientes com quadro agudo de dispnéia, taquipnéia, cianose refratária à oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso na radiografia de tórax. A partir de 1971 passou então a ser denominada síndrome do desconforto respiratório do adulto, com o intuito de diferenciá-la da síndrome da membrana hialina, que acomete recém-nascidos e é caracterizada pela falta de surfactante pulmonar (PETTY; ASHBAUGH, 1971). Dadas as dificuldades para determinar a incidência da SDRA, considerando as heterogeneidades das doenças de base e a não uniformidade do tratamento, foi realizado em 1992 na Espanha a Conferência Americana e Europeia de Consenso em SDRA (AECC) na tentativa de se obter melhores informações epidemiológicas por meio da uniformização da definição da síndrome, estabelecendo uma padronização entre os diversos estudos clínicos (BERNARD et al., 1994). Dentre as várias definições, chegou-se ao consenso de que o termo a ser empregado deveria ser o mesmo proposto inicialmente por Ashbaugh em 1967, alterando o termo adulto para agudo, pelo fato de a possibilidade de SDRA acometer indivíduos em qualquer idade.

A AECC definiu critérios de diagnósticos tanto para SDRA como para a lesão pulmonar aguda (LPA), publicada em 1994 (BERNARD et al., 1994; DUSHIANTHAN et al., 2011). As duas são caracterizadas como síndromes de início agudo, com lesão alveolar difusa, infiltrado bilateral pulmonar no exame radiológico de tórax, ruptura na barreira do epitélio alveolar e comprometimento da troca gasosa pulmonar, em pacientes com ausência de hipertensão do átrio esquerdo ou pressão de oclusão da artéria pulmonar menor que 18 mmHg (WARE; MATTHAY, 2001). A LPA e a SDRA se diferenciam apenas no que se refere à gravidade da hipoxemia, sendo na LPA a relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) inferior ou igual a 300 mmHg, enquanto na SDRA esta relação é menor ou igual a 200 mmHg (TSUSHIMA et al., 2009).

O mecanismo fisiopatológico da SDRA é complexo, não homogêneo e multifatorial. Pode ser desencadeado por fatores diretos ou primários (como infecção pulmonar, pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico), ou fatores indiretos ou secundários (como por exemplo decorrente da sepse, politraumatismos, pancreatites) (ROCCO; PELOSI, 2008). De forma geral, ocorre dano alveolar difuso e edema pulmonar em razão ao aumento na permeabilidade da membrana alvéolo-capilar pulmonar (GROPPER; WIENER-KRONISH, 2008). Citocinas

e outros agentes pró-inflamatórios iniciam e amplificam a lesão pulmonar. Envolve, ainda, o recrutamento de neutrófilos, que ativados produzem agentes oxidantes, proteases, mediadores lipídicos e outras moléculas pró-inflamatórias potencializando a lesão (MANIATIS; ORFANOS, 2008). Há o acúmulo de proteínas, sangue e restos celulares tanto no intestício pulmonar como no espaço alveolar. Esta “inundação” e a consequente disfunção do surfactante determinam o colapso alveolar e a severa hipoxemia (DUSHIANTHAN et al., 2011).

Embora decorridos quarenta e seis anos da descrição inicial da SDRA, considerando os avanços no conhecimento de sua fisiopatologia, é notável que o seu tratamento ainda não está totalmente elucidado e reside, principalmente, na oferta de ventilação mecânica invasiva; todavia, é sabido que estas estratégias ventilatórias podem ter o efeito adverso e ocasionar lesão pulmonar induzida por ventilador mecânico (LPV). Estudos vêm sendo extensivamente empregados em busca da ventilação mecânica protetora, ou seja, com baixo volume corrente associado à pressão positiva no final da expiração (PEEP – pressão positiva no final da expiração), que não cause lesão pulmonar, reduzindo assim a morbidade e mortalidade nesses pacientes (AMATO et al., 1995; AMATO et al., 1998; AMATO et al., 2007; BARBAS et al., 2005; BARBAS; MATOS, 2012; BRIEL et al., 2010; FAN et al., 2008; GATTINONI et al., 2001; GUÉRIN et al., 2013; MANCEBO et al., 2006; MARINI, 2012; MCINTYRE et al., 2000; PHOENIX et al., 2009; STEINBERG et al., 2006; TREMBLAY; SLUTSKY, 2006; WIEDEMANN et al., 2006).

Em relação à epidemiologia, um estudo Europeu envolvendo 10 países avaliaram pacientes internados em 78 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Entre os 6.522 pacientes, 6,1% apresentavam SDRA (BRUN-BUISSON et al., 2004). Um estudo realizado em 21 UTIs de três estados Australianos mostrou incidência de 28 casos de SDRA para cada 100.000 habitantes (BERSTEN et al., 2002). A SDRA é uma síndrome grave, associada a índices de mortalidade superiores a 40%; dada sua alta prevalência, cerca de 75 casos/100.000 habitantes/ano, o número de mortes por ano somente nos Estados Unidos da América (USA) chega a 80.000 (LEWANDOWSKI; LEWANDOWSKI, 2006). Li et al. (2011) avaliaram a incidência de SDRA em pacientes internados nas UTIs da Mayo Clinic, em Olmsted Country, Minnesota, EUA. Eles observaram por meio de um banco de dados eletrônicos que, entre os anos de 2001-2008, a incidência de SDRA diminuiu, passando de 81 para 38 casos por 100.000 habitantes/ano. Os autores atribuíram a diminuição da incidência à melhora do suporte clínico ofertado para estes pacientes, que incluía ventilação mecânica adequada, com baixos volumes correntes. Uma pesquisa realizada no Centro de Tratamento Intensivo da

Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto mostrou incidência de 6,3% em 524 admissões no período de maio de 2001 a abril de 2002 (OLIVEIRA; BASILLE FILHO). Outro estudo no Hospital das Clínicas de Porto Alegre revelou que a incidência de SDRA foi de 2,3% em 1.301 pacientes da UTI (FIALKOW et al., 2002).

Pacientes internados em hospitais, principalmente nas UTIs estão, de forma geral, sob potencial redução da competência imune. Nesse contexto, estímulos secundários como infecções bacterianas presentes no ambiente hospitalar constituem importante fator de risco para o desencadeamento da SDRA (MOSS; MANNINO, 2002). Seps e SDRA frequentemente se relacionam, já que aproximadamente 85% dos pacientes sépticos necessitam de ventilação mecânica, e metade desses alcançam os critérios diagnósticos para SDRA. Representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer em associação com grande variedade de eventos não infecciosos, como politraumatismo, cirurgia e queimadura (ABRAHAM et al., 2000). A seps é uma condição clínica, definida pela Sociedade de Terapia Intensiva Americana, como uma resposta sistêmica à infecção manifestada por dois ou mais sintomas, tais como: a) alteração da temperatura corporal (acima de 38 °C ou abaixo de 36 °C), b) aumento da frequência cardíaca (FC) acima de 90 batimentos por minuto, c) aumento da frequência respiratória (FR) acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg e d) número de leucócitos no sangue acima de 12.000/mm³ (leucocitose) ou menor que 4.000/mm³ (leucopenia) (ABRAHAM et al., 2000). De modo geral, a seps associa-se à indução de SDRA em aproximadamente 40% dos pacientes (HUDSON et al., 1995).

No Brasil, dados do *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* revelaram que a seps está entre as principais doenças geradoras de altos custos no setor público e privado. Os gastos financeiros com pacientes mantidos em UTI no ano de 2003 somaram R\$ 17,34 bilhões, o que representa aproximadamente entre 30 a 35% dos gastos com a área da saúde (SILVA et al., 2004). Atualmente, o tratamento da seps reside principalmente no controle da infecção por antibioticoterapia e correção dos distúrbios hemodinâmicos. Embora avanços no desenvolvimento de novos antibióticos venham acontecendo, a seps ainda é uma das causas mais comuns de morte em UTIs (DELLINGER et al., 2013).

É importante ressaltar que pacientes internados com seps, no Brasil, apresentam maior gravidade e mais tempo de internação em relação a outros lugares do mundo (SALES-JÚNIOR et al., 2006). Esses resultados podem justificar dados de estudos de 2009, que revelaram que entre médicos, apenas 27% sabem reconhecer a seps; é possível que a dificuldade de diagnóstico justifique, ao menos em parte, o alto índice de mortes ocasionadas

pela evolução da doença. Nesse sentido, o Brasil lidera o ranking de morte por sepse grave (SALES-JÚNIOR et al., 2006; COLLUCCI, 2009).

Dados obtidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (DATASUS, 2012) revelaram que no ano de 2012 houve 84.065 internações em hospitais públicos decorrentes de sepse no Brasil. Os gastos financeiros do SUS alcançaram o valor de R\$ 236.870.338,38. Neste mesmo ano, foram registrados 35.696 óbitos por sepse (dados apenas do SUS, não constam os números de internações e gastos financeiros particulares ou por planos de saúde; apenas os óbitos referem-se à todas as redes, em virtude da obrigatoriedade da emissão de certidão de óbito). Portanto, a sepse representa atual e significativo problema de saúde pública. Como a doença inflamatória está intimamente associada à sepse, estudos que visam à compreensão dos mecanismos moduladores da disfunção pulmonar nesses pacientes revestem-se de importância adicional.

1.2 Imunidade inata e lipopolissacarídeo

A resposta imune se desenvolve por meio de uma sucessão de mecanismos que visam à proteção do organismo contra patógenos que incluem bactérias, vírus, fungos e protozoários. O sistema imune detecta e elimina os microorganismos patogênicos pela discriminação entre as substâncias próprias (*self*) e estranhas (*non-self*) do organismo (TAKEDA et al., 2003). Esses mecanismos de defesa são atribuídos ao organismo pelo sistema imune inato e adaptativo. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos e, para que ocorra o desenvolvimento dessa resposta, é necessário que haja o reconhecimento do patógeno. Para tanto, existem receptores que incluem as famílias dos *toll-like receptors* (TLRs), dos *retinoic acid-inducible-gene-I (RIG-I)-like receptors* (RLRs) e dos *nod-like receptors* (NLRs) que são conhecidas como *pattern-recognition receptors* (PRRs). A função desses receptores consiste no reconhecimento dos patógenos (ou produtos derivados destes) em diferentes compartimentos celulares, tais como membrana plasmática, endossomo ou citoplasma. Com base nesse reconhecimento ocorre a indução da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras a fim de eliminar esses agentes (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). As células do sistema imune inato destroem diretamente os microorganismos patogênicos por meio de fagocitose ou pela indução da produção de citocinas, que auxiliam na eliminação desses patógenos. Além disso, macrófagos e células dendríticas têm ainda o papel de apresentação de peptídeos antigênicos derivados dos patógenos para os linfócitos T. Nesse contexto, a resposta mediada pelo sistema imune inato,

pode levar ao desenvolvimento de uma resposta de defesa do organismo mais duradoura e específica contra os patógenos, cujos mecanismos são mediados pelo sistema imune adaptativo (HOEBE et al., 2004).

O sistema imune adaptativo (ou adquirido) compõe a imunidade humoral e celular. Numa visão mais geral, a imunidade humoral está envolvida na eliminação dos patógenos presentes no sangue ou fluídos a partir da geração de anticorpos (produzidos pelos linfócitos B). Estes anticorpos neutralizam as toxinas produzidas pelos patógenos. Já a imunidade celular, mediada pelos linfócitos T, é responsável pela remoção dos patógenos de células infectadas por meio de seus efeitos citotóxicos ou por via de sinalização para os linfócitos B (HOEBE et al., 2004). Os receptores dos linfócitos T são os *T-cell receptor* (TCRs) enquanto os dos linfócitos B são os *B-cell receptor* (BCRs) e estes têm capacidade de reconhecer uma gama de diferentes antígenos. Quando um patógeno invade organismo, os linfócitos T e B e os seus respectivos receptores são ativados. Os linfócitos T expandem e em paralelo pode induzir a produção de anticorpos. Ao mesmo tempo, linfócitos T e B de memória são acionados, permitindo assim que o organismo responda mais rapidamente no caso de uma nova invasão por este mesmo patógeno (AKIRA, 2009).

Os mecanismos de sinalização e de reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato têm sido foco de muitos estudos. Uma das principais famílias dos PRRs mais extensivamente estudadas é a dos TLRs. Historicamente, a proteína Toll foi identificada na *Drosophila melanogaster* como um receptor necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral durante o desenvolvimento do embrião e posteriormente foi identificada como crucial na defesa desta mosca adulta contra fungos (LEMAITRE et al., 1996). Estes estudos levaram a identificação de homólogos da proteína Toll em humanos e camundongos, passando então à denominação de TLRs (KUMAGAI et al., 2008; KAWAI; AKIRA, 2011).

Até o momento, a subfamília dos TLRs consiste de 12 receptores identificados em murinos, sendo que em humanos foram descritos 10 destes (para revisão KAWAI; AKIRA, 2011). Cada TLR tem afinidade por ligantes específicos, ou seja, está relacionado a identificação de estruturas específicas na membrana celular de diferentes patógenos; no entanto, alguns TLRs têm afinidade por mais de um ligante e alguns ligantes são comuns para mais de um TLR.

Os TLRs podem ser expressos em diversas células, principalmente em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) e linfócitos (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004). Além disso, os TLRs podem apresentar papel e expressão diferenciados nessas células (HORNUNG et al., 2002; MUZIO et al., 2000) bem como em

diferentes tecidos, tais como pulmão, ovário, coração, sangue, trato gastrointestinal, baço dentre outros (ZAREMBER e GODOWSKI, 2002). É interessante ressaltar também que estes TLRs podem estar localizados em diferentes regiões celulares. Por exemplo os TLR1, 2, 4, 5, 6 e 11 são expressos sobre a superfície celular, na membrana plasmática, enquanto os TLR3, 7, 8 e 9 são expressos no endossomo (KUMAR et al., 2009).

Quanto a sua constituição, os TLRs são proteínas transmembranas caracterizadas por sequências extracelulares repetidas ricas em leucina, particular para cada TRL, capazes de reconhecer um amplo grupo de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) de diferentes tipos de microorganismos (para revisão ver KUMAR et al., 2009). A pouca variedade entre os PAMPs permite que um pequeno número de TLRs reconheçam uma gama de patógenos (ZHANG et al., 2007).

Quando os TLRs reconhecem um PAMP, ocorre o desencadeamento de uma cascata de sinalização resultando na ativação de sinais que chegam ao núcleo celular, instalando-se então um processo inflamatório agudo (ver adiante - Figura 2). Os sinais celulares gerados como consequência do reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato medeiam a ativação da resposta imune adaptativa; o sistema imune adaptativo, portanto, responde ao patógeno somente após o mesmo ter sido reconhecido pelo sistema imune inato. Os macrófagos e as células dendríticas agem como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo, dado que funcionam como sensores de produtos microbianos de sinais de perigo e também como células apresentadoras de antígeno. A estimulação de seus receptores (dos TLRs) por seus ligantes induz a ativação de macrófagos, bem como a maturação de células dendríticas e a migração destas células dos tecidos periféricos para os linfonodos drenantes, onde irão interagir com os linfócitos T, ativando-os e induzindo a proliferação dos clones antígeno-específicos (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004). Os TLRs têm papel fundamental na iniciação e desenvolvimento das respostas imunes já que, aparentemente, as células dendríticas se tornam completamente maduras e ativas, com capacidade de conduzir a correta ativação e diferenciação dos linfócitos T, após a estimulação por meio de ligantes de TLRs (PASARE e MEDZHITOV, 2005). Além disso, a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos T somente ocorrem se estas células reconheceram antígenos por meio da interação dos TCRs com fragmentos peptídicos apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (GIMMI et al., 1993).

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido por endotoxina, pode ser classificado como um dos principais PAMPs e é parte constituinte de parede de bactérias Gram-negativas. É formado por um polissacarídeo hidrofílico (Antígeno-O) bastante variável e um domínio

hidrofóbico altamente conservado, conhecido como lipídio A, o qual é responsável por sua atividade biológica (Figura 1) (BEUTLER e RIETSCHER, 2003; CAROFF e KARIBIAN, 2003; MAYEUX, 1997).

Figura 1 - (A) representa os principais componentes de uma bactéria Gram-negativa; (B) mostra os principais constituintes do LPS

Fonte: (A) Modificado de Akira et al., (2006). (B) Modificado de Caroff e Karibian (2003).

Historicamente, a endotoxina foi descoberta no século XIX, por observações empíricas de que a febre seria um sinal de doença. Duas teorias evoluíram a respeito da febre: 1) que seria uma das consequências deletérias de doença e 2) um mecanismo de defesa do organismo contra doença. Naquela época, pesquisas demonstraram que tecidos em putrefação quando injetados por via intravenosa (i.v.) no organismo induzia febre, o que argumentava a segunda teoria. Transcorrido mais de um século, foi descoberto que extratos de ácido tricloroacético de bactéria Gram-negativa também induziam febre. Nesse contexto, Richard Pfeiffer postulou as endotoxinas como causadores da atividade pirogênica (do grego pyros=fogo) daqueles extratos (HITCHCOCK et al., 1986). O termo endotoxina foi empregado para indicar os princípios tóxicos das bactérias Gram-negativas; os efeitos deletérios resultantes da exposição de humanos à bactérias Gram-negativas foram coletivamente denominados endotoxemia. A partir de 1935, trabalhos caracterizaram a endotoxina como um complexo macromolecular de membrana externa de bactérias Gram-negativas, composto por polissacarídeo, lipídeo e proteína. Duas décadas depois, Westphal e Lüderitz (1954) apud Hitchcock et al. (1986) identificaram o LPS, purificado, livre de proteínas e demais substâncias; também demonstraram que o LPS, composto somente por lipídeo e carboidrato, possuía todas as atividades biológicas da endotoxina. Avanços científicos culminaram na descoberta do lipídio A, isolado do LPS, como responsável pelos efeitos pirógenos e tóxicos. Mais recentemente (a

partir de 1984) o lipídio A foi sintetizado e apresenta atividade semelhante ao biológico (GALANOS et al., 1984; KOTANI et al., 1985).

Para que o LPS desencadeie seus efeitos no organismo é necessário que haja sua ligação a sítios receptivos sobre a membrana das células. Nesse contexto, o *toll-like receptor 4* (TLR4) foi descrito por Poltorak et al. (1998) como o receptor para o LPS. De fato, estudos mostram que macrófagos de animais da linhagem C3H/HeJ (camundongos mutantes para TLR4) não respondem ao LPS (RUSSO et al., 2001; SULTZER et al., 1993). Pode-se então admitir que os efeitos biológicos do lipopolissacarídeo no organismo sejam decorrentes da ativação dos TLR4.

1.3 NF- κ B, neutrófilos e mediadores da inflamação

Para que o LPS acione a cascata de sinalização via TLR4, é necessária a participação de outras moléculas no processo. Estudos mostram que o LPS se liga a uma proteína sérica denominada *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) e este complexo se acopla aos receptores CD14, os quais são proteínas localizadas na membrana de células do sistema imune e fundamental no reconhecimento do LPS (LEVAN, 2001). É interessante notar que o CD14 não possui domínio intracelular e, portanto, não pode induzir ativação celular sem que um receptor de sinal transmembranar seja acionado. Nesse contexto, estudos demonstram que o TLR4 desempenha esta função. O TLR4, juntamente com a proteína *myeloid differentiation protein-2* (MD-2), aumenta a resposta celular ao LPS (SHIMAZU et al., 1999). A partir da ativação do TLR4 (pelo complexo LPS+LBP+CD14+TLR4+MD-2) inicia-se uma cascata de sinalização que vai desencadear a ativação de um indutor da inflamação denominado *nuclear factor kappa B* (NF- κ B).

Figura 2 - Cascata de sinalização pela ativação do TLR4 por patógeno (e.g. LPS)

Ativação do TLR4 via dependente e independente de MyD88. A via dependente de MyD88 é responsável pela fase inicial da ativação do NF-κB e MAPK e tem papel central na indução de citocinas pró-inflamatórias. A via independente de MyD88, dependente de TRIF, ativa IRF3, que é requerido para a indução do IFN-β e genes indutores de IFNs.
 Fonte: Modificado de Mogensen (2009).

A partir da ativação do TLR4 pelo patógeno, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas. A transdução dos sinais é mediada inicialmente pela família de moléculas adaptadoras, que, ao menos em parte, determinam a especificidade da resposta inflamatória que será induzida. Ocorrem mudanças conformacionais no receptor TLR4 que leva à

aproximação do domínio *toll/IL-1 receptor domain* (TIR), fato que permite o recrutamento de moléculas adaptadoras (O'NEILL; BOWIE, 2007).

Em relação ao TLR4, quatro diferentes moléculas adaptadores, sendo: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adaptor-like* (Mal), também chamada de *toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor molecule* (TIRAP), *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β* (TRIF), também conhecida como *TIR-domain-containing adaptor molecule 1* (TICAM1) e *TRIF-related-adaptor-molecule* (TRAM), também denominada *TIR-domain-containing adaptor molecule 2* (TICAM2), estão envolvidas na transdução dos sinais (O'NEILL; BOWIE, 2007). A MyD88, que está envolvida na ativação da sinalização de todos os TLRs, com exceção do TLR3, tem um papel de crucial importância na ativação da cascata (KAWAI et al., 1999). Ademais, a ativação do TLR4 pode gerar duas vias de sinalização, sendo uma dependente de MyD88 (via Mal-MyD88) e outra independente de MyD88 (via TRAM-TRIF) (KAGAN et al., 2008).

Na via dependente de MyD88, a partir da ativação do TLR4 pelo PAMP (e.g. LPS), a MyD88 se associa com a parte citoplasmática do *interleukin-1 receptor* (IL-1R) de membros da família das *IL1-receptor-associated-kinase* (IRAK), que inclui IRAK1, IRAK2 e IRAK4 (AKIRA e TAKEDA, 2004). Primeiramente, ocorre associação da MyD88 com a IRAK4 e em sequência a fosforilação da IRAK1/2, que se une à *TNF-receptor-associated factor-6* (TRAF6), que, por sua vez, ativa a *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1). Ocorre então o recrutamento da *TAK1 binding protein 2* (TAB2) e *TAK1 binding protein 3* (TAB3) para TAK1 formando um complexo que pode ativar duas vias (WANG et al., 2001). Uma das vias é mediada pela ativação do *I- κ B kinase complex* (IKK). Este complexo IKK é composto por duas kinases estruturalmente relacionadas, IKK α e IKK β , e um componente regulatório *NF- κ B essential modifier* (NEMO), também conhecido como IKK γ . A ativação deste complexo IKK resulta na fosforilação do *inhibitor of κ B* (I κ B). O I κ B passa a ser degradado para ativar a translocação do NF- κ B para o núcleo, que é ativado e promove indução de genes pró-inflamatórios (HÄCKER; KARIN, 2006). A ativação do NF- κ B é controlada pela sua associação ao I κ B no citoplasma da célula, que impede sua translocação para o núcleo, permanecendo inativo. Contudo, ante a estímulo pró-inflamatório, ocorre fosforilação e degradação do I κ B, que permite a translocação do NF- κ B para o núcleo e consequente ativação (GLEZER et al., 2003).

A outra via envolve a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), onde a TAK1 é fosforilada em membros da família MAPK (MKK), incluindo MKK3, -4, -6 e -7. A MKK3/6 subsequente à fosforilação, ativa p38, enquanto MKK4/7, ativa *c-Jun N-terminal Kinase*

(JNK). Esta via leva a ativação de *activator protein-1* (AP-1) no núcleo (CHANG; KARIN, 2001). Vale lembrar que na via dependente de MyD88, quando se refere ao TLR4, há a necessidade da molécula adaptadora Mal para a interação com o domínio TIR desses receptores (FITZGERALD et al., 2001).

A estimulação do TLR4 pode também induzir a instalação da inflamação por uma via independente de MyD88. Neste contexto, o TLR4 necessita da molécula adaptadora TRIF, que se associa com TRAM (YAMAMOTO et al, 2003). Nesta via de sinalização, as moléculas *TNF-receptor-associated factor-3* (TRAF3) e *TRAF family member associated NF- κ B activator* (TANK) servem como ponte para a formação das *TANK-binding kinase 1* (TBK1) e *I κ B kinase- ϵ* (IKK ϵ) (HÄCKER et al, 2006). Em conjunto, medeiam a fosforilação de *IFN regulatory factor-3* (IRF3) (FITZGERALD et al., 2003). Estudos demonstram que a TBK1 e a IKK ϵ medeiam a geração de *interferons* (IFNs) via TRIF, entretanto, não estão envolvidas na ativação do NF- κ B mediado pelo TLR (HEMMI et al., 2004). Como consequência da fosforilação, IRF3 transloca para o núcleo e, em associação com coativadores transcricionais, induzem a produção de IFNs. Os IRFs juntamente com NF- κ B e AP-1, formam um complexo multiproteico que induz a transcrição de genes *interferons- β* (IFN- β) (THANOS; MANIATIS, 1995). Também, a via dependente de TRIF pode ativar o NF- κ B pela interação de TRIF com TRAF6 por meio da ativação de TAK1 (SATO et al., 2003). Nesta via, a molécula *receptor-interacting protein 1* (RIP1) é necessária para otimizar a ativação de NF- κ B (MEYLAN et al., 2004).

O NF- κ B, descoberto por Sen e Baltimore (1986), corresponde a uma família de proteínas que atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma ampla variedade de genes. Numerosos estudos têm demonstrado a importância deste fator de transcrição tanto em processos fisiológicos mas, sobretudo, em processos fisiopatológicos, que vão desde a diferenciação celular e desenvolvimento do organismo, até doenças degenerativas e câncer. O NF- κ B tem sido descrito em células de mamíferos, regulando a expressão de mais de 400 genes envolvidos em uma variedade de funções, tais como expressão de imunorreceptores, expressão de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, proliferação celular, transformação, apoptose, angiogênese, estresse oxidativo e metástase (BAEUERLE; HENKEL, 1994; BATRA et al., 2011; DOYLE; O'NEILL, 2006; KIM et al., 2006; LEE; BURCKART, 1998).

Cinco membros da família NF- κ B (também conhecida como família Rel) já foram caracterizados e clonados, e incluem RelA (ou p65), RelB, c-REL, p50 (ou NF- κ B1) e p52 (ou NF- κ B2). As duas últimas proteínas, a p50 e p52, são formadas a partir da clivagem de

precursores maiores como p105 e p100, respectivamente (GHOSH et al., 1998; HAYDEN; GHOSH, 2004).

Essas proteínas têm um *Rel homology domain* (RHD) que possui uma *nuclear localization sequence* (NLS), que permite a entrada destas proteínas no núcleo da célula e sua interação com o DNA, principalmente por meio de seu *N-terminal domain*. O RHD também contém os sítios de ligação para as proteínas inibitórias I κ B, responsáveis por manter os dímeros de NF- κ B inativos no citoplasma da células e os sítios que permitem a dimerização das proteínas da família NF- κ B entre si (CHEN; GREENE, 2004).

Dependendo do tipo celular e de seu estado de diferenciação, a presença de cada subunidade de NF- κ B pode variar. As subunidades RelA e p50 estão presentes em praticamente todos os tecidos (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009) enquanto c-Rel, RelB e p52 estão presentes principalmente em células hematopoiéticas (LIOU; HSIA, 2003). Uma característica comum a todas as subunidades da família NF- κ B é sua facilidade de ligação aos sítios *kappa B* presentes no promotor dos genes alvo (CHEN e GREENE, 2004).

Dentre os diversos genes regulados pelo NF- κ B, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), as quimiocinas, tais como interleucina-8 (IL-8/CXCL1), proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2/CXCL2), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), além de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (i-NOS) (COLLART et al., 1990; DRISCOLL et al., 1995; HARANT et al., 1996; KLEINERT et al., 1996; SANCÉAU et al., 1995).

O espectro de mediadores pró-inflamatórios deflagrados em resposta à ativação do NF- κ B é amplo. Dentre estes, incluem-se as citocinas e quimiocinas que têm papel crucial na mobilização e ativação das células do sistema imune para o foco inflamatório. Nesse contexto, os neutrófilos revestem-se de importância adicional (LEE; DOWNEY, 2001; REUTERSHAN; LEY, 2004).

A origem dos neutrófilos se dá na medula óssea a partir de células precursoras denominadas mieloblastos. Quando maduras, estas células são liberadas na corrente sanguínea. Por dia, cerca de $5-10 \times 10^{10}$ neutrófilos são formados na medula óssea de humanos, (SADIK et al., 2011). Estes leucócitos granulocíticos polimorfonucleares constituem cerca de 40-50% da população de leucócitos na corrente sanguínea em humanos adultos, que circulam por cerca de seis horas. Após este período, estas células entram em apoptose e são removidas (KOVACH; STANDIFORD, 2012).

Morfologicamente, neutrófilos maduros diferenciam-se dos demais granulócitos por apresentarem núcleos segmentados em 3 a 5 lóbulos. Em seus grânulos citoplasmáticos o neutrófilo possui várias enzimas proteolíticas capazes de lisar praticamente todos os componentes da maioria dos microorganismos. Apresentam em seu citoplasma quatro tipos de grânulos específicos: azurófilos (ou primários), específicos (ou secundários), terciários e vesículas secretoras. Os grânulos azurófilos contêm, em geral, muitos componentes antimicrobianos e estão ligados à atividade fagocitária das células neutrofílicas. Dentre seus principais constituintes destaca-se a enzima mieloperoxidase (MPO), proteína catalizadora de produtos do *burst* respiratório (clorito e peróxido de hidrogênio) em hipoclorito, confere a coloração esverdeada ao exsudato purulento produzido durante o processo inflamatório e pode ser utilizada como um marcador de localização e quantificação de neutrófilos presentes nos tecidos. Contém também catepsina, elastase, proteinase-3 e lisozima. Nos grânulos específicos encontram-se, além de componentes relacionados à fagocitose, receptores de membrana importantes para o desempenho das funções celulares na resposta imune inata. Os grânulos terciários, assim como nos secundários, são caracterizados por serem peroxidase negativos (ausência de MPO em seu interior) e constituem importante fonte de proteínas, que degradam a matriz extracelular, e de receptores de membrana, necessários durante o processo de extravasamento e diapedese dos neutrófilos. Por fim, nas vesículas secretoras, destacam-se diversos tipos de receptores de membrana, que são incorporados a membrana plasmática após a liberação do grânulo (SEGAL, 2005).

Quando ocorre inflamação, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de agressão celular; são mobilizados rapidamente da medula óssea para a corrente sanguínea. Esta mobilização permite o aumento do número dessas células disponíveis para o recrutamento na medula óssea (ALVES-FILHO et al., 2010). A migração de neutrófilos do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares. Este mecanismo é mediado por uma combinação de processos: mecânico, químico e molecular (SEELY et al., 2003). Quatro fases distintas da migração dos neutrófilos são descritas: mobilização da medula óssea, marginação e rolamento sobre o endotélio de microvasos, aderência e transmigração do vaso para o tecido inflamado ou infectado (KOVACH; STANDIFORD, 2012). Para esses processos de interação leucócito-endotélio, uma série de moléculas de adesão são importantes, notadamente aquelas pertencentes à família das integrinas, das imunoglobulinas, das selectinas e das caderinas. Nesse sentido, citocinas e quimiocinas estão incluídas como importantes mediadores para a migração leucocitária (LANGER; CHAVAKIS, 2009).

Por muito tempo se considerou os neutrófilos sem atividade transcricional e com reduzida capacidade de síntese de proteínas. Eram células conhecidas apenas por participar do processo inflamatório no que se refere à fagocitose e destruição de microorganismos por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e desgranulação. Entretanto, com a demonstração de que os neutrófilos produzem diversas citocinas, este conceito ficou ultrapassado. Atualmente, sabe-se que durante a inflamação, esses fagócitos migram para o local inflamado, produzem e secretam diversas citocinas e mediadores lipídicos que modulam sua função e a de outras células como linfócitos e células endoteliais. Embora os neutrófilos produzam menor quantidade de citocinas e quimiocinas por célula em relação aos macrófagos, quando considerado o processo inflamatório agudo, essas células também são importantes fontes desses mediadores (CASSATELLA, 1995).

Citocinas são pequenos polipeptídeos (cerca de 25 kD) produzidos em resposta a vários estímulos, dentre eles, lesão tecidual e infecção. Essas glicoproteínas regulam e determinam a natureza de processos como crescimento e a diferenciação celular, o processo inflamatório, a resposta imunológica e o reparo tecidual (HEEG; DALPKE, 2003; NICOD, 1993). De forma geral, a concentração sérica de citocinas é baixa em indivíduos saudáveis, entretanto, são sintetizadas a partir de células mediante a ativação da imunidade inata e adquirida, sendo o principal meio de comunicação intercelular contra patógenos (DINARELLO, 2000).

Dentre as mais potentes moléculas que compõem o sistema imune inato encontra-se a IL-1. Foi a primeira interleucina a ser descrita. Até a sua descrição molecular, que ocorrera na década de 80, outras nomenclaturas foram utilizadas (*leukocyte endogenous mediator*, *haematopoietin 1*, *endogenous pyrogen*, *catabolin*, *osteoclast activating factor*) e diversos estudos a despeito de suas múltiplas funções foram relatados. Compreende a uma família de 11 membros: IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 e IL-1F5 - IL-1F10 (SIMS e SMITH, 2010), sendo os subtipos IL-1 α e IL-1 β os mais estudados. A IL-1 α e IL-1 β apresentam atividades biológicas semelhantes e atuam sobre o mesmo receptor. Embora haja particularidades de cada subtipo, neste trabalho enfocaremos o subtipo β . É uma citocina que tem ação sistêmica, produzida por diversos tipos celulares, principalmente monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais, frente a estímulos, tais como produtos bacterianos (e.g. LPS) e outras citocinas (e.g. TNF- α). Tem ação principal sobre o recrutamento de neutrófilos e induz a formação de moléculas de adesão endotelial, mecanismo essencial para migração neutrofílica nos tecidos inflamados (DINARELLO, 1996; DINARELLO, 2011). Em baixas concentrações, a IL-1 β tem ação sobre células endoteliais,

aumentando o número de moléculas de superfície para a adesão leucocitária; em contrapartida, concentrações mais altas promovem efeito sistêmico, que pode induzir febre e produção de proteínas hepáticas de fase aguda, como o fibrinogênio e a proteína sérica amilóide A. Níveis elevados persistentes desta interleucina podem causar perda de células musculares e adiposas, até à caquexia. Adicionalmente, o sinergismo entre a IL-1 β e TNF- α é fenômeno comum na inflamação aguda. Podem apresentar correlação tanto entre seus níveis quanto na gravidade da doença; ademais exercem efeito na modulação e expressão de outras citocinas (DINARELLO, 2000).

Considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda, o TNF- α foi inicialmente identificado como um fator plasmático capaz de induzir necrose hemorrágica de tumores de camundongos transplantados, que possuía citotoxicidade seletiva para células neoplásicas cars (CARSWELL et al., 1975). Anos depois, foi denominado caquexina, como uma proteína relacionada à caquexia (KAWAKAMI; CERAMI, 1981). Somente em 1985 passou a ser conhecido por TNF- α (BEUTLER et al. 1985). É produzido principalmente por fagócitos mononucleares, células NK e células T após estímulo (por exemplo, LPS) sendo considerado um potente ativador de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais e indutor de mediadores como IL-6, IL-1 β e IL-8 (FACCIOLI et al., 1990). O TNF- α é liberado rapidamente após o estímulo inflamatório e tem importante papel na adesão de leucócitos a células endoteliais (FAFFE et al., 2000; KSONTINI et al., 1998). Diversos estudos já demonstraram sua relevância em doenças, como por exemplo na síndrome do desconforto respiratório agudo, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (SCHÜTTE et al., 1996; CANETTI et al., 2001; HAMACHER et al., 2002).

Dentre os principais mediadores pró-inflamatórios, a IL-6 tem sido destacada. É produzida principalmente por macrófagos/monócitos, linfócitos T e B, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos e em resposta à estimulação por LPS, IL-1 β e TNF- α . Também é secretada por células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e astrócitos (BHATIA; MOOCHHALA, 2004; RINCON; IRVIN, 2012). É conhecida por participar de processos imunológicos, hematopoiéticos e inflamatórios, notadamente no que se refere ao aumento do número de neutrófilos pela medula óssea; é importante indutora da síntese de proteínas na fase aguda da inflamação nos hepatócitos (e.g. proteína amilóide A e fibrinogênio). Tem sido considerada como marcador de gravidade da SDRA desencadeada por diferentes etiologias como sepse (REMICK et al., 2005) e pancreatite aguda (LESER et al., 1991). Esta citocina apresenta alta correlação com a mortalidade tanto em modelos animais como em pacientes com sepse (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996).

A magnitude da resposta inflamatória é limitante para o organismo em manter as funções vitais e a homeostase, sendo, portanto, relevante seu controle endógeno. Nesse sentido, a IL-10 é uma importante citocina imunoregulatória, com potente função anti-inflamatória. Foi descoberta em 1989 e inicialmente denominada *cytokine-synthesis inhibitory factor* (CSIF), por ser produzida por células *T-helper 2* (Th2) que inibiam a produção de citocina geradas pelas células *T-helper 1* (Th1) (HEDRICH; BREAM, 2010). Desde então, diversas células têm sido relatadas como produtoras de IL-10, incluindo monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas (*dendritic cells* - DCs), eosinófilos, células B, células T regulatórias (Treg) e células Th17 (O'GARRA; VIEIRA, 2007). Sabe-se que a IL-10 inibe a síntese de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1 e MIP-2 e atenua o recrutamento de neutrófilos (MALLAT et al., 1999). Heeschen et al. (2003) demonstraram que pacientes com síndrome coronária aguda que apresentam níveis séricos elevados de IL-10 têm melhor prognóstico. Estudos também revelaram que camundongos deficientes de IL-10 geralmente desenvolvem colite, mesmo na flora intestinal normal, e a hipótese aventada recai sobre a ativação exagerada dos macrófagos; estes resultados reforçam o papel imunoregulatório desta citocina (KÜHN et al., 1993; SELLON et al., 1998).

Constituinte da grande família das citocinas, as quimiocinas têm relevante papel na inflamação. Esta denominação, proposta por Lindley et al. (1993) apud (KUNKEL et al., 1995), refere-se às moléculas com função quimiotáticas. Constituem-se de pequenas proteínas quimioatraentes (8-12kD), são produzidas por vários tipos celulares e são consideradas moléculas chaves na regulação e migração de leucócitos para os focos de inflamação. Com base na presença e localização de resíduos de aminoácidos intercalados entre as cisteínas amino-terminais, as quimiocinas são classificadas em quatro grandes grupos: CXC (duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido), CC (duas cisteínas ligadas diretamente), C (apenas uma cisteína na porção amino-terminal) e CX3C (duas cisteínas separadas por três resíduos de cisteína) (MOSER et al., 2004). As quimiocinas da família CC (MCP-1) e CXC (IL-8 e MIP-2) têm sido reconhecidas como importantes mediadores na inflamação e infecção. Adicionalmente, as pertencentes ao grupo CXC são relatadas como potentes quimioatraentes para neutrófilos (PLIYEV, 2008).

A IL-8 foi purificada e molecularmente clonada como um fator quimiotático de neutrófilos originado do sobrenadante de células mononucleares estimuladas com LPS (YOSHIMURA et al., 1987). É uma quimiocina encontrada em humanos e considerada protótipo de quimiotaxia e ativação de neutrófilos (BAGGIOLINI et al., 1997; MUL et al.,

2000). Também foi detectada em outras espécies de animais tais como coelhos e cães, entretanto, não foi encontrada em roedores como ratos e camundongos. Nesses animais, a *cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1* (CINC-1/CXCL1) em ratos e a *keratinocyte-derived chemokine* (KC/CXCL1) e MIP-2 em camundongos, apresentam acentuada homologia com a IL-8 humana e potente atividade quimiotática (LAING; SECOMBES, 2004). A IL-8 não é constitutiva; sua síntese e secreção pode ser induzida por estímulos como o LPS ou por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α . É produzida por diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, neutrófilos, células T, células NK, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais (BAGGIOLINI, 1998). Níveis elevados de IL-8 têm sido relatados em diversos processos inflamatórios, inclusive nas vias respiratórias (DEAN et al., 1993).

A MCP-1 é produzida por diferentes tipos celulares como as endoteliais, musculares lisas, monócitos, células T, células NK e pode apresentar níveis elevados em resposta às citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (LUSTER, 1998; SICA et al., 1990). Tem como função atrair células mononucleares, principalmente monócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, linfócitos e outras quimiocinas (MAURER; STEBUT, VON, 2004). Também pode atuar na ativação do NF- κ B.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram em um experimento utilizando aortas isoladas de coelhos, que a acetilcolina promovia vasodilatação e que este efeito era dependente da presença do endotélio intacto em razão à liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio, denominado EDRF - *endothelium-derived relaxing factor*. Após sete anos, o EDRF foi identificado e denominado por Ignarro et al. (1987) como *nitric oxide* (NO), um composto já investigado anteriormente por Ferid Murad que causava relaxamento em células musculares lisas (PALMER et al., 1987). Essas descobertas levaram Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad a ganharem o prêmio Nobel de Medicina em 1998. Os achados surpreendentes acerca do NO na década de 80 renderam o reconhecimento como a molécula do ano pela *Science* em 1992 (KOSHLAND, 1992).

O NO é um radical livre, altamente lábil, gasoso, inorgânico, incolor, que apresenta um elétron desemparelhado na última camada e tem meia-vida curta, de 4-8 segundos no plasma e de 10 a 60 segundos nos tecidos (ARCHER, 1993; KIECHLE; MALINSKI, 1993; MONCADA et al., 1989). Sua biossíntese ocorre no organismo a partir do oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina, por meio da ação de um grupo de enzimas denominadas *nitric oxide synthase* (NOS) (AKTAN, 2004; KNOWLES; MONCADA, 1994; MARLETTA, 1993; STUEHR et al., 2001).

Três isoformas de NOS já foram identificadas, que incluem a NOS constitutiva (c-NOS), que são dependentes do complexo Ca^{2+} -CaM (CaM - calmodulina, proteína reguladora citosólica que possui quatro sítios de ligação para o Ca^{2+} , os quais funcionam de forma cooperativa, e têm várias funções dentre elas a de ativação dos ciclos de pontes cruzadas) e que está envolvida fisiologicamente na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS, antes denominada NOS tipo II), produzida por células quando ativadas por citocinas em situações patológicas (MARLETTA, 1994; MONCADA et al., 1991). A isoforma constitutiva compreende ainda a NOS neuronal (n-NOS, ou NOS tipo I), presente normalmente nos neurônios (BREDT; SNYDER, 1989; KNOWLES et al., 1989) e a NOS endotelial (e-NOS, ou NOS tipo III), presente principalmente nas células endoteliais vasculares (HUDSON et al., 1995; LAMAS et al., 1992; MACNAUL; MONCADA et al., 1997) e nas plaquetas (GOVERS; RABELINK, 2001; RADOMSKI et al., 1990).

O NO tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (como a acetilcolina, bradicinina, substância P, serotonina dentre outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à consequente produção de NO (BUSCONI; MICHEL, 1993; DENNINGER; MARLETTA, 1999; GEWALTIG; KOJDA, 2002; MICHEL et al., 1993).

Além da função de manutenção do tônus vascular, o NO participa de diversas outras funções fisiológicas, dentre as quais podemos citar neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de leucócitos ao endotélio, efeito antioxidante e defesa do organismo (BISHOP; ANDERSON, 2005; BOGDAN, 2001; KUBES et al., 1991; NAVA; LÜSCHER, 1995; VASTA et al., 1995; WENNMALM, 1994; WOLIN, 2000).

O NO também tem sido relatado como um neurotransmissor endógeno envolvido no sistema nervoso autônomo pulmonar não-adrenérgico não-colinérgico (NANC). O sistema NANC apresenta ações sobre o tônus brônquico, tendo um componente inibitório (i-NANC) que promove broncodilatação (participação do NO) e outro excitatório (e-NANC) responsável pela broncoconstrição. Estudos mostram que o NANC atua nas vias aéreas modulando o tônus brônquico, o tônus vascular e a exudação plasmática (ALVING et al., 1992; BARNES; BELVISI, 1993; KUO et al., 1992).

Em relação à produção de NO, a i-NOS é responsável por concentrações maiores àquelas promovidas pela c-NOS (WONG; MARSDEN, 1996); a ativação da i-NOS é

responsável pelas propriedades citotóxicas geradas pelo NO (KIECHLE; MALINSKI, 1993) e geralmente é ativada em processos patológicos, por meio de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β (HEBA et al., 2001) ou LPS, em uma variedade de células que inclui macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, linfócitos T, miócitos, hepatócitos, e plaquetas (ALDERTON et al., 2001; CARRERAS et al., 1994; MONCADA et al., 1991), o que resulta na ativação do NF- κ B e AP-1 e transcrição de i-NOS (GHOSH; HAYDEN, 2008; HEBA et al., 2001).

No que se refere ao pulmão, diversos trabalhos têm demonstrado a participação da NOS em uma variedade de patologias pulmonares (ANGELI et al., 2008; LEICK-MALDONADO et al., 2004; MARQUES et al., 2012; MEURS et al., 2003; PRADO et al., 2005; PRADO et al., 2011; RICCIARDOLO et al., 2004; STARLING et al., 2009)

Estudos têm revelado o efeito dual do NO no organismo. De forma geral sugerem que o bloqueio não seletivo das isoformas de NOS (tanto da i-NOS como da c-NOS) pode ter efeito deletério, em que se observa piora dos parâmetros de doença avaliados em comparação aos estudos conduzidos com a inibição específica da i-NOS (bloqueio seletivo), o que permite sugerir papel protetor da c-NOS ao organismo (BOER DE et al., 2001; CAVRIANI et al., 2004; MEURS et al., 2003; PRADO et al., 2006; RICCIARDOLO, 2003; RICCIARDOLO et al., 2004; TAVAF-MOTAMEN et al., 1998; WARD et al., 2000; XIONG et al., 1999)

Está comprovado que diversas situações patológicas estão relacionadas à superprodução de NO, como por exemplo nas inflamações. Uma das possíveis abordagens terapêuticas, com intuito de se diminuir o nível de NO endógeno, consiste na utilização de inibidores das isoformas da NOS. O emprego dessas ferramentas em pesquisas científicas têm sido amplamente utilizados. A produção de NO pode ser inibida pelo bloqueio da enzima NOS por análogos da arginina N-substituídos, como a N^o-monometil-L-arginina (L-NMMA) (REES et al., 1990), a N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO) (MÜLSCH; BUSSE), a N^o-amino-L-arginina (L-NAA) (GROSS et al., 1990), a N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG) (MOORE et al., 1990) e a N^o-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (REES et al., 1990). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores da NOS. É importante destacar o amplo emprego do L-NAME (inibidor da NOS não-seletivo), tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro*. Por outro lado, alguns inibidores apresentam relativa seletividade para i-NOS como por exemplo a aminoguanidina (GRIFFITHS et al., 1993) e o N-(3-(aminomethyl)benzy)acetamidina (1400W) (GARVEY et al., 1997).

Experimentalmente, a detecção do NO em amostras biológicas é difícil em virtude da ínfima concentração e da meia vida extremamente curta deste composto. Diversos métodos

têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, por meio de ensaios que reflitam a sua presença. A determinação direta de NO geralmente é obtida utilizando metodologias como a ressonância paramagnética eletrônica e a quimioluminescência. Já a determinação indireta pode ser feita, dentre diversos modos, por meio da dosagem de nitritos e nitratos (produtos da reação do NO com o oxigênio) no soro, plasma, urina e sobrenadante de cultura de células (ARCHER, 1993; GREEN et al., 1982; KIECHLE; MALINSKI, 1993).

Vale ressaltar que as ações do NO no organismo, embora amplamente estudadas, são complexas, multimediadas e que dependem de uma série de fatores, o que exige análise criteriosa para melhor compreensão. Diversos estudos conduzidos no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental acerca do envolvimento do NO na inflamação pulmonar foram descritos (CAVRIANI et al., 2004; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2006; COELHO et al., 2007; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al., 2010; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al., 2013). Recentemente, Breithaupt-Faloppa et al. (2013) mostraram que o efeito protetor do estradiol na inflamação pulmonar aguda de origem indireta é dependente de NO. Nessa linha de envolvimento com esteróides sexuais, propusemos investigar a participação do NO na inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS, notadamente no que se refere à reatividade das vias aéreas.

1.4 Inflamação pulmonar e reatividade das vias aéreas

Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrente da inflamação sistêmica podem ser investigados experimentalmente, por exemplo, pela administração de LPS por via sistêmica a animais de laboratório (BRIGHAM e MEYRICK, 1986), pela perfuração de alça intestinal (RIO-SANTOS et al., 2003) ou por meio de trauma (e/ou choque) hemorrágico (CATANIA e CHAUDRY, 1999). Em todos esses modelos observam-se os sinais apresentados na inflamação pulmonar aguda, que de forma geral desenvolvem lesão inflamatória principalmente por infiltração neutrofílica pulmonar e é potencializada por diversos mediadores pró-inflamatórios, dentre os quais destacam-se IL-1 β , IL-8, TNF- α e mediadores lipídicos. Ocorre também aumento da pressão arterial pulmonar, hipoxemia e edema alveolar e intersticial (MATUTE-BELLO et al., 2008). Estes efeitos encontrados em modelos animais são similares aos sinais apresentados por pacientes quando acometidos da SDRA.

Está bem estabelecido que a inalação de LPS ou sua administração diretamente nas vias aéreas representa enorme risco de indução de inflamação pulmonar. Togbe et al. (2007) demonstraram que a inalação de LPS ativa o p38 MAPK e induz a produção de TNF, broncoconstrição e recrutamento de neutrófilos para dentro do tecido pulmonar e espaço broncoalveolar; este achado demonstra que os TLR4, em conjunto com MD-2 e CD14, são os responsáveis pelo desencadeamento desses fenômenos.

Figura 3 - Indução da inflamação pulmonar aguda promovida pelo LPS

Fonte: Modificado de TOGBE et al., 2007.

O LPS causa febre, tosse, sensação de “aperto do peito”, dispnéia, sibilos e diminuição da capacidade de perfusão pulmonar (RYLANDER et al., 1989). Como já mencionado, o LPS gera amplo espectro de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Yi et al. (1996) demonstraram aumento de RNAm das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no pulmão após exposição ao LPS. Salez et al. (2001) mostraram ainda que a instilação nasal de LPS induz liberação de IL-10 por monócitos recrutados ao pulmão. Adicionalmente, o LPS além de aumentar o número de neutrófilos no espaço alveolar levar ao desencadeamento de hiperreatividade brônquica (BHR).

Um dos mecanismos mais importantes para contração do músculo liso é dependente de cálcio (Ca²⁺). Resumidamente, a contração ocorre quando um agonista se liga ao receptor de membrana da célula muscular lisa e ativa a enzima fosfolipase C (PLC) pela subunidade α da proteína G, que cliva o fosfatidilinositol (PIP₂) em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol

(DAG). Na sequência, o IP_3 liga-se a receptores de membrana no retículo sarcoplasmático – receptor de inositol trifosfato (IP_3R) que irá liberar o Ca^{2+} do retículo para o citosol. O Ca^{2+} se liga à CaM e este complexo Ca^{2+} -CaM ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que induz a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC). Ocorre então o deslizamento dos filamentos finos (actina) sobre os filamentos grossos (miosina) culminando na contração da célula muscular lisa (FERRIS; SNYDER, 1992; SOMLYO; SOMLYO, 1990; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Dentre os principais reguladores da contração do músculo liso das vias aéreas o sistema nervoso autônomo parassimpático ocupa lugar de destaque (COULSON; FRYER, 2003). Por meio da ativação do nervo vago, principal regulador parassimpático das vias aéreas, a acetilcolina (ACh) é liberada e então liga-se aos receptores colinérgicos muscarínicos, notadamente os do tipo M3, localizados nas células musculares lisas, culminando na contração (EGLEN et al., 1996). Ademais, o sistema NANC também participa do controle do tônus brônquico, e o e-NANC parece ser o mediador da broncoconstrição (BARNES; BELVISI, 1993; SMALL et al., 1992).

Embora não totalmente elucidado, um dos mecanismos subjacentes à contração do músculo liso independentes de Ca^{2+} (conhecido como sensibilização ao Ca^{2+}) ocorre pela via Rho/Rho quinase¹ (CHIBA; MISAWA, 2004; FUKATA et al., 2001; SYLVESTER, 2004).

Rho quinase é uma proteína envolvida na sinalização de muitas funções celulares, dentre elas na contração. Quando ativada, a proteína Rho quinase altera o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e miosinofosfatase, fosforilando e consequentemente inativando a ligação da miosinofosfatase. Como a miosinofosfatase remove o fosfato da MLC fosforilada para induzir o relaxamento muscular, a inibição de sua atividade pela Rho quinase contribui para contração muscular (CHIBA et al., 2010; FERNANDES et al., 2006; SYLVESTER, 2004). Diversos trabalhos vêm sendo realizados para esclarecer a participação dessa via em modelos experimentais BHR.

¹ As proteínas Rho, pequenas GTPases da superfamília Ras, estão envolvidas na regulação de várias funções celulares. Nesse sentido, foi demonstrado que as Rho quinases têm importante papel na contração celular, regulando a força e a velocidade do cruzamento das pontes de actina-miosina no músculo liso. Alterações na via Rho/Rho quinase podem culminar em processos patológicos, como por exemplo na BHR. As proteínas Rho variam entre um estado *guanosine diphosphate* (GDP) inativo e um estado *guanosine triphosphate* (GTP) ativo. Para se tornar ativa, a Rho interage com alguns efetores tais como a Rho quinase. A Rho quinase (ou ROCK) pode ser classificada em dois subtipos: a ROCK1 (ou ROCK β ou p160 ROCK) e a ROCK2 (ou ROCK α) e podem ser ativadas pelas proteínas Rho e por mediadores liberados pelo músculo liso em resposta a agonistas (para revisão WETTSCHURECK e OFFERMANN, 2002).

WETTSCHURECK, N. e OFFERMANN, S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *Journal of molecular medicine*, v. 80(10), p. 629-38, 2002.

A BHR pode ser definida como um estreitamento excessivo do lúmen das vias aéreas promovido por algum estímulo. O desenvolvimento da BHR a agentes broncoconstritores é uma evento que geralmente está associado à inflamação pulmonar. Nesse sentido, Alexander e Paddock (1921) foram pioneiros a descrever o envolvimento da BHR com inflamação pulmonar. Eles observaram que a broncoconstrição ocorria com maior frequência em paciente asmáticos em relação aos sadios, após a administração de pilocarpina (ALEXANDER e PADDOCK, 1921 apud PASCOE et al., 2012). A partir de então, inúmeros trabalhos vem sendo conduzidos.

Os eventos de contração do músculo liso das vias aéreas que determinam o desenvolvimento de BHR são mediados na maioria das vezes pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (tais como histamina, leucotrienos, endotelina-1) ou neurotransmissores (como neuropeptídeos e, principalmente, ACh). Cada agente exerce suas ações via estimulação de receptores específicos na membrana da célula do músculo liso, tendo a ACh sobre o receptor M3 crucial relevância para broncoconstrição (KOMORI et al., 1995; SEMENOV et al., 2012). Por outro lado, trabalhos mostram que podem ocorrer também diminuição da expressão e/ou na função dos receptores M2, contribuindo para intensa BHR em razão do aumento na liberação de ACh pelo nervo vago (FRYER; WILLS-KARP, 1991; FRYER; JACOBY, 1998; SCHULTHEIS et al., 1994).

Vale ressaltar que a BHR também possui um componente genético (SANCTIS et al., 1995; POSTMA et al., 1995). Quando a BHR ocorre independente do processo inflamatório nas vias aéreas é denominada BHR intrínseca ou não-inflamatória, característico de doenças intrínsecas (por exemplo asma intrínseca). Contudo, fatores ambientais, como a exposição à alérgenos ou infecção podem influenciar a BHR e, neste caso, induzir a BHR inflamatória (MEURS et al., 2008).

Em relação à BHR inflamatória, trabalhos relatam que podem ser subdivididas em duas classes, sendo uma variável (ou induzível) e a outra persistente (COCKCROFT; DAVIS, 2006). A BHR variável reflete o processo inflamatório desencadeado pela exposição à estímulos externos, como por exemplo infecções respiratórias, substâncias alérgicas (BUSSE, 2010). Estudos também relacionam células inflamatórias com aumento da produção de mediadores e o desenvolvimento da BHR (FERGUSON; WONG, 1989; JEFFERY et al., 1989; WARDLAW et al., 1988). Por outro lado, a BHR persistente pode ser observada em pacientes com doença crônica (e.g. asma crônica) onde há o envolvimento de alterações estruturais do músculo liso, decorrentes do remodelamento pulmonar, que é provocado por modificações teciduais tais como deposição de colágeno (fibrose), hipertrofia/hiperplasia das

células lisas musculares, alteração da matriz extracelular, dentre outros que em conjunto conferem aumento da espessura da parede das vias aéreas (HARGREAVE et al., 1981).

Estudos acerca da mecânica pulmonar em roedores como forma de se avaliar a função pulmonar tem se destacado. A avaliação da mecânica pulmonar inclui compreender a fisiologia respiratória tanto no aspecto espontâneo como no suporte ventilatório. Tanto na fisiologia, como em situações patológicas, modelos matemáticos são utilizados e buscam representar o comportamento da respiração. Estes modelos matemáticos são amplamente empregados por meio de ventiladores mecânicos, tanto na prática clínica, como nas UTIs em hospitais, como em laboratórios de pesquisa científica.

Em situações patológicas, a inflamação do parênquima pulmonar pode induzir alterações importantes de sua micro estrutura. De forma geral, estas alterações estruturais modificam a mecânica ventilatória e consequentemente o funcionamento do sistema respiratório como um todo. Diversos ventiladores mecânicos foram criados e, em conjunto com os modelos matemáticos, fornecem dados que nos permitem avaliar a função pulmonar. Nesse sentido, o flexiVent (SCIREQ[®]) é um ventilador mecânico utilizado na prática experimental para medir resistência das vias aéreas e elastância pulmonar em pequenos animais *in vivo*, frente a doses crescentes de MCh. De modo simplificado, o flexiVent injeta no pulmão do animal um volume de gás (ar atmosférico) conhecido. A pressão gerada por esse volume é adquirida pelo ventilador por meio de um transdutor. Logo, com a pressão e volume conhecidos, são obtidos os valores de resistência do sistema respiratório e elastância pulmonar.

Resistência das vias aéreas pode ser definida como a capacidade do sistema condutor de gás e dos tecidos em resistir ao fluxo aéreo (BATES, 2009). Entende-se por elastância a força de recolhimento elástico do tecido pulmonar de retornar à sua forma original após ter sido “deformado” por uma força; é a variação da pressão pelo volume mobilizado ($\Delta P/\Delta V$) (BATES, 2009, MORIYA, 2003).

1.5 Hormônios sexuais femininos, sistema imune e inflamação

Hormônios sexuais femininos (HSF) são sintetizados principalmente pelos ovários, embora em menores quantidades também pelas glândulas adrenais e placenta (CAREY et al., 2007). Referem-se à uma classe de hormônios que tem como precursor comum o colesterol. Resumidamente, por meio de enzimas, ocorre as conversões: colesterol $\rightarrow$ pregnenolona $\rightarrow$ progesterona $\rightarrow$ 17-hidroxiprogesterona $\rightarrow$ testosterona $\rightarrow$ estradiol $\leftrightarrow$ estrona (para revisão

(MENDELSON; KARAS, 2005; PAYNE; HALES, 2004). Na mulher, encontram-se presentes três tipos de estrógenos, o estriol (E1), o estradiol (E2) e a estrona (E3). Quando grávidas predomina o estriol, enquanto em não grávidas e na pré-menopausa há maior concentração de estradiol; já na pós-menopausa encontra-se mais estrona.

Figura 4 - Estrutura molecular dos hormônios esteróides: (A) estradiol e (B) progesterona

Fonte: Modificado de TAM et al., 2011.

Durante a vida reprodutiva das mulheres, quatro principais hormônios caracterizam o ciclo menstrual: estradiol, progesterona (P4), hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante. Este ciclo dura em média 28 dias e é dividido em duas fases: folicular (cerca dos dias 1-13) e lútea (em média dos dias 15-28). A ovulação é marcada pelo aumento do estradiol e ocorre em média no 14º dia. Menstruação (cerca dos dias 1-4) e a fase folicular são caracterizadas por baixos níveis séricos de estradiol e progesterona, enquanto a ovulação é marcada por altos níveis de estradiol e baixos de progesterona. Durante a fase lútea, os níveis médios circulantes de estradiol permanecem baixos, enquanto a progesterona tem níveis elevados. Entretanto, na menopausa, os níveis séricos tanto de estradiol quanto de progesterona são significativamente reduzidos, menores àqueles encontrados na fase reprodutiva da mulher (TAM et al., 2011).

Em roedores, especificamente em camundongos, o ciclo tem duração de 4 a 5 dias e é conhecido como ciclo estral, correspondente às fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II), com duração média de 12-14h, 25-27h, 6-8h e 55-57h, respectivamente (GOLDMAN et al., 2007). As características celulares encontradas no lavado vaginal desses animais variam de acordo com as quatro fases do ciclo e são dependentes dos hormônios gonadais. O proestro é marcado por elevadas concentrações séricas de estrógenos e lavado vaginal com predomínio de células epiteliais nucleadas. É seguido por alteração no epitélio vaginal, em que predominam as células queratinizadas, caracterizando a fase de estro. O metaestro pode ser diferenciado no lavado vaginal por conter leucócitos, com presença de células nucleadas e cornificadas. A última fase corresponde ao diestro e é a mais longa, em

que há predominância de leucócitos e muco no lavado vaginal. Nesta fase os níveis séricos de estrógenos e progesterona estão mais baixos (GOLDMAN et al., 2007).

Os hormônios sexuais atuam via receptores próprios, conhecidos como *estrogen receptor* (ER- α e ER- β) e *progesterone receptor* (PR-A e PR-B) (HEWITT et al., 2005). O estradiol se liga com alta afinidade ao ER α ou ER β e, dessa ligação, são gerados como produtos metabólicos estriol e estrona (ELLMANN et al., 2009).

Os ER- α , ER- β , PR-A e PR-B já foram identificados em ratos, camundongos e humanos (KUIPER et al., 1996; MOSSELMAN et al., 1996; TREMBLAY et al., 1997). Ademais, além do trato reprodutivo, esses receptores são encontrados expressos em outro tecidos como mamas, ossos, coração, cérebro e pulmão (COUSE et al., 1997; KOEHLER et al., 2005). Nos pulmões, a expressão de ER- β é predominantemente maior que ER- α (IVANOVA et al., 2009). Adicionalmente, a maioria desses receptores são encontrados no citoplasma da célula, embora exista pequenas expressões no núcleo e mitocôndrias (IVANOVA et al., 2009). Tanto os ER quanto os PR pertencem à família dos receptores nucleares (KOEHLER et al., 2005).

O mecanismo exato de ativação dos ER no pulmão não está elucidado. Sabe-se que o estradiol se liga diretamente ao ER e promove sua alteração conformacional, que resulta em dimerização, translocação para o núcleo e ligação ao DNA conjuntamente a alguns cofatores, modulando, assim, os genes alvos. As regiões do DNA nas quais o ER ativado se liga são chamadas de elementos de resposta hormonal. Os ER ligados a essas regiões dirigem-se às regiões promotoras dos genes e iniciam a transcrição.

Embora não conclusivos, outro mecanismo de ação rápida têm sido proposto para os hormônios esteróides. Parece que neste mecanismo não ocorre alteração da expressão gênica e síntese proteica (BROSENS et al., 2004).

Em relação aos PR, tanto o PR-A quanto o PR-B podem formar dímeros e se ligar ao DNA de três modos, formando homodímeros (PR-A/PR-A e PR-B/PR-B) e um heterodímero. Vale lembrar que o efeito da progesterona depende da constituição específica de cada um destes dímeros, pois o PR-B revelou uma ativação junto ao DNA e o PR-A uma função repressora. Tanto o PR-A quanto PR-B possuem as mesmas afinidades pela progesterona, embora apresentem diferentes intensidades transcricionais. PR-A tem menor atividade transcricional e em geral atua como um inibidor competitivo de PR-B (BROSENS et al., 2004; NISWENDER, 2002). O efeito da progesterona parece depender da ação dos estrógenos. Pode ter efeitos sinérgicos ou antagônicos aos estrógenos nos tecidos alvo;

enquanto o estrogênio estimula a expressão de PR (efeito sinérgico), a progesterona pode inibir a expressão de ER (efeito antagônico) (NISWENDER, 2002).

Nos últimos anos, pesquisas envolvendo a interação HSF com o sistema imune vêm sendo intensamente executadas. Um dos principais focos desses estudos têm sido referentes ao dimorfismo sexual existente nas doenças infecciosas, bem como na susceptibilidade dessas doenças (FISH, 2008; MARRIOT et al., 2006). Ademais, têm crescido substancialmente as investigações acerca da participação dos HSF em processos inflamatórios, particularmente no que se refere à inflamação pulmonar (CARD et al., 2006; CUZZOCREA et al., 2001; SPEYER et al., 2005).

No universo da inflamação pulmonar alérgica como, por exemplo, na asma, diversos estudos conduzidos no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental têm demonstrado a participação dos HSF na modulação da magnitude da resposta inflamatória, revelando complexo papel dos esteróides sexuais. De forma geral, o estrogênio e a progesterona podem exercer efeito dual, ou seja, protetor ou indutor da inflamação (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al. 2007; DE OLIVEIRA et al. 2010; RIFFO-VASQUEZ et al., 2007; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2013).

Ligeiro de Oliveira et al. (2004) utilizaram um modelo experimental clássico de inflamação pulmonar alérgica, em que OVA é administrada via subcutânea (s.c.) no animal (sensibilização ao antígeno) e, após quatorze dias, o animal é exposto à um aerossol de OVA (desafio nasal), o que desencadeia a inflamação pulmonar alérgica. Os autores investigaram o envolvimento dos HSF no momento da sensibilização. Para tanto, ratas foram submetidas à remoção bilateral dos ovários (OVx) e após 1 (DE OLIVEIRA et al., 2010) ou 7 (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004) dias foram sensibilizadas com OVA. Como controle, ratas foram falsamente operadas, sem a remoção dos ovários. Assim, ratas sensibilizadas 1 dia após a OVx apresentavam níveis circulantes de HSF próximos àqueles encontrados em animais com ovários intactos; em contrapartida, as ratas sensibilizadas 7 dias após a OVx apresentavam níveis circulantes de HSF significativamente reduzidos. Os resultados das ratas sensibilizadas 1 dia após a OVx mostraram piora da inflamação pulmonar alérgica pelo aumento do número de células totais recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA) em comparação àqueles controles com ovários intactos. O tratamento com 17β -estradiol atenuou a inflamação pulmonar reduzindo o número de células no LBA enquanto a progesterona agravou o quadro, resultando em maior infiltrado celular no LBA. Por outro lado, os resultados obtidos das ratas sensibilizadas 7 dias após a OVx mostraram atenuada inflamação pulmonar alérgica, com menor quantidade de células no LBA em comparação aos seus controles; o tratamento com

17 β -estradiol promoveu piora da inflamação inferido por meio de elevado infiltrado celular no LBA. O efeito dual dos HSF sobre a inflamação pulmonar alérgica parecem estar relacionados com a presença ou ausência de HSF circulantes no momento da sensibilização ao antígeno, o que pode ser representativo do fenômeno humano de asma pré-menstrual (sensibilização 1 dia após OVx) ou asma pós-menopausa (sensibilização 7 dias após OVx).

Riffo-Vasquez et al. (2007) utilizaram o mesmo protocolo experimental de inflamação pulmonar alérgica referido em Ligeiro de Oliveira et al. (2004) e observaram, em camundongos fêmeas da linhagem balb/c, que a sensibilização após 7 dias da OVx também promove redução do número total de células totais e eosinófilos, bem como diminuição da interleucina-5 no LBA em comparação àqueles com ovários intactos. Adicionalmente, observaram redução da reatividade das vias aéreas *in vivo* frente à diferentes doses de MCh, avaliada por meio de ventilação mecânica.

Speyer et al. (2005) investigaram os efeitos do estrógeno sobre a inflamação pulmonar aguda causada por administração traqueal de LPS, e sugeriram que este esteróide suprime a resposta inflamatória por mediar a expressão de moléculas de adesão e a geração de mediadores pró-inflamatórios. Esses autores mostraram que 6 horas após a administração de LPS, o aumento de permeabilidade microvascular pulmonar e o acúmulo de neutrófilos no pulmão foi significativamente maior em camundongos fêmeas OVx quando comparadas às fêmeas com os ovários intactos. Ainda neste estudo, os animais pertencentes ao grupo falsamente operado e ao grupo OVx quando tratados com estradiol 1 hora antes da administração de LPS, resultaram em significativa redução nos níveis de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) pulmonar, IL-1 β no LBA e IL-6 no soro. Não só na inflamação induzida por LPS, mas também naquela causada por carragenina, o estrógeno parece exercer efeito protetor (CUZZOCREA et al., 2001).

Lino dos Santos Franco et al. (2011) mostraram o efeito da exposição ao poluente ambiental formaldeído na inflamação pulmonar em ratas, 7 dias após a OVx. Observaram redução do número total de células no LBA das ratas OVx em comparação àquelas com ovários intactos após exposição ao poluente. Contudo, o tratamento tanto com 17 β -estradiol quanto com progesterona previamente ao formaldeído, promoveu aumento da celularidade total no LBA. Também investigaram a reatividade de segmentos de traquéia à MCh *in vitro*; os resultados mostraram que as ratas OVx após contato com o poluente obtiveram escores maiores de contração, revelando hiperreatividade da traquéia. O tratamento com 17 β -estradiol, mas não com progesterona, foi capaz de reduzir a reatividade traqueal. Os autores sugerem que os esteróides sexuais modulem de forma diferente os eventos celulares e de

músculo liso. A carência dos HSF promovida pela OVx contribui para a diminuição do número de células totais no pulmão e para o aumento da reatividade da traquéia após exposição dos animais ao formaldeído.

Recentemente, Breithaupt-Faloppa et al. (2013) demonstraram o papel protetor do estradiol sobre a inflamação pulmonar de origem indireta em ratas, induzida por isquemia e reperfusão intestinal (I/R-i), e que este efeito parece depender de NO. Os animais OVx exibiram alta atividade da enzima MPO pulmonar e elevado extravasamento do corante Azul de Evans (AE) no pulmão após a I/R-i, em relação aos animais com ovários intactos. Contudo, o 17 β -estradiol foi capaz de reduzir extravasamento de AE, mas não a MPO pulmonar, além de promover aumento da expressão de e-NOS no pumão.

No que tange ao envolvimento dos HSF com o sistema imune, um trabalho pioneiro realizado por Calzolari (1898) mostrou que decorrente à castração de coelhos ocorreu aumento da massa do timo (CALZOLARI, 1898 apud WICHMANN et al., 1996). Posteriormente, foi relatado que em camundongos machos, após evento traumático com subsequente hemorragia, há aumento na taxa de apoptose de timócitos, fenômeno este não observado em camundongos fêmeas (ANGELE et al., 1999). Ainda, um estudo retrospectivo de dados clínicos realizado por McGowan et al. (1975), indicaram que a incidência de infecções bacterianas em pacientes traumatizados do gênero masculino se sobrepõe ao feminino. Essas observações clínicas, experimentais e epidemiológicas sugerem que o gênero feminino é mais resistente à infecção que o masculino.

No que se refere ao papel do estrógeno na modulação da resposta imune, pesquisas apontam para a ação protetora deste esteróide contra infecção bacteriana, reforçando que o gênero feminino é menos susceptível à infecções (OBERHOLZER et al., 2000). Além disso, mulheres na pré-menopausa têm níveis de TNF- α , induzido por LPS, significativamente mais baixos em comparação aos observados em homens ou àqueles observados em mulheres na pós-menopausa (MOXLEY et al., 2004).

Em relação ao trauma-hemorragico, estudos têm revelado que o estrógeno desempenha função de proteção do organismo, promovendo a manutenção da competência imune (ANGELE et al., 2000; ANGELE et al., 2006; CHAUDRY et al., 2003; FRINK et al., 2007; HILDEBRAND et al., 2006; MELDRUM et al., 2006; MOEINPOUR et al., 2007). Esta proteção pode ser inferida pelo alto índice de sobrevivência de camundongos fêmeas em relação aos machos em casos de infecção generalizada (sepse) e após eventos de trauma-hemorragicos, atribuindo ao estrógeno este papel (DIODATO et al., 2001; KNÖFERL et al.,

2002; WICHMANN et al., 1996). Vale salientar que tais modelos revelam a participação dos HSF na indução da inflamação pulmonar de origem indireta.

Knöferl et al. (2001) demonstraram que camundongos fêmeas OVx, após sofrerem trauma-hemorragico, apresentaram diminuição da resposta imune. Os autores observaram diminuição da proliferação de esplenócitos em cultura e diminuição de IFN- γ quando comparadas às fêmeas também OVx e tratadas com estradiol. Além disso, a liberação de IL-1 β e IL-6 por macrófagos peritoneais e de IL-6 e IL-12 por macrófagos esplênicos foram significativamente diminuídas nas fêmeas OVx após o trauma-hemorragico, quando comparadas com as fêmeas OVx que receberam estradiol após o trauma. Esses achados são indicativos de que a diminuição da resposta imune, após o trauma-hemorragico em camundongos fêmeas OVx, pode ser aumentada pela administração de estradiol (KNÖFERL et al., 2001).

Estudos realizados em camundongos revelaram que o estradiol protege o organismo dos danos promovidos pelo trauma-hemorragico e inibe a produção de *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) (HSIEH et al., 2007). MIF é uma citocina pró-inflamatória liberada por macrófagos e linfócitos T, que exerce importante papel na exacerbação da inflamação e sepse, além de estar associado à injúria pulmonar (MAKITA et al., 1998; TANINO et al., 2002). Além disso, Roger et al. (2001) demonstraram que MIF pode regular a resposta inflamatória por meio da modulação da via TLR4. Nesse contexto, Hsieh et al. (2007) mostraram que 4 horas após o trauma-hemorragico em machos, os níveis de MIF, de TLR4 e de IL-6 no pulmão dos camundongos apresentaram-se elevados, bem como influxo neutrofílico e formação de edema pulmonar. Com a administração de estradiol, o aumento dessas citocinas/proteínas foi inibido, bem como o influxo neutrofílico e o edema pulmonar foi reduzido. Contudo, a administração exógena de *recombinant mouse macrophage migration inhibitory factor* (rMIF) aboliu a diminuição dos níveis de TLR4, IL-6 e TNF- α mediada pelo estradiol. Esses resultados sugerem que os efeitos protetores do estradiol sobre os danos causados ao tecido pulmonar possam ser pela *downregulation* de MIF na modulação do TLR4 após o trauma-hemorragico (HSIEH et al., 2007). Estes estudos reforçam a visão de que os HSF possam exercer suas ações sobre a resposta inflamatória por mediar o sistema imune inato, notadamente sobre os TLRs.

A idéia de que o dimorfismo sexual existe também na expressão dos receptores de LPS pode ser sustentada por estudos que demonstram o aumento significativo da expressão gênica de CD14 em células de Kupffer em ratas quando comparadas aos ratos, posteriormente à exposição crônica de etanol (KONO et al., 2000). Nesse aspecto, Marriot et al. (2006)

demonstraram que em camundongos machos observa-se aumento de LBP circulante, o que pode justificar a facilitação/aumento da ligação do LPS quando no organismo ao CD14 e ao TLR4, propiciando elevada ativação/expressão de TLR4 na superfície celular desses animais. De maneira contraditória, Eisenmenger et al. (2004) sugerem que a expressão de TLR4 e CD14, após o trauma-hemorragico, independe do gênero; os autores argumentam que uma possível explicação para o dimorfismo sexual que independe da diferente expressão de TLR4, baseia-se no fato de que os esteróides sexuais afetam diretamente a ativação da enzima p38, que ocorre abaixo da expressão de TLR4 na cascata de sinalização celular. Vegeto et al. (2004) demonstraram que o tratamento de macrófagos com 17 β -estradiol não reduz a expressão de TLR4 e CD14, porém postulam que não deve ser descartada a hipótese da possibilidade dos esteróides sexuais exercerem efeitos sobre os monócitos e/ou células progenitoras mielóides antes do final da diferenciação.

Rettew et al. (2009) demonstraram que a remoção dos estrógenos endógenos contribuem para a diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α e também das anti-inflamatórias, como a IL-10, com concomitante redução nos níveis circulantes de LBP e da expressão de TLR4 na superfície celular de macrófagos oriundos de murinos. O tratamento com 17 β -estradiol, mas não de progesterona, elevou significativamente os níveis de LBP no soro e aumentou a expressão de TLR4 e CD14 na superfície celular dos macrófagos desses animais. Além disso, estes efeitos correspondem com o significativo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias após a administração de LPS e um marcado aumento na morbidade associada à endotoxina. No conjunto, os autores sugerem que esses dados fornecem um potencial mecanismo para explicação do efeito do estrógeno na otimização da resposta imune (RETTEW et al., 2009).

No que se refere ao pulmão, Card et al. (2006) avaliaram a expressão de TLR4 no tecido pulmonar de camundongos machos e fêmeas e mostraram que não houve diferença entre os gêneros, seja antes ou após a exposição dos animais ao LPS. No entanto, Quintar et al. (2006) demonstraram que a expressão de TLR4 na próstata de ratos castrados é elevada. Além disso, estudos sugerem que a testosterona é capaz de reduzir a expressão de TLR4 em cultura primária de macrófagos e monócitos (RETTEW et al., 2008). Nesse sentido, outros trabalhos revelam que fagócitos de homens, estimulados com LPS, expressam altos níveis de mRNA para TNF- α e IL-10 quando em comparação aos fagócitos de mulheres, sugerindo elevada expressão de TLR4 em homens (TEMPLE et al., 2008).

À luz dessas evidências, os dados apresentados na literatura sugerem forte participação dos HSF na imunidade inata, que interferem na resposta inflamatória e altera a homeostasia.

Todavia, os dados acerca do papel desses hormônios sobre a inflamação pulmonar aguda e reatividade das vias aéreas induzida diretamente LPS ainda não são conclusivos.

1.6 Modelo experimental e justificativa do estudo

A SDRA é complexa; modelos animais têm contribuído sobremaneira para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença, bem como no desenvolvimento de novos enfoques para tratamento. Idealmente, estudos experimentais deveriam ser baseados na etiologia da doença e refletir todos os critérios clínicos encontrados em humanos, entretanto, dificilmente reproduzem as características em total equivalência. Por exemplo, em roedores, a avaliação da pressão do capilar pulmonar e análise de radiografias torácicas (amplamente utilizada em humanos) são técnicas pouco usuais e difíceis em animais (REISS; UHLIG, 2012). Nesse contexto, a *American Toracic Society* (ATS) recentemente lançou uma declaração oficial na definição de modelos animais para SDRA. Nesse documento, os autores definem que o diagnóstico deve ser baseado em quatro evidências com início agudo: 1) análise histopatológica, 2) avaliação da permeabilidade e da 3) inflamação e 4) disfunção fisiológica pulmonar (MATUTTE-BELLO et al., 2011). Quando bem compreendidas as características do experimento e os resultados interpretados dentro dos limites que o modelo oferece, poderão fornecer informações precisas e elementos chaves para melhor compreensão da LPA/SDRA em humanos.

Modelos experimentais de SDRA de origem direta geralmente são baseados em insultos biológicos (por exemplo instilação de LPS), químicos (e.g. instilação de ácidos) ou mecânicos (como LPIV) (MATUTE-BELLO et al., 2008; REISS; UHLIG, 2012) e o envolvimento dos HSF nestes processos podem ser avaliados por meio da remoção dos esteróides endógenos e tratamentos. Considerando que os estudos conduzidos até o momento no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental convergem para a percepção de que HSF atuem como moduladores da inflamação pulmonar alérgica e, recentemente, da inflamação pulmonar indireta induzida pela I/R intestinal, estudos acerca de seu envolvimento na inflamação pulmonar direta revestem-se de interesse. O presente estudo se insere no campo da modulação hormonal do sistema imune e poderá fornecer subsídios para melhor compreensão dos mecanismos que medeiam a SDRA. A hipótese que se lança é que os HSF modulem a inflamação pulmonar aguda promovendo proteção contra os efeitos deletérios da inflamação.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o envolvimento dos HSF na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após 4 e 24 h da instilação nasal de LPS em camundongos fêmeas.

2.2 *Objetivos específicos*

Investigar os efeitos da OVx sobre a inflamação pulmonar e a reatividade das vias aéreas após a instilação nasal de LPS, por meio:

- a) da mobilização de leucócitos para o pulmão, pela contagem total e diferencial das células presentes no LBA, compartimento sanguíneo e lavado medular;
- b) da permeabilidade microvascular pulmonar, pelo extravasamento do corante AE;
- c) do infiltrado de neutrófilos no parênquima pulmonar, pela atividade da enzima MPO pulmonar;
- d) da avaliação morfológica e de migração leucocitária, pela análise histológica de seguimentos pulmonares;
- e) da quantificação de mediadores da inflamação, tais como IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, MIP-2, KC e nitritos, em sobrenadante de cultura de tecido pulmonar;
- f) da expressão gênica de TLR4 e NF- κ B no tecido pulmonar;
- g) da reatividade de anéis de traquéia isolados em resposta às doses de MCh;
- h) da mecânica (resistência e elastância) pulmonar frente aos estímulos colinérgicos;

Nos parâmetros do item 2.2.1 em que os resultados apontaram alterações potencialmente mediadas pela remoção dos esteróides sexuais endógenos, objetivou-se avaliar o efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona, previamente ao LPS, em animais OVx.

Avaliar o possível envolvimento do NO, tanto na reatividade dos anéis de traquéia isolados como na mecânica pulmonar, por meio do tratamento com L-NAME ou aminoguanidina previamente ao LPS em animais OVx.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Todos os experimentos tiveram início de manhã, entre 07h00min - 09h00min.

Figura 5 - Delineamento experimental proposto para o estudo

Os animais foram submetidos à cirurgia para OVx ou Sham. Após 7 dias do procedimento cirúrgico, foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina para os controles) e, decorrido o tempo desejado de estudo (4 e 24 horas), foram realizados os experimentos.

3.1.1 Identificação dos grupos de estudo

- **OVx**: submetidos à ovariectomia e instilação nasal de salina apirogênica;
- **Sham**: falso-operado: submetidos à manipulação cirúrgica sem OVx e instilação nasal de salina apirogênica;
- **OVx+LPS**: submetidos à OVx e posteriormente submetidos à instilação nasal de LPS;
- **Sham+LPS**: submetidos à manipulação cirúrgica sem OVx e posteriormente à instilação nasal de LPS.

3.1.2 Tratamentos farmacológicos

Figura 6 - Delineamento experimental proposto para o tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona

Sete dias após a OVx, os animais foram submetidos ao tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona. Decorridas 12 horas, foi realizada a instilação nasal de LPS. Após 24 horas foram realizados os experimentos.

Figura 7 - Delineamento experimental utilizado para o tratamento farmacológico com L-NAME ou aminoguanidina

Decorridos 7 dias da OVx, foram realizados os tratamentos farmacológicos com L-NAME ou aminoguanidina. Após 1 hora, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS e, após 24 horas, os experimentos foram conduzidos.

3.1.3 Grupos experimentais dos animais submetidos ao tratamento farmacológico

- **OVx+17 β -estradiol+LPS:** animais OVx tratados com 17 β -estradiol e submetidos à instilação nasal de LPS.
- **OVx+Progesterona+LPS:** os animais OVx submetidos ao tratamento com progesterona e posteriormente à instilação nasal de LPS.
- **OVx+L-NAME+LPS:** animais OVx tratados com L-NAME e submetidos à instilação nasal de LPS.
- **OVx+Aminoguanidina+LPS:** após a OVx, os animais foram submetidos ao tratamento com aminoguanidina e posterior instilação nasal de LPS.

3.2 Preparação dos animais

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, adultos, com idade entre 45-60 dias e peso entre 18-22g, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiola-moradia de polipropileno, medindo 30 x 19 x 13 cm, forradas com maravalha (esterilizada e livre de resíduos), alojadas em estante e manteve sempre a mesma localização. Os animais foram mantidos em sala com aeração, exaustão, umidade entre 50% - 60% e temperatura de 22 °C $\pm$ 2, controlados automaticamente por um ar condicionado central, em ciclo claro-escuro de 12 horas (início da luz às 07h00min), com livre acesso a água filtrada e ração comercial para roedores *ad libitum* (Nuvilab[®] CR-1, composta por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato

de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico-mineral e de aminoácidos). Os estudos realizados nesta tese estão de acordo com os preceitos éticos de uso de animais em experimentação científica estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP (nº 113, folha 75, livro 02).

3.2.2 OVx

Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, 5% de isoflurano em 50% de oxigênio) por via inalatória utilizando anestesiador para pequenos animais (*Vaporizer for isoflurane anesthetic, model 100 vaporizer - SurgiVet*). Foi realizada assepsia da parede abdominal com álcool iodado (3%), e a laparotomia mediana. Após a identificação dos ovários foi realizada a ligadura de seus pedúnculos e em seguida a ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi fechada em dois planos com sutura contínua de fio de nylon 4.0. Como controle, foram utilizados camundongos fêmeas igualmente manipulados sem, entretanto, haver a ressecção do tecido ovariano (Sham). Após a cirurgia foi administrado tramadol (Pfizer, 5 mg/kg, i.p.) para a analgesia e pentabiótico (Fort Dodge, 540 mg/kg, i.m.). Após a cirurgia o tratamento com analgésico foi mantido por três dias consecutivos com paracetamol na água de beber (Medley, 0,53 mg/ml, v.o.)

3.2.3 Validação da eficácia da OVx

3.2.3.1 Análise das células presentes no lavado vaginal (LV)

Antes da indução da inflamação pulmonar aguda foi realizada a análise do padrão morfológico das células presentes no LV dos animais OVx. Para tanto, com o auxílio de um conta-gotas, solução *phosphate buffered saline* (PBS) foi introduzida na vagina e o LV retirado. As amostras foram colocadas sobre lâmina de vidro e a seguir diluídas em 5 µl de corante azul de metileno (5%) e então observadas em microscópio óptico. Esta análise foi critério para exclusão; somente fêmeas OVx em diestro foram incluídas no estudo.

3.2.3.2 Determinação da massa uterina

Os animais foram anestesiados profundamente com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.), submetidos à eutanásia por dessangramento pela secção da aorta abdominal, o útero foi removido e seu peso determinado. O sucesso da OVx foi confirmado

pela detecção da redução da massa uterina quando comparada à dos animais com ovários intactos (Sham).

Os animais OVx que receberam tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona também foram submetidos ao procedimento de determinação da massa uterina.

3.2.3.3 Dosagem dos níveis séricos de 17 β -estradiol e progesterona

Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.), a cavidade abdominal exposta e, seccionada aorta abdominal, sangue foi coletado. As amostras foram mantidas em geladeira por 4 horas para coagulação e então centrifugadas para obtenção dos soros, que foram acondicionados em freezer -80 °C até a análise. Para a quantificação dos níveis hormonais, as amostras foram descongeladas e as dosagens foram realizadas por radioimunoensaio com a utilização do kit comercial *Coat-a-Count* (DPC, Los Angeles, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/ml para o 17 β -estradiol e ng/ml para a progesterona.

Os níveis séricos hormonais dos animais que receberam tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona também foram avaliados em dois momentos distintos: tanto no momento da instilação nasal de LPS (12 horas após a administração do fármaco) quanto no momento da eutanásia para realização do experimento (24 horas após a instilação nasal de LPS, i.e. 36 horas após a administração do fármaco).

3.2.4 Indução da inflamação pulmonar aguda pela instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias do procedimento cirúrgico (OVx ou Sham), os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS. A escolha de 7 dias baseia-se nos estudos de Ligeiro de Oliveira et al. (2004), que demonstraram que nesse período de OVx os níveis circulantes de hormônios sexuais femininos reduziram de forma significativa, o que foi acompanhado pela redução da massa uterina e de um esfregaço vaginal compatível com a fase de diestro. Para tanto, os camundongos fêmeas foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, i.p.). O LPS (*Lipopolysaccharide from Salmonella abortus equi*, L6636, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi instilado por via nasal, diluído em salina estéril, em temperatura ambiente (100 μ g/ml, 1 μ l/g). A concentração e via de administração do LPS foram baseadas em Corteling et al. (2002). Decorrido o tempo desejado de estudo (4 e 24 horas) os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento pela secção da artéria aorta abdominal e os experimentos foram conduzidos (Figura 5). Como controle, foram utilizados animais

submetidos à instilação nasal de salina apirogênica (0,9% NaCl) nos mesmos volumes utilizados para o LPS.

3.2.5 *Tratamentos farmacológicos*

Decorridos 7 dias da OVx, os animais foram submetidos aos tratamentos farmacológicos. Tanto o 17β -estradiol (280 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) quanto a progesterona (200 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) foram administrados em dose única, 12 horas antes da instilação nasal de LPS (Figura 6); os tratamentos foram baseados nos estudos de De Oliveira et al. (2010).

O L-NAME (30 mg/kg, i.p.) ou a aminoguanidina (50 mg/kg, i.p.) foram administrados em dose única, 1 hora antes da instilação nasal de LPS (Figura 7); nos apoiamos nos estudos de Lino dos Santos Franco et al. (2013) e Breithaupt-Faloppa et al. (2009), respectivamente. Após 24 horas da instilação nasal de LPS os experimentos foram realizados.

3.2.5.1 *Fármacos utilizados*

- β -estradiol (*1,3,5[10]-Estratriene-3,17 β -diol* - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): diluído em óleo de milho.
- Progesterone (*4-Pregnene-3,20-dione* - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): diluída em óleo de milho.
- L-NAME (*N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride* - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): diluído em água destilada.
- Aminoguanidine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): diluída em água destilada.

3.3 *Quantificação de células totais e diferenciais*

Decorrido o tempo desejado de estudo (4 e 24 h) após a instilação nasal de LPS (ou salina apirogênica para os controles), os animais foram anestesiados profundamente com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.), a cavidade abdominal foi exposta e a secção da aorta abdominal foi realizada para dessangramento e eutanásia do animal.

3.3.1 *Determinação e avaliação do número de células presentes no LBA*

O LBA foi realizado como descrito em Riffo-Vasquez et al. (2007). Após a eutanásia, foi realizada uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral e a traquéia foi exposta e canulada com o auxílio de uma cânula metálica de 18 Gauge, fixada com fio de algodão ao redor da traquéia. A cânula foi acoplada a uma seringa contendo 0,8 ml de PBS que foi injetado no espaço alveolar e coletado em seguida em um tubo eppendorf. Após este procedimento, mais 0,7 ml de PBS foi injetado e coletado, totalizando o volume de cerca de 1,5 ml de LBA. O LBA obtido foi centrifugado por 3 min a 1.500 rpm, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em 1 ml de PBS. A contagem do número total de células foi realizada na câmara de Neubauer e a contagem diferencial foi feita por microscopia óptica comum e contadas no mínimo 100 células, diferenciando-as segundo o tipo celular (mononucleares (macrófagos e linfócitos) e neutrófilos). Para a contagem total, alíquotas da amostra de LBA (90 µl) foram acrescidas de 10 µl de cristal violeta 0,2% dissolvido em ácido acético (30%). Então, 10 µl deste material foi colocado na câmara de Neubauer para determinação do número total de células. Para a quantificação diferencial das células, alíquotas da amostra (200 µl) foram colocadas em citocentrífuga Cytospin® (Fanem) e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min. As lâminas obtidas foram coradas utilizando-se o kit de corantes Instant Prov (Neuprov®) (solução de ciclohexadienos a 0,1%, solução de azobenzenosulfônicos a 0,1% e solução de fenotiazinas a 0,1%). A contagem diferencial foi realizada em microscopia óptica comum a partir da análise de campos aleatórios na lâmina quantificando-se 100 células. Para obtenção do número absoluto de cada população celular no LBA, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células.

3.3.2 Quantificação e avaliação do número de leucócitos circulantes

Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal após a eutanásia dos animais. Para a contagem total, foi utilizada uma pipeta automática e coletados 10 µl da amostra de sangue acrescidas de 190 µl de líquido de Türk a 3%. Para contagem diferencial dos leucócitos circulantes (células mononucleares (monócitos e linfócitos) e neutrófilos) foi realizado o esfregaço de sangue em lâmina de vidro e coradas utilizando-se o kit de corantes Instant Prov (Neuprov®); a seguir, as lâminas foram analisadas quantificando-se 100 células em campos aleatórios por microscopia óptica comum. Para obtenção do número absoluto de cada população celular de leucócitos circulantes, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas.

3.3.3 Quantificação do número total de células da medula óssea

Após a eutanásia, o fêmur esquerdo foi cirurgicamente removido, ambas as extremidades foram abertas e o canal medular foi perfundido a partir da extremidade distal, pela introdução de uma agulha (26 Gauge x ½”) acoplada à uma seringa plástica contendo 1 ml de PBS. A suspensão medular foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta de 1000 µl, 90 µl dessa amostra foi acrescida de 10 µl de cristal violeta (0,2%) seguido de uma segunda diluição de 1:10 em PBS, e a seguir as células totais foram contadas em câmara de Neubauer.

3.4 Regiões pulmonares utilizadas no estudo

A figura 8 ilustra as regiões pulmonares que foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir. Para obtenção das amostras de tecido, os animais foram anestesiados profundamente com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, i.p.), submetidos à laparotomia mediana e uma secção da aorta abdominal foi realizada para dessangramento e eutanásia do animal. A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 5 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Então, os tecidos pulmonares foram obtidos.

Os lobos direitos (S, M, I) foram removidos por inteiro para os respectivos experimentos apontados pelas setas na figura 8. Na região superior e média do lobo esquerdo (E) foram obtidos 4 pequenos fragmentos para cultura pulmonar e subsequente avaliação da produção de mediadores inflamatórios; a parte inferior do lobo esquerdo foi ressecionada e utilizada para a avaliação histológica.

Figura 8 - Desenho esquemático da anatomia macroscópica de um pulmão de camundongo. As setas indicam as regiões pulmonares utilizadas nos experimentos

E = lobo esquerdo; S = lobo superior direito; M = lobo médio direito; I = lobo inferior direito; C = lobo cardíaco direito.
Fonte: modificado de RUIZ-JÚNIOR et al., 2004

3.4.1 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar

A quantificação da permeabilidade microvascular pulmonar foi realizada por meio da técnica de determinação da concentração do corante AE extravasado em fragmentos de parênquima pulmonar, baseada na metodologia descrita em Sirois et al. (1988). Para tanto, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina, 100 e 20 mg/kg, i.p.) e 25 mg/kg do corante foram injetados por via intravenosa, 20 min antes do tempo de estudo da inflamação induzida por LPS ser completado (4 e 24 h).

Após 20 min da administração do corante, os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento da aorta abdominal sob anestesia. A remoção do sangue intravascular foi realizada pela perfusão da artéria pulmonar com 5 ml PBS e a seguir o tecido pulmonar foi removido, limpo e pesado (ver Figura 8). O tecido pulmonar foi incubado em formamida (8 ml/g de peso tecidual) à temperatura ambiente por 24 horas. Terminado este tempo, a formamida foi coletada em eppendorf e mantida em geladeira até a análise. O tecido pulmonar foi acondicionado em estufa a 37 °C por 5 dias consecutivos, para determinação posterior de seu peso seco. A densidade óptica (DO) das amostras de AE extraído com formamida foi obtida em leitor de *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA) (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada com base em uma curva padrão de absorbância do corante. Os valores foram expressos em AE µg/g de peso seco de tecido.

3.4.2 Determinação da atividade da enzima MPO pulmonar

Decorrido o tempo desejado de estudo após a instilação nasal de LPS, o tecido pulmonar foi obtido (ver Figura 8). O tecido foi pesado e homogeneizado em 1 ml de tampão fosfato pH 6,0 contendo 0,5% de *hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (HTAB) e 5 mM de *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) em homogenizador tecidual (Medic Tools®) por 20 s. A seguir as amostras foram centrifugadas a 12.500 rpm durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO.

O ensaio da atividade da MPO pulmonar foi conduzido adicionando-se, em duplicata, 10 µl da amostra em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão substrato, contendo tampão fosfato pH 6,0, peróxido de hidrogênio (0,1%) e orto-dianisidina (1,25%). Decorridos 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de azida sódica (1%). A leitura da absorbância foi feita em leitor de ELISA (Bio-Tek

Instruments[®]) em comprimento de onda de 450 nm e os valores de absorbância expressos em atividade de MPO por mg de tecido.

3.4.3 *Análise histológica*

A análise histológica pulmonar foi baseada nos estudos de Kim et al. (2010) e Faller et al. (2012). A região inferior do lobo pulmonar esquerdo (Figura 8) foi removida, fixada em formol 10% por 24 horas e então transferida para o álcool 70% até o processamento. Foi emblocada em parafina e cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise. De cada amostra, foram obtidas quatro fotografias representativas (ampliação 200x). Cinco campos foram aleatoriamente designados para cada foto. Foi utilizado escore de lesão para determinar o grau de dano pulmonar, em que se avaliou: (a) a espessura das paredes dos alvéolos, (b) presença de células inflamatórias ou agregação de infiltração, (c) hemorragia e (d) congestão alveolar. Cada amostra foi avaliada e pontuada de acordo com a escala, em que 0 = danos mínimos ou ausentes, 1 = danos leves, 2 = danos moderados, 3 = danos severos e 4 = danos máximos. As amostras foram avaliadas por dois pesquisadores e o escore (grau) de lesão foi classificado pela soma das pontuações, que variou de 0 a 16. A média da soma de cada leitura foi comparada entre os grupos.

3.4.4 *Quantificação de mediadores da inflamação gerados pelo pulmão*

3.4.4.1 Explante pulmonar - Cultura de tecido pulmonar

O explante pulmonar foi realizado baseado em Proust et al. (2003). Quatro pequenos fragmentos de pulmão (figura 8) foram coletados 24 horas após a instilação nasal de LPS (ou salina apirogênica). Os fragmentos foram incubados em placas plásticas de 24 poços contendo 1 ml de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado com 1% de L-glutamina e gentamicina (10 µg/ml) a 37 °C em atmosfera úmida contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os fragmentos pulmonares foram cultivados por 24 horas. Então, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80 °C até a análise e os fragmentos pulmonares foram colocados em estufa para determinação do peso seco.

3.4.4.2 Quantificação das citocinas e quimiocinas no explante pulmonar

Os níveis de citocinas e quimiocinas geradas no pulmão foram mensurados em sobrenadante de fragmentos de tecido pulmonar (explante) por meio do sistema Bio-Plex. Foi utilizado o LUM000 Mouse Fluorokine MAP Base Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) para quantificação dos mediadores: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, MIP-2 e KC. O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante. Para tanto, 50 μ l do sobrenadante de cultura e 50 μ l de citocina recombinante como curva padrão, diluída previamente conforme instruções do manual, foram distribuídas em placa 96 poços com filtro. Em seguida foram adicionadas as esferas conjugadas com os anticorpos anti-citocinas. Após três horas de incubação em temperatura ambiente, a placa foi lavada com wash buffer, sendo então adicionado em cada poço o anticorpo biotinilado de detecção para cada citocina (biotin-antibody cocktail, R&D). Após incubação por mais uma hora, a placa foi novamente lavada e então foram adicionados 50 μ l de streptavidin conjugated, que se liga ao anticorpo biotinilado. Seguiu-se incubação por mais trinta min e três novas lavagens com wash buffer foram realizadas. A leitura foi realizada no Luminex 200, e os dados foram analisados utilizando o Bioplex Software Manager 6.0. Os valores obtidos na dosagem das citocinas/quimiocinas foi corrigido pelo peso seco dos fragmentos pulmonares, sendo expressos em pg/ml/tecido seco.

3.4.4.3 Quantificação de nitritos no explante pulmonar

A mensuração de nitritos foi determinada de acordo com o método de Griess. O ensaio foi realizado pela adição de 50 μ l de sobrenadante de cultura pulmonar (obtido no explante pulmonar - figura 8) em placas de 96 wells contendo o mesmo volume do reagente de Griess em temperatura ambiente por 10 min. A DO (540 nm) foi obtida utilizando leitor ELISA (Bio-Tek Instruments®) e os níveis de nitritos foram determinados utilizando curva padrão previamente estabelecida de NaNO₂ (0,2 - 200mM). Os valores foram expressos em mM/mg de peso seco dos fragmentos pulmonares cultivados no explante.

3.4.5 Análise de expressão gênica (PCR em tempo real)

3.4.5.1 Extração de RNA

Foi realizada por meio do kit para extração de RNA - RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE). Em cerca de 20 - 30 mg de tecido foram adicionados 350 µl da solução de lise RA1 (kit GE) e 3,5 µl de β-mercaptoetanol. As amostras foram lisadas mecanicamente por meio de pistilo autoclavado e RNase-free. Então, a mistura foi transferida para colunas de extração, seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. O processo consistiu basicamente em colocar as células em pequenas colunas de extração (adaptáveis a um eppendorf de 1,5 ml), estas reteram o RNA enquanto o mesmo foi lavado e purificado com uma sequência de reagentes. Na etapa final o reagente promoveu a liberação do RNA da coluna, que mantido em freezer -80 °C até o momento do uso.

3.4.5.2 Quantificação e determinação da integridade do RNA total (eletroforese e nanodrop)

Uma alíquota de 10 µl foi retirada para quantificação e verificação da integridade do RNA. A análise qualitativa foi realizada pela submissão das amostras a eletroforese em gel de agarose 1,5% diluída em TAE 1X (48,4 g de Tris base; 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 1L,4 ml de ácido acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000 ml), 60V, por 1,5 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 mg/ml em H₂O destilada) para a visualização das bandas 28S e 18S em luz UV. A correta identificação destas bandas indica a qualidade do RNA. A quantificação foi realizada pelo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (260/280 nm). Amostras numa faixa de 1,7 até 2,0 ng/µl indicaram baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa.

3.4.5.3 Transcrição Reversa

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA, o RNA total foi tratado com DNase I. Foi utilizado 1 µl de DNase I para tratar 4 µg/µl de RNAtotal. Os eppendorfs foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min, sendo adicionado 1 µl de EDTA (25 mM) para bloquear a ação da enzima e aquecidos por 10 min a 65 °C em banho seco seguido de resfriamento em banho de gelo. As amostras receberam 1 µL de Oligo DT; 1 µL de dNTPs (mix 10 mM - 2,5 mM de cada dNTP) e posteriormente foram incubadas a 65 °C por 5 min e resfriadas em gelo. Ainda no gelo foram adicionados a cada tudo 4 µL do buffer 5X (superscript II); 2 µl de DTT 1M; 1 µl de RNase OUT incubando-se por 2 min a 42 °C e resfriadas no gelo. Foi acrescido 1 µl da enzima de transcrição reversa superscript II, permanecendo em incubação a 42 °C, por

50 min e em seguida por 70 °C por 15 min e resfriados no gelo. Em seguida foi acrescido 1 µl da enzima RNase H (para eliminação de resíduos de RNA da amostra de cDNA), permanecendo por 20 min a 37 °C. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento da amplificação do cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela Invitrogen Life Technologies.

3.4.5.4 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Foi realizada em sistema de detecção StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA). Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados (Optical Tubes Applied Biosystems) 2 µl de cada produto de PCR (cerca de 10 ng de RNA total), tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 200 nM de dATP/dCTP/dGTP, 400µM dUTP, 200 nM dos primers (senso e antisenso), 100 nM das probes TaqMan, 0,01U/mL de AmpErase e 0.025 U/µl da DNA polimerase AmpliTaq Gold em um volume total de 50µl. Após completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas MicroAmp Optical (Applied Biosystems). Todas as reações foram corridas em duplicata. As condições de amplificação utilizadas para quase todos os genes foram: 2 min a 50 °C, 10 min à 95 °C; seguidos de 50 ciclos a 90 °C por 15 s para desnaturação da fita de cDNA e a 60 °C por 1 min para sua extensão. A interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito pelo método comparativo de Livak e Schmittgen (2001) em que a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados são expressos em porcentagem referente à expressão dos animais controle Sham que receberam salina apirogênica.

3.4.5.5. Assays (Primers)

Para o gene TLR4, o Assay ID utilizado foi Mm00445273_m1; para o NF-κB1, o Mm256765_m1e para o 18S (controle endógeno), o 4352930E. Todos Assays foram adquiridos da empresa Applied Biosystems.

3.5 Estudo da reatividade das vias aéreas

3.5.1 Avaliação da reatividade de segmentos isolados de traquéia in vitro

3.5.1.1 Obtenção dos segmentos de traquéia

Decorrido o tempo desejado de estudo (4 e 24 h) após a instilação nasal de LPS (ou salina apirogênica para os controles), os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina, 100 e 20 mg/kg, i.p.), a cavidade peritoneal exposta e submetidos à eutanásia por dessangramento pela secção da aorta abdominal. A seguir o tórax foi aberto e a traquéia cuidadosamente removida, dissecada (retirados os tecidos adjacentes) e um segmento de cerca de 2 mm de traquéia foi obtido. Cuidado adicional foi tomado para que as localizações dos segmentos de traquéia obtidos fossem parecidas em todos os animais.

3.5.1.2 Avaliação da reatividade de traquéia

Baseada na descrição de Coelho et al. (2007), os segmentos de tecido traqueal foram montados para registro isométrico das contrações. Com o auxílio de dois ganchos de aço que serviram de apoio para os segmentos de traquéia, o tecido foi colocado em cuba de vidro para órgão isolado contendo 15 ml solução de *Krebs-Henseleit solution* (KHS) composta de (mM): NaCl 115,0; KCl 4,6; CaCl₂·2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0. A solução KHS foi continuamente gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio) e mantida aquecida a 37 °C. Os segmentos de traquéia foram expostos a uma carga inicial de 500 mg de tensão. O tecido permaneceu em repouso nesta tensão por um período de 40 min para a estabilização. Durante este período de tempo a solução de KHS foi trocada a cada 15 min. Terminado o tempo da estabilização, a tensão foi reajustada para 500 mg e a capacidade contrátil dos segmentos de traquéia (viabilidade tecidual) foi avaliada substituindo o tampão KHS por tampão KCl despolarizante (60mM). Após a avaliação da viabilidade das preparações, o KCl foi novamente substituído pelo tampão KHS. Decorridos mais 20 min de equilíbrio, foram administradas nas cubas doses crescentes logarítmicas (10⁻⁷ a 10⁻³ M) de MCh (*acetyl-β-methylcholine chloride* - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) para construção das curvas concentração-efeito cumulativas. Os dados foram capturados por transdutores isométricos (F-60, Mulrany) acoplados ao sistema PowerLab 4sp e posteriormente analisados utilizando o programa LabChart 7.0.3, 2009 (AD Instruments®, Austrália). Após o experimento, o peso dos seguimentos de traquéia foram determinados para a correção dos dados, que foram expressos em tensão g/100 mg de tecido.

Figura 9 - Fotografias do aparelho utilizado para avaliação da reatividade da traquéia

Na imagem superior pode ser observada todos os componentes do equipamento utilizado na avaliação da reatividade traqueal. Nas inferiores pode-se observar o transdutor isométrico com os ganchos utilizados e o segmento de traquéia dentro da cuba.

Fonte: arquivo próprio.

3.5.2 Avaliação da mecânica pulmonar *in vivo*

O aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ®, Montreal, Quebec, Canadá) avalia o sistema respiratório por meio da utilização de dois modelos matemáticos, conhecidos como 1) unicompartimental e 2) modelo de fase constante.

No modelo unicompartimental o sistema respiratório é considerado como um todo. Não há separação de vias aéreas e parênquima pulmonar. Os dados gerados são obtidos por meio da equação do movimento (BATES, 1998):

$$P = R_{RS} \cdot V' + E_{RS} \cdot V + P_0$$

onde P é a pressão na entrada das vias aéreas, R_{RS} é a resistência do sistema respiratório, V' é o fluxo calculado pela derivada do volume, E_{RS} é a elastância pulmonar, V é o volume e P_0 a

constante de correção de erros da capacidade residual funcional (CRF). Os parâmetros avaliados por este modelo foram a resistência do sistema respiratório (R_{RS}) e a elastância pulmonar (E_{RS}).

No modelo de fase constante, o sistema respiratório é considerado como multicompartimental, pelo qual se avalia as vias aéreas (traquéia e brônquios) separadamente do parênquima pulmonar. Neste modelo é utilizada a equação de Hantos (HANTOS et al., 1992):

$$Z_{rs}(f) = R_N + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

onde $Z_{rs}(f)$ é a impedância da via aérea em função da frequência, R_N é a resistência das vias aéreas, i é a unidade imaginária, f é a frequência, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G caracteriza a dissipação de energia no tecido pulmonar, H caracteriza a energia acumulada no tecido pulmonar e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$$

onde $\arctan$ é o arco tangente. Os parâmetros avaliados por este modelo foram a resistência somente das vias aéreas (R_N), a resistência do parênquima pulmonar (G) e a elastância do parênquima pulmonar (H).

Em ambos os modelos matemáticos há o controle de um *Coefficient Of Determination* (COD), que refere-se à um ajuste do modelo matemático. O COD avalia se o modelo foi aplicado corretamente; é dado na forma numérica, COD com valor de 1,0 representa uma concordância de 100% entre os dados obtidos experimentalmente e o ajuste na aplicação do modelo matemático. Quando o COD assume valor baixo, os dados gerados são acusados como “inválidos”. No modelo unicompartimental o valor mínimo do COD é 0,95 e para o modelo de fase constante é 0,90. Todos os dados gerados em nossos experimentos referem-se somente aos CODs válidos (superiores aos valores mínimos aceitáveis para cada modelo).

Concentrações de MCh são utilizadas para a avaliação da mecânica pulmonar. Pode ser oferecida para o animal tanto na forma nebulizada (diretamente nas vias aéreas) como via i.v. Neste trabalho foram realizadas as duas técnicas, descritas a seguir.

3.5.2.1 Anestesia e traqueostomia dos animais

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após completa anestesia, foi realizada a traqueostomia por uma incisão

longitudinal na região cérvico-ventral, em que a traquéia foi exposta e uma cânula metálica (18 G) foi introduzida no orifício da traqueostomia e fixada ao redor da traquéia com fio de algodão. Então, os animais foram conectados por meio da cânula ao flexiVent.

Para o estudo que foi utilizada MCh i.v. também foi realizada uma incisão na região lateral cervical direita e a veia jugular foi exposta para posterior canulação.

3.5.2.2 Avaliação da mecânica pulmonar - MCh via inalatória

Nos baseamos na metodologia descrita em Collins et al. (2003) com modificações. Os animais foram submetidos à ventilação pulmonar com volume corrente a 10 ml/kg e FR de 450 ciclos/minuto. A PEEP foi mantida em 3 cmH₂O, conectada à válvula expiratória do ventilador. Logo após o início da ventilação mecânica, os animais foram submetidos a manobras de recrutamento pulmonar, i.e, os pulmões foram insuflados a partir da CRF até uma pressão de 30 cmH₂O e mantidos nessa pressão por 3 s, a fim de homogeneizar todo o histórico pulmonar e aerar possíveis regiões atelectasiadas e então permaneceram por 5 min para estabilização. Foi avaliada a responsividade pulmonar do animal às duas concentrações de MCh (50 e 100 mg/ml de MCh diluídas em PBS) que foram oferecidas na forma de aerossol pela traquéia do animal durante 10 s, por um nebulizador por micro-bombeamento (Aeroneb[®], Aerogen). Como controle foi utilizado somente o PBS, antes da administração de MCh. A coleta dos dados para ambos os modelos matemáticos tiveram início 15 s após o término da nebulização de cada concentração de MCh, de 30 em 30 s, durante 5 min. Entre cada concentração houve o intervalo de 5 min. Os dados apresentados referem-se à média de resposta máxima de R_{RS} e E_{RS} à cada concentração de MCh.

Figura 10 - Fotografias do flexiVent com nebulizador para protocolo de MCh via inalatória

Fotografias do flexiVent com sistema de nebulização (Aeroneb[®]). Por meio da cânula o animal é acoplado ao aparelho.
Fonte: arquivo próprio.

3.5.2.3 Avaliação da mecânica pulmonar - MCh via i.v.

O protocolo foi de acordo com Ferreira et al. (2012), com modificações. Os animais foram submetidos à ventilação pulmonar com volume corrente a 12 ml/kg e FR de 150 ciclos/minuto. A PEEP foi de 3 cmH₂O. Logo após o início da ventilação mecânica, foi administrado bloqueador muscular (brometo de pancurônio, 1,0 mg/kg, i.p.) e em seguida a veia jugular foi canulada para posterior infusão de MCh. Os animais foram submetidos à três manobras consecutivas de recrutamento pulmonar (30 cmH₂O por 3 s) e 5 min subsequentes para estabilização. Foi avaliada a responsividade pulmonar do animal às três concentrações de MCh (8, 16 e 32 µg/kg) que foram oferecidas sob infusão em bolus na veia jugular por meio de uma seringa de 1 ml, contendo solução de MCh diluída em PBS na concentração de 200 µg/ml. Como controle foi utilizado somente o PBS (8 µg/kg), antes da MCh. A coleta dos dados para ambos os modelos matemáticos tiveram início 5 s após a infusão de cada concentração, de 30 em 30 s, durante 5 min. Entre cada concentração de MCh houve o intervalo de 5 min. Os dados apresentados referem-se à resposta máxima de R_{RS} , E_{RS} , R_N , G e H à cada concentração. Uma lâmpada posicionada sobre o animal serviu para mantê-lo aquecido durante todo o experimento; a região dos olhos, da traqueostomia e da veia jugular foram cobertas com gaze úmida para proteção. Antes do início de cada experimento, a seringa utilizada para infusão de MCh foi lavada com heparina sódica (5.000 UI, Cristália) para evitar coagulação no momento da infusão.

Figura 11 - Fotografias do flexiVent para protocolo de MCh via i.v. e aquisição de dados

Pode ser observada a fotografias do flexiVent sem sistema de nebulização para protocolo de MCh i.v. Ao lado, a imagem do sistema de captura dos dados.

Fonte: arquivo próprio.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos foram tabulados e receberam tratamento estatístico por meio do programa GraphPad Prism Software versão 5.03. Foi utilizada a Análise de Variância (One-Way ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Foi utilizado o teste “t” de Student para análise dos dados não pareados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

É importante ressaltar que em todos os experimentos apresentados neste trabalho foi incluído um grupo denominado **Basal**, que constitui-se de animais naïve, sem qualquer manipulação prévia. Entretanto, em todas as avaliações realizadas, os resultados obtidos desses animais não diferiu dos controles do LPS (OVx e Sham submetidos à instilação nasal de salina apirogênica). Confirmada ausência do efeito da incisão na falsa OVx (Sham), os dados não são mostrados.

4.1 Efeito da OVx sobre a massa uterina, níveis séricos hormonais e ciclo estral

A Figura 12(A) mostra os valores obtidos da quantificação da massa uterina de camundongos fêmeas 7 dias após a OVx. Como pode ser observado, a massa uterina dos animais OVx reduziu significativamente em relação à dos animais do grupo Sham. Em relação às concentrações séricas hormonais, a OVx promoveu redução tanto dos níveis de 17 β -estradiol (Figura 12B) quanto de progesterona (Figura 12C) em relação ao grupo Sham.

Paralelamente, foi analisada a morfologia das células presentes no LV desses animais. Nas fotomicrografias a seguir (Figura 13A-D) observamos as características das células encontradas no LV em cada fase do ciclo estral dos animais com ovários intactos e 7 dias após a OVx (Figura 13E). No proestro (13A) o LV é composto por células nucleadas. No estro (13B) observamos a presença de células epiteliais anucleadas. Já no metaestro (13C) há uma mescla de células anucleadas, nucleadas e leucócitos. Na fase de diestro (13D) encontramos basicamente leucócitos. Por fim, a fotomicrografia do LV de um animal após 7 dias da OVx (13E), que culminou com a indução e manutenção da fase de diestro, onde há predomínio de leucócitos, caracterizado pela reduzida concentração de HSF circulantes.

Figura 12 - Determinação da massa uterina (A) e dos níveis séricos de 17β -estradiol (B) e progesterona (C) após a remoção dos ovários

Os animais foram submetidos à cirurgia para OVx ou falsa operação (Sham). Após 7 dias do procedimento cirúrgico, foram submetidos à instilação nasal de LPS e após 24 h submetidos à eutanásia, o útero foi retirado e o seu peso determinado. Amostras de sangue foram coletadas para obtenção do soro para dosagem hormonal. (A) refere-se à massa uterina, (B) aos níveis séricos de 17β -estradiol e (C) aos níveis séricos de progesterona. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados mostram média $\pm$ E.P.M. do número de animais representados em cada barra. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Sham.

Figura 13 - Fotomicrografias das fases do ciclo estral de um camundongos fêmeas com ovários intactos (A-D) e de um animal 7 dias após a OVx (E)

Nas imagens de A-D observamos as características morfológicas das células do LV em cada fase do ciclo estral dos animais com ovários intactos. Em (A) proestro, caracterizado pelo predomínio de células nucleadas; em (B) estro, caracterizado pelo predomínio de células anucleadas; em (C) metaestro, caracterizado por diferentes tipos celulares e em (D) diestro, fase em que são encontrados apenas leucócitos. Em (E) está representada a fotomicrografia do LV de um animal 7 dias após a OVx, que culminou na indução e manutenção da fase de diestro, onde há predominância de leucócitos. As células foram coradas com azul de metileno (5%) e analisadas em microscópio óptico comum. Ampliação 400x.

4.2 Número de células presentes no LBA 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

De maneira a caracterizar a inflamação pulmonar aguda após a instilação nasal de LPS em camundongos fêmeas, determinamos o número de células recuperadas no LBA. A análise da contagem total das células 4 h após o LPS (Figura 14A) revelou que não houve alteração entre os grupos experimentais estudados. Todavia, após 24 h (Figura 14D), o LPS promoveu aumento significativo da celularidade total nos animais OVx+LPS em relação aos Sham+LPS. A análise também mostrou aumento do total de células nos grupos OVx+LPS e Sham+LPS em relação aos seus controles tratados com salina.

Quanto à análise diferencial, em relação aos neutrófilos, após 4 h da instilação nasal de LPS (Figura 14B) houve aumento significativo tanto no grupo OVx+LPS quanto no Sham+LPS em comparação aos seus respectivos controles que receberam salina; entretanto, a análise não apontou alteração entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS. O número de neutrófilos 24 horas após o LPS (Figura 14E) apresentou aumento significativo no grupo OVx+LPS em relação ao Sham+LPS; ainda, o aumento de neutrófilos 24 h após o LPS no LBA, em ambos os grupos, foi maior que àqueles encontrados em seus respectivos controles.

Assim como os neutrófilos, o número de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) aumentou nos animais OVx+LPS e Sham+LPS em comparação aos seus controles após 4 horas da instilação de LPS (Figura 14C); não houve diferença entre OVx+LPS e Sham+LPS. Após 24 horas do LPS, o número de células mononucleares aumentou nos animais OVx+LPS em comparação aos Sham+LPS (Figura 14F) e aos seus controles tratados com salina. A ANOVA também revelou aumento no grupo Sham+LPS em relação ao seu controle.

Por fim, a análise apontou que a OVx não alterou o número de células totais e diferenciais recrutadas para o pulmão, tanto em 4 quanto em 24 horas, após a instilação nasal de salina.

Figura 14 - Efeito da OVx sobre o número de células recuperadas no LBA 4 (A-C) e 24 (D-F) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina para os controles). Após 4 (Figuras A-C) ou 24 (D-E) h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do LBA coletadas. (A) e (D) representam o número total de células no LBA, respectivamente 4 e 24 h após a instilação nasal; (B) e (E) mostram o número de neutrófilos, respectivamente 4 e 24 h após a instilação nasal e (D) e (F) referem-se ao número de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) no LBA, em 4 e 24 h após a instilação nasal. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. Δ p<0,05 em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # p<0,05 em comparação com o grupo OVx tratado com salina; * p<0,05 em comparação com o grupo Sham+LPS.

4.3 Número de células presentes no sangue 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

Uma vez que obtivemos resultados acerca da mobilização de células para o LBA, quantificamos o número de leucócitos circulantes. Os dados apresentados nas Figuras 15(A) e 15(D) referem-se ao total de células no compartimento sanguíneo após 4 e 24 horas da instilação nasal de LPS, respectivamente. A análise revelou que em ambos os tempos estudados após o LPS, o número de células não diferiu entre os grupos.

Em relação ao número de neutrófilos, tanto em 4 (Figura 15B) quanto em 24 (15E) horas após o LPS, houve aumento significativo nos animais OVx+LPS e Sham+LPS em relação aos seus controles; todavia, a quantidade de neutrófilos circulantes não diferiu entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS.

Ademais, pode-se observar que o número de células mononucleares (monócitos e linfócitos) circulantes, em ambos os tempos estudados após o LPS (Figuras 15C e 15F), não foi diferente entre os grupos.

Figura 15 - Efeito da OVx sobre o número de células no compartimento sanguíneo 4 (A-C) e 24 (D-F) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 (Figuras A-C) ou 24 (D-E) h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de sangue foram obtidas. (A) e (D) representam o número total de células circulantes, respectivamente 4 e 24 h após a instilação nasal; (B) e (E) mostram o número de neutrófilos no sangue, respectivamente 4 e 24 h após a instilação nasal e (D) e (F) referem-se ao número de células mononucleares (monócitos e linfócitos) circulantes, em 4 e 24 h após a instilação nasal. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais representados nas barras. Δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina.

4.4 Número de células presentes na medula óssea 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

O número de células totais presentes na medula óssea foi quantificado em amostras do lavado femoral dos animais após 4 (Figura 16A) e 24 (Figura 16B) horas a instilação nasal de LPS. A análise revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para ambos os tempos de ação do LPS.

Figura 16 - Efeito da OVx sobre o número de células totais encontradas na medula óssea 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do lavado femoral coletadas. As figuras 16(A) e 16(B) representam o número total de células presentes no lavado femoral, 4 e 24 h após a instilação nasal, respectivamente. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais representados nas barras.

4.5 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise da permeabilidade microvascular pulmonar após 4 horas (Figura 17A) da instilação nasal de LPS revelou aumento do corante AE extravasado do parênquima pulmonar nos animais OVx+LPS e Sham+LPS em relação aos seus controles. Contudo, não foi detectada diferença entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS. Os resultados decorrentes da avaliação após 24 horas de instilação nasal de LPS (Figura 17B) não apontaram diferença significativa entre os grupos experimentais estudados.

Figura 17 - Efeito da OVx sobre a permeabilidade microvascular pulmonar avaliada pelo extravasamento do corante AE 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram utilizadas para avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar. As figuras representam a quantificação do extravasamento do corante AE no pulmão dos animais 4 (Figura 17A) e 24 (Figura 17B) h após a instilação nasal de LPS. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos em cada barra. Δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; $\#$ $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina.

4.6 Atividade da enzima MPO no tecido pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

Os resultados da infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar, mensurado de forma indireta pela atividade da enzima MPO, após 4 horas (Figura 18A) da instilação nasal de LPS, revelaram significativo aumento tanto nos animais OVx+LPS quanto nos Sham+LPS em relação aos seus respectivos controles tratados com salina. Entretanto, a análise não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS.

Os dados relacionados à avaliação 24 h após o LPS (Figura 18B) demonstraram que o pulmão dos animais do grupo OVx+LPS tem atividade de MPO significativamente maior do que àquela encontrada no pulmão dos animais Sham+LPS. Adicionalmente, os grupos OVx+LPS e Sham+LPS apresentaram aumento significativo de MPO quando comparados aos seus controles.

Figura 18 - Efeito da OVx sobre a atividade da enzima MPO em homogenatos de pulmão 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram obtidas. As figuras representam a atividade de MPO no pulmão dos animais 4 (Figura 18A) e 24 (18B) h após a instilação nasal de LPS. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais mostrados em cada barra. Δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; $\#$ $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina; $*$ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS.

4.7 Avaliação da arquitetura pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

Os resultados do grau de lesão, avaliados em secções histológicas de pulmão no que se refere à espessura das paredes dos alvéolos, presença de células inflamatórias, hemorragia e congestão alveolar, mostraram que após 4 (Figura 19A) e 24 (Figura 19B) horas da instilação nasal de LPS aumentaram em comparação aos animais controles tratados com salina. Após 4 horas da instilação de LPS, a análise não apontou diferença significativa entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS; entretanto, após 24 horas, o grau de lesão pulmonar foi significativamente maior nos animais OVx+LPS em relação aos Sham+LPS. Por fim, após 4 ou 24 h da instilação nasal de salina, a ANOVA não apontou diferença entre os animais Sham e OVx.

Paralelamente, a figura 20 mostra a arquitetura pulmonar de um animal representativo de cada grupo experimental. Os painéis 20(A) e 20(B) mostram animais controles, respectivamente Sham e OVx, após 4 h da instilação nasal de salina apirogênica. 20(C) e 20(D) ilustram a arquitetura pulmonar de animais Sham e OVx, respectivamente, após 4 h da instilação nasal de LPS. As imagens 20(E) e 20(F) referem-se a Sham e OVx, respectivamente, após 24 h da instilação nasal de LPS.

Figura 19 - Efeito da OVx sobre o dano pulmonar avaliado em secções histológicas 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram seccionadas e coradas com HE. As figuras mostram os resultados da avaliação dos escores de lesão (espessura das paredes dos alvéolos, presença de células inflamatórias, hemorragia e congestão alveolar) 4 (Figura 19A) e 24 (19B) h após a instilação nasal de LPS. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais mostrados em cada barra. Δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS.

Figura 20 - Imagens representativas do efeito da OVx sobre a arquitetura pulmonar 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina para os controles). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram seccionadas e coradas com HE para análise. As imagens são representativas de um animal para cada grupo experimental. As figuras 20(A):Sham e 20(B):OVx referem-se a animais controles, após 4 h da instilação nasal de salina apirogênica. As figuras 20(C):Sham e 20(D):OVx ilustram a arquitetura pulmonar após 4 h da instilação nasal de LPS. As imagens 20(E):Sham e 20(F):OVx são representativas de animais 24 h após a instilação nasal de LPS. Ampliação 200x.

4.8 Avaliação da reatividade traqueal *in vitro* 4 e 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise dos dados 4 h após a instilação nasal de LPS (Figura 21A) revelou aumento significativo da reatividade traqueal *in vitro* frente a estímulo colinérgico tanto dos animais OVx+LPS quanto dos Sham+LPS em relação aos seus respectivos controles tratados com salina. Todavia, a análise não mostrou diferença entre os grupos OVx+LPS e Sham+LPS.

É importante ressaltar que os resultados obtidos 24 h após a instilação nasal de LPS (Figura 21B) mostraram redução da reatividade da traquéia dos animais OVx+LPS em relação aos Sham+LPS. Ainda, a análise apontou aumento significativo da reatividade dos animais Sham+LPS em relação aos seus controles tratados com salina.

Figura 21 - Efeito da OVx sobre a reatividade de anéis de traquéia 4 (A) e 24 (B) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e um segmento da traquéia foi utilizado para avaliação da reatividade *in vitro*. As figuras representam a reatividade traqueal 4 (Figura 21A) e 24 (21B) h após a instilação nasal de LPS. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais mostrados em cada legenda. δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS.

4.9 Avaliação da mecânica pulmonar (MCh via inalatória) após 4 e 24 h da instilação nasal de LPS

A análise da resposta máxima de resistência do sistema respiratório (R_{RS}) após 4 (Figura 22A) e 24 (Figura 22C) h da instilação nasal de LPS não apontou diferença significativa entre os grupos estudados. Do mesmo modo, os resultados obtidos da resposta máxima de elastância pulmonar (E_{RS}) 4 (Figura 22B) ou 24 (Figura 22D) h após o LPS não foram estatisticamente diferentes.

Figura 22 - Efeito da OVx sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via inalatória) 4 (A e B) e 24 (C e D) h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 4 ou 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica pulmonar no flexiVent frente à MCh oferecida por via inalatória. As figuras mostram a resposta máxima de R_{RS} 4 (Figura 22A) e 24 (22C) h após a instilação nasal de LPS e a resposta máxima de E_{RS} 4 (Figura 22B) e 24 (22D) h após o LPS. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas legendas.

4.10 Avaliação da mecânica pulmonar (MCh via i.v.) após 24 h da instilação nasal de LPS

Após 24h da instilação nasal de LPS, os resultados da mecânica pulmonar frente aos desafios com MCh i.v., obtidos por meio do modelo unicompartmental, tanto a resposta máxima de R_{RS} (Figura 23A) quanto de E_{RS} (Figura 23B), revelaram significativa redução nos animais OVX+LPS em comparação aos Sham+LPS. Entretanto, o grupo OVX+LPS não diferiu do seu controle tratado com salina. Ainda, os dados de R_{RS} e E_{RS} dos animais Sham+LPS mostraram significativa aumento em comparação aos controles Sham que receberam salina.

A análise dos resultados gerados por meio do modelo de fase constante, no que se refere à resistência das vias aéreas (R_N) (Figura 23C) e resistência do parênquima pulmonar (G) (Figura 23D), revelaram redução significativa dos animais OVX+LPS e comparação aos Sham+LPS. Ainda, houve aumento significativo tanto de R_N quanto de G no grupo Sham+LPS em relação aos seus controles tratados com salina. A ANOVA não apontou diferença significativa em relação à elastância do parênquima pulmonar (H) (Figura 23E) entre os grupos estudados.

Figura 23 - Efeito da OVx sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica pulmonar no flexiVent frente à MCh via i.v. As figuras mostram a resposta máxima de R_{RS} (Painel 23A), E_{RS} (23B), R_N (23C), G (23D) e H (23E). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas legendas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina.

4.11 Avaliação de mediadores da inflamação gerados no pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise dos resultados referentes à produção de mediadores da inflamação em sobrenadante de cultura pulmonar, 24 h após cultivo em estufa, revelou aumento significativo de IL-1 β (Figura 24A) nos animais OVx+LPS em comparação ao grupo Sham+LPS e ao seu grupo controle tratado com salina. Ainda, a instilação de LPS promoveu elevação desta citocina nos animais Sham+LPS em relação aos seus controles que receberam salina.

Quanto à quantificação de IL-6 (Figura 24B) a ANOVA revelou aumento tanto nos animais OVx+LPS quanto nos Sham+LPS em comparação aos seus respectivos controles que receberam salina. Todavia, não houve diferença significativa entre OVx+LPS e Sham+LPS.

A análise de TNF- α (Figura 24C) mostrou aumento significativo nos animais OVx+LPS comparados aos seus controles; entretanto, não diferiu do grupo Sham+LPS. Não foi observada alteração dos níveis de TNF- α nos animais Sham+LPS em relação ao seu grupo controle tratado com salina.

É interessante destacar que os níveis de IL-10 (Figura 24D) nos animais OVx+LPS encontraram-se reduzidos quando comparados aos animais Sham+LPS. Em contrapartida, foi detectada elevação em comparação aos seu grupo controle OVx que recebeu salina. Nos animais Sham+LPS foi detectado aumento significativo de IL-10 em relação ao seu respectivo grupo controle.

Os resultados da quantificação das quimiocinas MCP-1 (Figura 24E), MIP-2 (Figura 24F) e KC (Figura 24E) seguiram o mesmo padrão; foi observado níveis elevados tanto nos animais OVx+LPS quanto nos Sham+LPS em comparação aos seus respectivos controles que receberam salina. Porém, a análise não apontou diferença entre OVx+LPS e Sham+LPS.

Em todos os mediadores avaliados, a instilação nasal de salina não promoveu diferença significativa entre animais OVx e Sham.

Figura 24 - Efeito da OVx sobre o quantificação de mediadores da inflamação em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia, amostras de fragmentos pulmonares foram obtidos e cultivados em DMEM por 24 h em estufa. O painel (A) refere-se à quantificação de IL-1 β , (B) de IL-6, (C) de TNF- α , (D) de IL-10, (E) de MCP-1, (F) de MIP-2 e (G) de KC em sobrenadante de cultura pulmonar. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. Δ p<0,05 em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # p<0,05 em comparação com o grupo OVx tratado com salina; * p<0,05 em comparação com o grupo Sham+LPS.

4.12 Avaliação de nitritos gerados no pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS

Em relação à quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar, a ANOVA demonstrou aumento significativo no grupo OVx+LPS em comparação ao grupo Sham+LPS. Ainda, detectou aumento quando comparado ao seu grupo controle que recebeu salina. Não foi detectada diferença nos níveis obtidos do grupo Sham+LPS em relação ao seu grupo controle.

Figura 25 - Efeito da OVx sobre o quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia, amostras de fragmentos pulmonares foram obtidos e cultivados em DMEM por 24 h em estufa. Os resultados referem-se à quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS.

4.13 Avaliação da expressão gênica de TLR4 e NF- κ B no tecido pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise dos resultados da expressão gênica de TLR4 (Figura 26A) no tecido pulmonar não detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados.

No que se refere à expressão gênica de NF- κ B1 no pulmão a ANOVA apontou aumento significativo tanto nos animais OVx+LPS quanto nos Sham+LPS em comparação aos seus respectivos controles. Todavia, não foi encontrada diferença entre os animais OVx+LPS e Sham+LPS

Figura 26 - Efeito da OVx sobre a expressão gênica de TLR4 e NF- κ B1 no tecido pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Grupos experimentais consistiram de animais OVx e Sham. Decorridos 7 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS (ou salina). Após 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de pulmão foram obtidas. Os resultados referem-se à expressão gênica de (A) TLR4 e (B) NF- κ B1 no tecido pulmonar. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. Δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham que recebeu salina; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx tratado com salina.

Nos experimentos subsequentes, que referem-se ao efeito do tratamento farmacológico prévio ao LPS, foram conduzidos grupos controles. Consistiu de animais OVx que também receberam tratamento farmacológico previamente à instilação nasal de salina. Todavia, os resultados obtidos desses grupos não diferiu dos animais também OVx (e sem tratamento prévio) à instilação nasal de salina. Foi confirmada ausência do efeito *per se* dos fármacos. Nesse contexto, esses dados não são mostrados.

4.14 Avaliação do tratamento hormonal sobre a massa uterina e níveis séricos hormonais

Após 7 dias da OVx, animais foram tratados com 17 β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal, o peso do útero foi determinado. A Figura 27(A) mostra os valores obtidos da quantificação da massa uterina 36 h após do tratamento farmacológico (grupo OVx+17 β -estradiol 36 h). Como pode ser observado, o tratamento com 17 β -estradiol aumentou a massa uterina significativamente quando comparada à dos animais do OVx sem tratamento, atingindo valores compatíveis àqueles encontrados nos animais com ovários intactos. Em contrapartida, o tratamento de animais com progesterona (OVx+progesterona 36 h) não foi capaz de promover alteração significativa do peso do útero.

Em relação à dosagem hormonal, amostras de soro foram obtidas em dois momentos distintos: no momento da instilação nasal de LPS (i.e. após 12 h do tratamento farmacológico) e 24 h após a instilação nasal (36 h após o tratamento farmacológico). A Figura 27(B) mostra que após 12 h do tratamento farmacológico, os níveis de 17 β -estradiol aumentaram de forma exorbitante em relação aos animais não tratados; contudo, após 36 h do tratamento, os valores retornaram à valores menores, próximos àqueles encontrados nos animais Sham.

A análise dos níveis de progesterona (Figura 27C) também revelou aumento significativo após 12 h do tratamento farmacológico e, assim como o estradiol, valores menores foram encontrados após 36 h do tratamento.

Figura 27 - Determinação da massa uterina (A) e dos níveis séricos de 17β -estradiol (B) e progesterona (C) após tratamento farmacológico

Decorridos 7 dias da OVx, animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal, os animais foram submetidos à eutanásia, o útero foi retirado e o seu peso determinado. Amostras de sangue foram coletadas para obtenção do soro para dosagem hormonal em dois momentos distintos: no momento da instilação nasal de LPS (i.e. após 12 h do tratamento farmacológico) e 24 h após a instilação nasal (após 36 h do tratamento farmacológico). Um grupo Sham também foi avaliado. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx que não recebeu tratamento e em relação aos animais OVx tratados com hormônios 24 h antes da instilação nasal (i.e. após 36 h do tratamento).

4.15 Avaliação do tratamento hormonal sobre o número de células presentes no LBA 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise da contagem total de células 24 h após o LPS (Figura 28A) revelou que tanto o tratamento com 17β -estradiol quanto com progesterona, 12 h antes da instilação nasal de LPS, promoveu redução significativa da celularidade total em comparação aos animais OVx+LPS não tratados. É interessante notar que a quantidade de células dos grupos 17β -estradiol+OVx+LPS e progesterona+OVx+LPS atingiu valores próximos aos encontrados nos animais Sham+LPS.

Quanto à análise diferencial, em relação aos neutrófilos (Figura 28B) o fenômeno foi encontrado foi parecido com o da celularidade total. O tratamento com 17β -estradiol ou progesterona reduziu significativamente o número de neutrófilos no LBA em relação ao grupo OVx+LPS não tratado.

No que se refere à quantificação de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) apenas o tratamento prévio ao LPS com progesterona foi capaz de reduzir o número de células. A análise não apontou diferença significativa entre os animais 17β -estradiol+OVx+LPS e OVx+LPS.

Figura 28 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona sobre o número de células recuperadas no LBA 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do LBA foram obtidas. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. (A) representa o número total de células no LBA, (B) mostra o número de neutrófilos e (C) refere-se ao número de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) no LBA. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS.

4.16 Avaliação do tratamento hormonal sobre o número de células presentes no sangue 24 h após a instilação nasal de LPS

Os resultados da quantificação de células totais (Figura 29A), de neutrófilos (29B) e de células mononucleares (monócitos e linfócitos) (29C) circulantes, mostraram que os tratamentos com 17 β -estradiol ou progesterona não promoveram alterações significantes no número de células encontradas.

Figura 29 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o número de células no compartimento sanguíneo 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17 β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de sangue foram obtidas. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. (A) representa o número total de células circulantes, (B) mostra o número de neutrófilos no sangue e (C) refere-se ao número de células mononucleares (monócitos e linfócitos) circulantes. A legenda apresentada no painel (A) é válida para todos os painéis. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras.

4.17 Avaliação do tratamento hormonal sobre o número de células presentes na medula óssea 24 h após a instilação nasal de LPS

A análise do número de células totais presentes na medula óssea, quantificado em amostras do lavado femoral (Figura 30), revelou que o tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona previamente ao LPS não promoveu alterações significantes.

Figura 30 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre o número de células totais encontradas na medula óssea 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17 β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do lavado femoral coletadas. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais representados nas barras.

4.18 Avaliação do tratamento hormonal sobre a atividade da enzima MPO no tecido pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

O tratamento com 17β -estradiol ou progesterona, previamente ao LPS, não alterou a infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar, mensurado de forma indireta pela atividade da enzima MPO.

Figura 31 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona sobre a atividade da enzima MPO em homogenatos de pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão obtidas. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais representados nas barras.

4.19 Avaliação do tratamento hormonal sobre a arquitetura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Em relação aos resultados do grau de lesão, avaliados em secções histológicas de pulmão, a ANOVA revelou que tanto o tratamento com 17β -estradiol quanto com progesterona (Figura 32), 12 h antes da instilação nasal de LPS, reduziu significativamente a lesão em comparação ao grupo OVx+LPS não tratado.

Paralelamente, a figura 33 mostra a arquitetura pulmonar de um animal representativo de cada grupo experimental. Os painéis 33(A) e 33(B) são referem-se à animais Sham e OVx, respectivamente, 24 h após a instilação nasal de LPS, que não receberam tratamento hormonal. Os painéis 33(C) e 33(D) ilustram a arquitetura pulmonar de animais OVx tratados com 17β -estradiol e progesterona, respectivamente, 12 h antes da instilação nasal de LPS. Embora a coloração de HE esteja mais clara nos animais que receberam hormônio 33(C) e 33(D), parece existir relativa compatibilidade com a arquitetura pulmonar observada de um animal Sham+LPS (33A).

Figura 32 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona sobre o dano pulmonar avaliado em secções histológicas 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram seccionadas e coradas com HE. A figura mostra os resultados da avaliação dos escores de lesão (espessura das paredes dos alvéolos, presença de células inflamatórias, hemorragia e congestão alveolar) 24 h após a instilação nasal de LPS. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais mostrados em cada barra. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS.

Figura 33 - Imagens representativas do efeito do tratamento com 17β -estradiol (C) ou progesterona (D) sobre a arquitetura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS e, decorridas 24 h, foram submetidos à eutanásia e amostras do pulmão foram seccionadas e coradas com HE para análise. Animais OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. As figuras são representativas de um animal para cada grupo experimental. As figuras 33(A) e 33(B) são representativas de animais Sham e OVx, respectivamente, 24 h após a instilação nasal de LPS, que não receberam tratamento hormonal. As imagens 33(C) e 33(D) ilustram a arquitetura pulmonar de animais OVx tratados com 17β -estradiol e progesterona, respectivamente, 12 h antes da instilação nasal de LPS. Ampliação 200x.

4.20 Avaliação do tratamento hormonal sobre a quantificação de IL-1 β e IL-10 gerados no pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS

Os dados apresentados correspondem à produção de mediadores da inflamação em sobrenadante de cultura pulmonar após 24 h de cultivo em estufa. A análise do tratamento farmacológico com 17 β -estradiol ou progesterona previamente ao LPS, apontou redução significativa sobre a produção de IL-1 β (Figura 34A) quando comparado ao grupo OVx+LPS que não recebeu hormônio. Os valores encontrados da quantificação desse mediador nos animais tratados foram próximos àqueles encontrados nos animais Sham+LPS.

Em contrapartida, a análise do efeito do tratamento sobre os níveis de IL-10 (Figura 34B) não demonstrou alteração significativa.

Figura 34 - Efeito do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre a quantificação de IL-1 β e IL-10 em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17 β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de fragmentos pulmonares foram obtidos e cultivados em DMEM por 24 h em estufa. O painel (A) refere-se à quantificação de IL-1 β e (B) de IL-10 em sobrenadante de cultura pulmonar. OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. A legenda apresentada no painel (A) é válida para o painel (B). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS.

4.21 Avaliação do tratamento hormonal sobre a quantificação de nitritos gerados no pulmão 24 h após a instilação nasal de LPS

Em relação ao efeito do 17β -estradiol ou progesterona sobre os níveis de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar, a ANOVA demonstrou que ambos os tratamentos promoveram redução significativa quando comparados ao grupo OVx+LPS não tratado. Os níveis encontrados foram semelhantes àqueles demonstrados no Sham+LPS.

Figura 35 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona sobre a quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de fragmentos pulmonares foram obtidos e cultivados em DMEM por 24 h em estufa. Os resultados referem-se à quantificação de nitritos em sobrenadante de cultura pulmonar. OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS.

4.22 Avaliação de tratamentos farmacológicos sobre a reatividade traqueal *in vitro* 24 h após a instilação nasal de LPS

Os resultados relacionados ao efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona (Figura 36A) previamente ao LPS, apontaram que ambos os hormônios promoveram aumento estatisticamente significativo da reatividade traqueal em comparação aos animais OVx+LPS. Ainda, a hiperreatividade dos anéis de traquéia desses animais foi significativamente maior que aquela encontrada nos animais Sham+LPS.

O mesmo padrão de resposta foi observado nos resultados obtidos do tratamento prévio ao LPS com L-NAME ou aminoguanidina (Figura 36B). Ambos os fármacos foram capazes de promover aumento significativo da reatividade traqueal desses animais em comparação aos OVx+LPS. Entretanto, os animais que receberam aminoguanidina obtiveram escores de contração ainda mais altos. Tanto o L-NAME quanto a aminoguanidina promoveram hiperreatividade significativa em relação ao grupo Sham+LPS.

Figura 36 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona (A) e L-NAME ou aminoguanidina (B) sobre a reatividade de anéis de traquéia 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona (Figura 36A) e L-NAME ou aminoguanidina (Figura 36B). Após 12 h do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona e 1 hora do tratamento com L-NAME ou aminoguanidina, os animais foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia e um segmento da traquéia foi utilizado para avaliação da reatividade *in vitro*. OVx e Sham sem tratamento farmacológico também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais mostrados em cada legenda. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS e com Sham+LPS.

4.23 Avaliação do tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona sobre a mecânica pulmonar (MCh via i.v.) após 24 h da instilação nasal de LPS

Os resultados obtidos na avaliação da mecânica pulmonar, após o tratamento hormonal previamente ao LPS, mostrou que tanto o 17 β -estradiol, quanto a progesterona, foram efetivos em promover aumento da resposta máxima de R_{RS} (Figura 37A) dos animais em comparação ao grupo OVx+LPS. Entretanto, os tratamentos não causaram alteração na E_{RS} (Figura 37B).

A análise dos dados obtidos por meio do modelo de fase constante detectou que os tratamentos hormonais promoveram aumento significativo da resistência do parênquima pulmonar (G) (Figura 37D) em relação aos animais OVx+LPS. Entretanto, quanto ao R_N (Figura 37C), embora aparente tendência à elevação, a análise não acusou diferença. Também não foi detectada alteração em H (Figura 37E).

Figura 37 - Efeito do tratamento com 17β -estradiol ou progesterona sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Após 12 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica pulmonar no flexiVent frente à MCh via i.v. As figuras mostram a resposta máxima de R_{RS} (Painel 37A), E_{RS} (37B), R_N (37C), G (37D) e H (37E). OVx e Sham sem tratamento hormonal também foram avaliados. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. do número de animais descritos nas legendas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo Sham+LPS; δ $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVx+LPS.

4.24 Avaliação do tratamento com L-NAME sobre a mecânica pulmonar (MCh via i.v.) após 24 h da instilação nasal de LPS

A análise dos resultados obtidos do tratamento com L-NAME previamente ao LPS não detectou alterações significantes nos parâmetros avaliados no flexiVent.

Figura 38 - Efeito do tratamento com L-NAME sobre o mecânica pulmonar avaliada no flexiVent (MCh via i.v.) 24 h após a instilação nasal de LPS

Decorridos 7 dias da OVx, os animais foram tratados com L-NAME. Após 1 h do tratamento farmacológico, foram submetidos à instilação nasal de LPS. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica pulmonar no flexiVent frente à MCh via i.v. As figuras mostram a resposta máxima de R_{RS} (Painel 38A), E_{RS} (38B), R_N (38C), G (38D) e H (38E). OVx e Sham sem tratamento com L-NAME também foram avaliados. Os dados são expressos em média ± E.P.M. do número de animais descritos nas legendas. * p<0,05 em comparação com o grupo Sham+LPS.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo apresentamos dados relacionados ao papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas decorrentes da instilação nasal de LPS em camundongos fêmeas. A proposta se insere no campo da modulação hormonal do sistema imune e contribui para melhor compreensão dos HSF na inflamação pulmonar induzida pelo LPS diretamente nas vias aéreas. Os estudos conduzidos no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental têm convergido para o envolvimento dos HSF na inflamação pulmonar alérgica (DE OLIVEIRA et al. 2007; DE OLIVEIRA et al. 2010; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2013; RIFFO-VASQUEZ et al., 2007) na relação com poluente ambiental (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al., 2011) e na inflamação pulmonar de origem indireta decorrente da I/R intestinal (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2013). Nesse sentido, o trabalho que ora apresentamos permite, ainda, ampliar a compreensão dos hormônios sexuais na inflamação pulmonar.

Para tanto, camundongos fêmeas adultos C57BL/6 foram submetidos a cirurgia para remoção dos ovários e, após 7 dias, a inflamação pulmonar foi induzida pela administração nasal de LPS. Decorridas 4 ou 24 h, parâmetros da resposta inflamatória e da reatividade das vias aéreas foram avaliados.

O modelo experimental empregado é utilizado para compreender potenciais mecanismos relevantes associados à doença humana, notadamente no que se refere à SDRA, que possam ser influenciados pelos HSF. A SDRA é caracterizada por inflamação pulmonar de início agudo, com infiltrado de células polimorfonucleares, lesão alveolar difusa, edema pulmonar e comprometimento das trocas gasosas (BERNARD et al., 1994). Estudos em animais que utilizam a instilação nasal de LPS como indutor da inflamação pulmonar representam adequado modelo de SDRA, cujas características mimetizam aquelas encontradas na clínica, sendo os neutrófilos as principais células envolvidas (MATUTTE-BELLO et al., 2011). Nesse contexto, estudos clínicos mostraram que pacientes neutropênicos em leitos de UTI tornaram-se sujeitos a deterioração da função pulmonar ao se elevarem os níveis de neutrófilos circulantes (ABRAHAM, 2003).

A administração de LPS diretamente nas vias aéreas atinge o pulmão de forma eficaz e induz inflamação pulmonar, com recrutamento de células polimorfonucleares para o espaço broncoalveolar em poucas horas (SZARKA et al., 1997). Nesse sentido, tanto a via nasal quanto intratraqueal tem sido amplamente utilizadas para estudos em roedores (ALBA-

LOUREIRO et al., 2006; CONTI et al., 2010; LIU et al., 2013; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; YUNHE et al., 2012).

Estudos mostram que após 2-4 h da indução inflamatória pelo LPS, células polimorfonucleares começam a aparecer no espaço broncoalveolar e, cerca de 24 h após, encontra-se predominância neutrofílica local (SZARKA et al., 1997; ULICH et al., 1991a,b). Assim, elegemos 4 e 24 h após o LPS pela viabilidade na avaliação da relação dos esteróides sexuais tanto na fase inicial de instalação, quanto em um momento mais avançado do processo inflamatório, com predominância neutrofílica.

Em camundongos fêmeas, o ciclo reprodutivo é de curta duração (4 a 5 dias) e se caracteriza por quatro fases marcantes, proestro, estro, metaestro e diestro, com características morfológicas celulares distintas, identificáveis no esfregaço vaginal (GOLDMAN et al., 2007). Portanto, constituem bom modelo para investigação da mudança do perfil hormonal. Estudos prévios do laboratório demonstraram que em camundongos fêmeas, com ovários intactos, não ocorre diferença marcante no curso da resposta inflamatória pulmonar independentemente da fase do ciclo. Todavia, o diestro induzido pela OVx, com redução significativa dos níveis séricos de estrógenos e progesterona, é capaz de promover alterações importantes na inflamação pulmonar (DE OLIVEIRA et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; RIFFO-VASQUEZ et al., 2007). Nesse sentido, após 7 dias do procedimento cirúrgico, confirmamos o sucesso da OVx. Observamos redução da massa uterina acompanhado de diestro, induzido pela OVx, com reduzidos níveis séricos de 17β -estradiol e progesterona.

Adicionalmente, avaliamos o efeito do tratamento hormonal sobre a inflamação pulmonar e a reatividade das vias aéreas. Para tanto, após 7 dias da OVx, grupos de animais foram tratados com 17β -estradiol ou progesterona. Decorridas 12 h, foram submetidos à instilação nasal de LPS e, após 24 h, realizados os experimentos. O delineamento proposto permitiu avaliar a interação de cada hormônio com o LPS sobre as repercussões inflamatórias geradas no pulmão após 24 h. Os resultados das dosagens dos níveis séricos de estradiol ou progesterona mostraram significativa elevação após 12 h da administração, o que garantiu a interação de cada esteróide com o LPS, no momento da instilação nasal. Entretanto, 24 h após a instilação do LPS, i.e. no momento das avaliações de parâmetros inflamatórios e reatividade, os níveis séricos destes hormônios já estavam reduzidos. Não é surpreendente que após 36 h do tratamento haveria redução dos níveis hormonais, dada a metabolização do fármaco e a uma única administração.

A avaliação da massa uterina dos animais tratados com 17β -estradiol ou progesterona foi realizada após 24 h da instilação nasal de LPS. Observamos que o 17β -estradiol, mas não a progesterona, promoveu aumento no peso do útero dos animais OVx. A determinação da massa uterina é utilizada como importante marcador do efeito dos estrógenos no organismo (SHAW; DECATANZARO, 2009). Vale lembrar que a determinação da massa uterina foi realizada após 36 h do tratamento com hormônio. A avaliação dos níveis séricos hormonais, identificação de células no lavado vaginal e determinação da massa uterina, embora não figurem entre os objetivos do estudo, revestem-se de importância para validação da cirurgia de remoção dos ovários. Estes dados são congruentes aos obtidos em outros estudos realizados no laboratório, tanto em ratas quanto camundongos fêmeas no modelo de alergia.

Nossos resultados mostraram que após 24 h da instilação nasal de LPS houve acentuado aumento do número de células totais, de neutrófilos e de células mononucleares no espaço broncoalveolar dos animais OVx em relação aos Sham. Estes resultados podem sugerir que os HSF estejam interferindo na resposta imune inata, uma vez que seus níveis reduzidos em decorrência da OVx parecem exercer efeito modulador sobre a resposta inflamatória. Estes dados vão ao encontro dos obtidos por Speyer et al. (2005), que em um delineamento experimental semelhante, observaram aumento de células polimorfonucleares no grupo OVx em relação aos animais com ovários intactos, no entanto 6 h após a instilação intratraqueal de LPS.

É interessante ressaltar o efeito do tratamento dos animais OVx com 17β -estradiol ou progesterona previamente ao LPS. Os resultados de ambos os tratamentos culminaram na redução do número de células totais e de neutrófilos no espaço broncoalveolar, o que reflete a reversão do fenômeno promovido pela OVx. Mais uma vez fica em evidência o papel modulador dos esteróides sexuais sobre a resposta inflamatória. Da mesma forma, Speyer et al. (2005) observaram redução da celularidade do LBA decorrente do tratamento com estradiol antes do LPS. Os autores atribuíram efeito anti-inflamatório ao estradiol, entretanto, não avaliaram a progesterona.

Nossos resultados 4 h após a instilação nasal de LPS mostram que não houve alteração na quantificação do número de células do LBA entre os animais OVx e com ovários intactos. Estes resultados podem ser sugestivos de que, neste tempo, os HSF ainda não medeiam o curso da inflamação, evento que observamos na 24^a h após a administração do LPS. Um aspecto interessante é a temporalidade dos efeitos dos HSF em nosso estudo; em 24 h, mas não 4 h, após a administração de LPS, observamos aumento da inflamação pulmonar nos animais OVx.

Em relação a mobilização celular, observamos que em ambos os períodos de tempo estudados (4 e 24 h após instilação nasal), o LPS não promoveu alteração do número total de células da medula óssea e compartimento sanguíneo, tanto nos animais com reduzidos níveis de HSF quanto naqueles com ovários intactos. Todavia, em ambos os períodos analisados após o LPS, observamos aumento do número diferencial de neutrófilos, o que sugere alteração da fisiologia, como a vigência de processo inflamatório. Fundamentados em estudos que utilizam modelo experimental de inflamação pulmonar induzida por LPS nasal, nas concentrações entre 10-300 µg/kg (ASTI et al., 2000; CORTELING et al., 2002; TANG et al., 1995; ULICH et al., 1995), adotamos por meio de estudo prévio 100 µg/ml. Uma possível explicação de não ter ocorrido aumento da celularidade total no sangue e medula óssea em nosso estudo consiste na concentração de LPS utilizada. É possível que nesta dose não tenha ocorrido alterações sistêmicas suficientemente elevadas e por isso não alterou a celularidade total; no entanto, aumentou o número de neutrófilos. A proposta deste estudo consistiu no alcance da inflamação pulmonar de intensidade moderada, afim de viabilizar a mensuração para graus maiores ou menores daquele processo inflamatório já instalado, no caso de potenciais efeitos exercidos pelos HSF. Sendo assim, o protocolo experimental à nossa avaliação foi adequado e ofereceu condições de investigarmos o efeito produzido pelo estradiol ou progesterona, que, neste estudo, foi protetor ao organismo.

Está bem estabelecido que alterações na permeabilidade microvascular pulmonar são observadas na SDRA e já foram descritas em modelos experimentais de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (CHIGNARD; BALLOY, 2000; LI et al., 1998; SPEYER et al., 2005; WIENER-KRONISH et al., 1991). Pode ser avaliada pelo aumento da concentração de proteína no LBA, como indicativo de elevação da permeabilidade do epitélio alveolar ou por meio da marcação das proteínas plasmáticas com corante azul de Evans e posterior quantificação deste no parênquima, como um índice de avaliação da permeabilidade do endotélio pulmonar (LI et al., 1998). Neste estudo empregamos a segunda técnica. Vale ressaltar que alteração da permeabilidade pulmonar ocorre na fase inicial da instalação do processo inflamatório, cerca de até 4 horas da indução com LPS (LI et al., 1998). Assim, nossos resultados após 24 h da instilação nasal de LPS não apontaram diferença entre os animais Sham e OVx tratados ou não com LPS. Tal fato possivelmente deveu-se ao período já transcorrido a partir do início da instalação do processo inflamatório. Por outro lado, 4 h após a instilação nasal de LPS, observamos aumento da concentração do corante azul de Evans extravasado, indicando aumento da permeabilidade microvascular pulmonar nos grupos OVx e Sham tratados com LPS. Todavia, os HSF aparentemente não interferem no curso da

inflamação pulmonar neste período estudado. Speyer et al. (2005) após 6 h da administração de LPS observaram aumento de proteínas no LBA em animais OVx. Como utilizamos outro método, torna-se inviável a comparação.

Motivados pelos resultados obtidos da quantificação celular no espaço broncoalveolar, optamos por avaliar também a presença de neutrófilos contidos no parênquima pulmonar, pela avaliação da atividade da enzima MPO no tecido pulmonar. Esta quantificação é utilizada como marcador indireto da presença de neutrófilos, uma vez que morfológicamente encontra-se nos grânulos azurófilos dessas células (GOLDBLUM, 1985). A atividade pulmonar de MPO 24 h após a administração nasal de LPS foi significativamente maior no grupo OVx em relação ao Sham. Estes resultados se harmonizam com aqueles que mostram maior predominância de neutrófilos no LBA de animais OVx, indicando efeito modulador dos HSF sobre o tráfego de polimorfonucleares para os pulmões. Todavia, o tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona não foi efetivo na redução da atividade de MPO pulmonar. Nossos resultados são congruentes aos encontrados no estudo de Breithaupt-Faloppa et al. (2013), que demonstrou aumento de MPO no pulmão de ratas OVx após I/R intestinal, que não foi revertido com o tratamento dos animais com 17 β -estradiol. Embora muita cautela seja requerida para comparação, uma vez que estes resultados são oriundo de um modelo experimental completamente diferente da inflamação direta por LPS, é interessante o fato de o tratamento com 17 β -estradiol não exercer efeito sobre o infiltrado de neutrófilos no parênquima pulmonar. Contraditoriamente, Cuzzocrea et al. (2001) mostraram no modelo de inflamação induzida por carragenina que os animais OVx apresentam aumento de MPO pulmonar e o tratamento com 17 β -estradiol reduz este efeito. Já Speyer et al. (2005) mostraram que o após 6 h da instilação intratraqueal com LPS houve aumento da MPO pulmonar nos animais OVx comparado ao grupo com ovários intactos, entretanto, não apresentam dados neste parâmetro do tratamento com 17 β -estradiol.

Neste estudo pode ser observado que os mecanismos relacionados à interação dos HSF com os neutrófilos no pulmão parece envolver aspectos temporais da resposta inflamatória. De fato, no estudo de 4 h após a instilação de LPS houve aumento de MPO pulmonar e no espaço broncoalveolar, tanto no grupo OVx como no Sham, entretanto não houve diferença. É plausível hipotetizar que após 4 h da instilação nasal de LPS os HSF ainda não modulem a resposta inflamatória.

Nossos resultados da análise histológica de secções pulmonares coradas com hematoxilina/eosina confirmam os obtidos na quantificação celular do LBA e atividade da enzima MPO pulmonar após 24 h da instilação nasal de LPS. Fica evidente que os animais

com reduzidos níveis hormonais apresentam elevado infiltrado de neutrófilos dentro do alvéolo, espessamento da parede alveolar e maior quantidade de hemácias em relação aos animais com ovários intactos. Ainda, o tratamento com 17 β -estradiol ou progesterona foi capaz de amenizar os danos pulmonares observados na histologia (Figura 32).

Fundamentados nas diferenças entre os animais OVx e Sham, notavelmente sobre o aumento de neutrófilos nos animais com reduzidos níveis de HSF circulantes, 24 h após o LPS, quantificamos os mediadores da inflamação no pulmão. O estudo conduzido pela técnica denominada explante pulmonar é interessante pois permite análise continuada da geração de mediadores da inflamação pelo tecido pulmonar. Assim é possível observar conjuntamente o estado das células estruturais, das células que migraram, do músculo liso, de todos componentes do pulmão.

É sabido que a IL-1 β tem importante ação no recrutamento de neutrófilos e induz a formação de moléculas de adesão endotelial, o que é essencial para migração dessas células nos tecidos inflamados (PASS et al., 1995; DINARELLO 2011). Nesse sentido, avaliamos esta citocina no pulmão dos animais e os resultados foram congruentes aos obtidos na quantificação celular no LBA e na atividade da enzima MPO pulmonar, sendo observada pronunciada elevação nos animais OVx em relação aos Sham. O tratamento dos animais com 17 β -estradiol ou progesterona foram efetivos em reduzir os níveis desta citocina, o que confere ação anti-inflamatória a estes esteróides. No que tange a progesterona, nossos achados são congruentes aos resultados de Butts et al. (2007), que demonstraram após o tratamento com progesterona redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β induzido por LPS, e que este efeito ocorria por meio da inibição da maturação das células dendríticas de ratas. Em relação ao 17 β -estradiol, nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Pacifici et al. (1989), (Kitazawa et al. (1994), Cuzzocrea et al. (2001) e Speyer et al. (2005) que também demonstraram regulação da IL-1 β pelo estrógeno. Contraditoriamente, em modelo de peritonite induzida por tioglicolato, Calippe et al. (2010) mostraram *in vitro* que macrófagos obtidos desses animais OVx tratados com 17 β -estradiol, apresentaram aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , reportando efeito pró-inflamatório ao estrógeno.

Alguns estudos tem sugerido que IL-1 β tenha função de supressão da apoptose de vários tipos celulares, incluindo neutrófilos (COLOTTA et al., 1992; LEE et al., 1993). Apoptose é um processo de morte celular programada importante durante processos de reparo tecidual, essencial para o término da resposta inflamatória. Nesse sentido, tem sido demonstrada a relevância da apoptose em patologias pulmonares como na SDRA, todavia, os benefícios ainda são contestáveis (ALBERTINE et al., 2002; GALANI et al., 2010; LU et al.,

2005). Embora não seja foco deste trabalho e considerada a complexidade da apoptose celular, o exposto talvez faça sentido; uma vez que a IL-1 β suprime a apoptose de neutrófilos e está elevada no pulmão dos animais OVx 24 h após o LPS, é plausível explicar o aumento dessas células no pulmão dos animais OVx. Nessa linha, o tratamento com 17 β -estradiol diminui os níveis de IL-1 β , o que concorre para aumento da apoptose de neutrófilos, contribuindo para redução dessas células e menor magnitude da inflamação. Nesse contexto, um estudo realizado por Mor et al. (2003) demonstraram, de modo simplificado, que em monócitos humanos *in vitro* o estrógeno induzia apoptose. Todavia, não dispomos de dados acerca dessa hipótese, sendo meramente sugestivo um possível mecanismo que explique redução de neutrófilos pelo 17 β -estradiol.

A magnitude da resposta inflamatória é limitante para o organismo em manter suas funções vitais e a homeostasia, sendo de extrema relevância o controle endógeno. A IL-10 é classicamente conhecida pela sua função anti inflamatória. É sabido que esta citocina pode inibir a síntese de diversos outros mediadores pró-inflamatórios, dentre eles a IL-1 β (MALLAT et al., 1999). Em nosso estudo observamos redução dos níveis de IL-10 gerados no pulmão dos animais OVx, 24 h após a instilação nasal de LPS. Este dado pode sugerir que os mecanismos endógenos de proteção são suprimidos pela remoção dos ovários. Os resultados indicando diminuição na liberação de IL-10 no explante reforçam o conceito da ação anti-inflamatória dos HSF e se harmonizam com a celularidade pulmonar aumentada, observada neste grupo. De forma surpreendente, o tratamento dos animais previamente ao LPS com 17 β -estradiol ou progesterona não promoveu aumento de IL-10. Embora o impacto da redução significativa dos HSF foi capaz de promover diminuição de IL-10, o tratamento com os hormônios não reverteu. Um recente estudo conduzido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental que utilizou modelo de inflamação pulmonar decorrente de I/R intestinal em ratas, mostraram que a remoção dos ovários promove diminuição dos níveis de IL-10, entretanto, o tratamento com 17 β -estradiol não promove aumento desta citocina. Embora sejam modelos experimentais distintos, os resultados são congruentes e podem sugerir que a IL-10 não seja sensível ao tratamento (FANTOZZI, 2013).

Avaliamos também os níveis de TNF- α e IL-6, citocinas tipicamente implicadas na patogenia pulmonar decorrente da instilação nasal de LPS (GOODMAN et al., 2003). É importante a percepção de que as citocinas apresentam diferentes perfis de liberação. No caso do TNF- α , dados da literatura indicam que sua liberação em resposta à administração de LPS em camundongos atinge o pico plasmático em 2 h, retornando rapidamente aos níveis basais (INOUE, 2000). Em nosso estudo não observamos diferença na quantificação de TNF- α entre

os grupos OVx ou Sham, instilados ou não com LPS. Este resultado é pertinente ao passo que a cinética desta citocina é de início rápido após o indução da inflamação. Nesse sentido, não surpreende ausência de diferença, uma vez que avaliamos esta citocina 48 h após a instilação nasal de LPS (após 24 h da instilação com LPS os animais foram eutanasiados e os fragmentos pulmonares permaneceram mais 24 h em cultura, para então serem analisados). Nossos resultados corroboram aos encontrados por Speyer et al. (2005), que investigaram TNF- α após 6 h da instilação intratraqueal e não observaram alteração entre animais OVx e com ovários intactos. Ainda, os autores avaliaram a cinética de TNF- α , e os resultados apontaram que ocorre elevação dos níveis mensurados após 2 h do LPS, e estes níveis se mantêm até a 6ª hora. Entretanto, Cuzzocrea et al. (2001) mostraram elevação de TNF- α no exsudato pleural 4 h após a administração de carragenina nos animais OVx. É possível que em esta identificação seja decorrente do tempo (4 h) após o estímulo inflamatório e parece de muita coerência, uma vez que os animais OVx tratados com carragenina obtém graus maiores de inflamação.

A IL-6 é um importante marcador da inflamação pulmonar e seus níveis séricos têm excelente correlação com a gravidade e prognóstico da SDRA (MARTIN, 2005). Nossos estudos não apontaram diferença na produção desta citocina entre os animais OVx ou Sham 24 h após o LPS. Speyer et al. (2005) demonstraram aumento de IL-6 no soro dos animais OVx 6 h após o LPS. Todavia, não avaliaram a produção deste mediador no pulmão dos animais. Utilizando camundongos machos, Hsieh et al. (2007) mostraram que 4 h após o trauma-hemorrágico ocorre aumento de IL-6 em homogenatos de pulmão, efeito que é inibido pelo tratamento com 17 β -estradiol. Assim pode-se relacionar esta citocina com possível regulação pelos HSF. Entretanto, neste modelo de estudo, outros mecanismos provavelmente estão envolvidos o que inviabiliza comparações.

No universo dos mediadores inflamatórios, as quimiocinas tem sido extensivamente estudadas. Exercem potentes funções quimiotáticas e de ativação de leucócitos (KUNKEL et al., 1995). KC, MIP-2 e MCP-1 foram alvos de estudo, uma vez que são relevantes em modelos experimentais induzidos por LPS, predominantemente neutrofílicos. A IL-8 é uma quimiocina encontrada em humanos e é considerada protótipo de quimiotaxia e ativação de neutrófilos (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997). Wiedermann et al. (2004) mostraram que a concentração de IL-8 é elevada no LBA de pacientes com SDRA e que esta quimiocina pode ser considerada o principal fator modulador do recrutamento de neutrófilos na fase inicial da doença. Contudo, a IL-8 não é encontrada em roedores, sendo a CINC-1 sua homóloga encontrada em ratos e KC e MIP-2 em camundongos (LAING; SECOMBES,

2004). A MCP-1 tem como principal função atrair monócitos (MAURER; VON STEBUT, 2004). Em nosso estudo foi observado aumento nos níveis desses três mediadores 24 h após a instilação nasal de LPS. Entretanto, os resultados mostram que, aparentemente, não são modulados pelos HSF, sem diferença nos níveis encontrados em animais OVx e Sham. Por serem homólogas, vale ressaltar que KC e MIP-2 tem níveis equivalentes, observado em nosso estudo e em vários outros que investigam KC e MIP-2 concomitantemente. No estudo de Speyer et al. (2005), KC, MIP-2 e MCP-1 também foram avaliados e não apresentaram diferença nos níveis entre animais OVx e Sham, 6 h após o LPS, o que corrobora os nossos resultados.

É importante ressaltar a necessidade de cautela ao analisar a concentração de mediadores inflamatórios, uma vez que os resultados podem ser divergentes em decorrência dos compartimentos analisados. Mediadores avaliados no LBA ou em cultura de tecido pulmonar, podem ter perfis distintos. Embora nossos resultados sejam concordantes com os de Speyer et al. (2005), em nosso estudo quantificamos os mediadores que refletem o estado inflamatório do pulmão inteiro, enquanto a análise de mediadores do LBA é o reflexo das células residentes e recrutadas para o espaço broncoalveolar.

Uma vez que o LPS exerce seus efeitos via TLR4 e considerando os resultados obtidos na magnitude da inflamação pulmonar, decorrente da redução dos níveis circulantes de HSF pela OVx, investigamos sua expressão gênica. Nossos resultados não apontaram alteração na expressão gênica de TLR4 no tecido pulmonar promovidos pela OVx. Embora constatamos neste modelo experimental pronunciado aumento na magnitude da inflamação pulmonar nos animais OVx, 24 h após a instilação nasal de LPS, aparentemente estes efeitos não decorrem de alterações nas expressões dos genes TLR4. Entretanto, é importante mencionar que a interação TLR4+LPS é complexa, uma vez que várias outras moléculas participam deste processo. Os estudos acerca da interação entre os esteróides sexuais e a expressão de TLR4 e/ou moléculas co-reguladoras como LBP, CD14, e MD-2, são conflitantes. A maioria das investigações são conduzidas em culturas de células, e utilizam as mais variadas metodologias e delineamentos/modelos experimentais, gerando dificuldades comparativas. Embora alguns resultados indicam efeito modulador dos esteróides sexuais (que incluem a testosterona) sobre a expressão dessa(s) molécula(s) (MARRIOT et al., 2006; QUINTAR et al., 2006; HSIEH et al., 2007; TEMPLE et al., 2008; RETTEW et al., 2009; SÁRVÁRI et al., 2012) outros não constata tal relação (EISENMENGER et al., 2004; VEGETO et al., 2004; CARD et al., 2006; CALIPPE et al., 2010)). A partir do exposto, a expressão gênica dessas moléculas no pulmão e sua possível regulação pelos HSF, permanecem inconclusivas.

A partir da ligação do LPS ao TLR4, é desencadeada uma cascata de sinalização que culmina na ativação NF- κ B. Embora não tenhamos observado alteração na expressão gênica do TLR4, decidimos investigar a expressão gênica desse importante indutor da inflamação no tecido pulmonar. Assim como o TLR4, não observamos alteração na expressão gênica do NF- κ B1 no tecido pulmonar. Avaliamos o gene NF- κ B1, também conhecido como p50, pela razão desta subunidade estar presente em quase todos os tecidos, inclusive no pulmão (VALLABHAPURAPU e KARIN, 2009). O LPS foi capaz de promover aumento da expressão gênica de NF- κ B1 de forma semelhante nos animais OVx quanto nos Sham, sugerindo que neste modelo experimental os HSF não estão envolvidos na sua regulação. Assim como nas avaliações do TLR4, a maioria dos estudos são conduzidos em células *in vitro*, e a ampla variedade de métodos empregados dificultam precisa conclusão. Entretanto, é intrigante o fato de pronunciada diferença na magnitude da inflamação entre os animais OVx e com ovários intactos 24 h após a administração nasal de LPS e a ausência da relação com a expressão de TLR4 e NF- κ B1.

Chen et al. (2008) estudaram o efeito da progesterona em modelo de traumatismo cerebral em ratos. Os resultados mostraram que o tratamento com o hormônio reduziu drasticamente tanto a expressão gênica cerebral de TLR4, mensurada por PCR em tempo real quanto de NF- κ B, investigada por meio da técnica eletroforese de deslocamento de mobilidade (do inglês, *electrophoretic mobility shift assay* - EMSA). Considerando a disparidade entre os modelos experimentais e os objetivos do estudo em questão, um fato relevante seria no emprego da técnica para avaliação do NF- κ B. Muitos trabalhos tem utilizado EMSA para avaliação desse gene, o que deve ser considerado como possibilidade para melhor investigação neste modelo. Outra questão importante no que se refere a técnicas de biologia molecular, é a avaliação da proteína no tecido. Uma possibilidade seria que, embora a expressão gênica de TLR4 e NF- κ B, aparentemente, não diferem, talvez o *Western Blotting* poderia contribuir. Embora o enfoque molecular não foi nosso principal objetivo neste estudo, é importante atentar para estas possibilidades.

Está bem estabelecido que a administração de LPS nas vias aéreas representa enorme risco de indução de inflamação pulmonar. Além disso, pode levar ao desencadeamento de hiperreatividade brônquica (TOGBE et al., 2007). Fundamentados nos efeitos exercidos pelos HSF no recrutamento de neutrófilos, avaliamos seu possível papel no que concerne a reatividade das vias aéreas. Para este propósito, foram conduzidos experimentos utilizando um ventilador mecânico projetado para pequenos animais, flexiVent, que mensura resistência e elância do sistema respiratório. Duas distintas metodologias foram utilizadas neste estudo e

diferiram entre si, principalmente, quanto 1) a frequência respiratória (FR), 2) a utilização de bloqueador neuromuscular e 3) a via de administração da MCh.

No primeiro experimento utilizamos FR de 450 ciclos/min, na ausência de bloqueador neuromuscular e MCh nas concentrações de 50 e 100 mg/ml oferecidas via inalatória, nebulizada diretamente nas vias aéreas do animal. Adotamos a hiperventilação com o intuito de suprimir o *drive* respiratório espontâneo do animal, evitando, assim, “briga” com o ventilador. Uma vez que o animal respira espontaneamente durante o experimento, impossibilita a coleta de dados (resistência e elastância) por não permitir a aplicação adequada do modelo matemático, uma vez que o sinal de entrada (volume de gás injetado) já não é mais somente aquele fornecido e conhecido pelo flexiVent. Se o animal respira espontaneamente, haverá queda no valor de COD (o controle de qualidade entre o modelo matemático empregado pelo ventilador mecânico e a resposta do animal) e o dado gerado não será válido. O animal deverá estar vivo, porém sem respiração ativa, para que o aparelho possa fazer a medida correta da mecânica pulmonar. Adicionalmente, a condição criteriosa de valores de COD permite excluir dados gerados decorrentes de interferências experimentais não controladas (e.g. acúmulo de rolha de muco na cânula endotraqueal, o que aumenta a resistência de forma indevida e não resultante da broncoconstrição pulmonar esperada frente às doses de MCh).

Embora 450 ciclos/min seja considerada alta FR na ventilação mecânica, a respiração fisiológica de um camundongo C57BL/6 pode variar de 300-500 ciclos/min (CARD et al., 2006; FARRAJ et al., 2010; MILTON et al., 2011). A eleição deste protocolo de hiperventilação é justificada na ausência de bloqueador neuromuscular. Optamos por esta metodologia amplamente utilizada e defendida na literatura (BOZANICH et al., 2005, BOZANICH et al., 2007; BOZANICH et al., 2008; BURCHELL et al., 2009; COLLINS et al., 2003; LARCOMBE et al., 2008; MCGLADE et al., 2007; THAMRIN et al., 2004; ZOSKY et al., 2008; ZOSKY et al., 2009) porém culminou com CODs de valores baixos e exclusão de dados. Embora a hiperventilação seja utilizada para evitar a respiração espontânea do animal, em nosso estudo não foi eficiente.

Optamos por utilizar duas diferentes concentrações de metacolina, 50 e 100 mg/ml. Baseados na literatura, são em altas doses que se podem observar diferenças entre os grupos experimentais (DIMITROPOULOU, et al, 2009; FARRAJ et al., 2010; FRUSH et al., 2011; JONASSON et al, 2009; PINELLI et al., 2009; RIESENFELD et al., 2010; SHALABY et al., 2010; TOMIOKA et al., 2002). De forma geral, quando se utiliza maior número de concentrações de MCh há favorecimento de acúmulo de líquido (tanto MCh quanto secreções

do animal) na cânula endotraqueal, o que promove “entupimento” e consequentes erros experimentais. Além disso, o procedimento fica extenso em demasia, e, na maioria das vezes, ocorre a morte do animal antes do término do protocolo.

Os resultados mostraram que 24 h após a instilação nasal de LPS, a resposta máxima de resistência dos animais OVx tende à redução em relação ao grupo Sham. Todavia, esta observação não foi revelada como significativa pela análise estatística. Assim como nos parâmetros inflamatório avaliados, 4 h após a instilação nasal de LPS a remoção dos HSF parece não influenciar a resistência e elastância das vias aéreas.

Os dados sugerirem tendência à redução da resistência das vias aéreas nos animais OVx, 24 h após o LPS, nos pareceram intrigantes. Inicialmente, aventamos a possibilidade da ausência estatística por se tratar de um modelo experimental agudo de inflamação pulmonar, que poderia não ter transcorrido o tempo suficiente após o LPS (24 h) para promover alterações importantes na estrutura pulmonar/caixa torácica, inviabilizando a identificação pelo flexiVent. Todavia, a redução dos HSF parecia estar exercendo efeito importante na reatividade, independente do modelo ser agudo. Nesse contexto cabe ressaltar que em patologias pulmonares crônicas, as alterações estruturais são mais acentuadas e, talvez, mais detectáveis no flexiVent.

Uma segunda hipótese recaiu sobre a influência da caixa torácica. Alguns estudos da literatura descrevem uma perfuração no diafragma do animal afim de igualar a pressão intra-torácica com a atmosférica, para que não haja interferência da caixa torácica na avaliação da mecânica pulmonar (JOHNSTON et al., 2008; JONASSON et al., 2009a; JONASSON et al., 2009b; SWEDIN et al., 2010). É plausível hipotetizar que o estudo da mecânica respiratória sem interferência da caixa torácica seja diferente da mecânica pulmonar com o tórax intacto, uma vez que a expansão do tecido pulmonar é menor pela restrição promovida pelo arcabouço ósseo. Nesse sentido, Brito et al. (2012) mostraram animais com enfisema pulmonar, quando avaliados com a caixa torácica aberta, apresentaram diferença significativa em relação aos seus controles, o que não ocorreu nos animais com tórax intacto. Todavia, a remoção da caixa torácica provoca grande distanciamento da fisiologia, colocando este recurso em questão.

Segundo Rossoni (2013), uma consideração importante acerca deste método experimental reside no fato de que em decorrência da hiperventilação, pode ocorrer alcalose respiratória, com aumento da PCO_2 nas vias aéreas, que altera a mobilização de Ca^{2+} e

contribui para alteração da resposta contrátil do músculo liso dos grupos estudados após inalação da MCh (comunicação pessoal)².

O protocolo de 450 ciclos/min com MCh via inalatória culminou com uma série de CODs com valores baixos e consequentes exclusões de dados, notadamente no que se refere ao modelo de fase constante, que avalia a via aérea e parênquima pulmonar separadamente. Embora este fenômeno não seja apontado na literatura, foi observado em nosso estudo. Assim, a possibilidade de termos a análise e, talvez, melhor compreensão dos efeitos da remoção dos HSF sobre a resistência pulmonar em compartimentos separados foi inviabilizada.

Diversos estudos no flexiVent que utilizam bloqueador neuromuscular associado ao anestésico e com menor FR (150-200 ciclos/min) tem sido relatados (ALLEN et al., 2009; CHEN et al., 2006; DUGUET, et al. 2000; FERREIRA et al., 2012; FRUSH et al., 2011; HIROTA et al., 2006; JONASSON et al., 2009b; PINELLI et al., 2009; SHALABY et al., 2010; SWEDIN et al., 2010). Optamos por realizar um novo experimento com esta abordagem, que utilizamos bloqueador neuromuscular associado ao anestésico, FR de 150 ciclos/min e via i.v. de administração de MCh. Os dados obtidos confirmaram o que a tendência de resposta encontrada no experimento anterior mostrava. Após 24 h da instilação nasal de LPS, os animais OVx apresentaram redução estatisticamente significativa tanto da resistência (R_{RS}) e elastância (E_{RS}) do sistema respiratório, quanto redução da resistência somente das vias aéreas (R_N) e resistência do parênquima pulmonar (G). Embora os dados apontem para redução da E_{RS} nos animais OVx, parece que neste modelo experimental o LPS não promove alteração nos componentes elásticos circunscritos ao parênquima pulmonar (H), independente dos animais serem OVx ou Sham. Assim, constatamos que os dados gerados no experimento em que MCh foi oferecida via inalatória e via i.v. são congruentes, e sugerem que a carência de HSF circulantes contribuem para a redução da resistência e elastância do sistema respiratório 24 h após a instilação nasal de LPS. Os dados apresentados sugerem, ainda, que a resistência das vias aéreas em resposta à MCh pode ser alterada pelo tratamento com hormônio. Interessantemente, tanto o 17β -estradiol quanto a progesterona foram capazes de promover hiperreatividade, revertendo o efeito de redução induzido pela OVx. Vale ressaltar que nos animais com ovários intactos, as diferentes fases do ciclo estral não

² informação fornecida pela Dra. Luciana Rossoni, na defesa de tese de doutoramento de Isabelli de Oliveira Martins, no ICB/USP em São Paulo, dia 09 de outubro de 2013.

promovem alterações significantes na avaliação da mecânica respiratória (RUBINI; BONDÌ, 2007).

Jonasson et al. (2009a) estudou o efeito da MCh via inalatória e i.v. em modelo murino de asma (com OVA) em fêmeas. Avaliaram os animais no flexiVent com FR de 150 ciclos/min e anestésico associado ao bloqueador neuromuscular. Contudo, incisões bilaterais foram realizadas na parede torácica para diminuir a influência do arcabouço ósseo no movimento pulmonar, o que não ocorreu em nosso estudo. Eles observaram que a MCh via i.v. promoveu constrição mais homogênea das vias aéreas em comparação aos resultados obtidos pela via inalatória, que apresentaram elevada heterogeneidade. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Jonasson et al. (2009a). De fato, a grande variação no desvio padrão obtido em nosso experimento que utilizou MCh via inalatória mostram pronunciadas diferenças na resposta de cada animal. É plausível hipotetizar que esta heterogeneidade seja em decorrência da distribuição irregular da MCh nas vias aéreas, que, quando oferecida na forma inalada, pode ser distribuída desigualmente pela árvore traqueobrônquica, principalmente nas vias aérea mais periféricas. Nesse sentido, regiões que recebem mais MCh podem tornar-se extremamente constritas em relação a outras, acarretando importante heterogeneidade (JONASSON et al., 2009a; SALERNO; LUDWIG, 1996)

A MCh promove contração muscular pela ação em receptores colinérgicos muscarínicos. Nesse sentido, Sly et al. (1995) mostraram em um experimento que utilizou cães filhotes, que o subtipo M3, localizados na musculatura lisa das vias aéreas, são alcançados mais facilmente pela MCh quando oferecida via i.v. em relação à administração inalatória. Os autores sugerem que pela via inalatória, a MCh precisa antes se difundir pelo epitélio respiratório para então alcançar o receptor. Adicionalmente, sugerem que o subtipo M1, localizados no parênquima pulmonar (alvéolos), são mais facilmente alcançados pela MCh na forma inalada e seriam os principais responsáveis pela resposta contrátil do parênquima pulmonar. Nessa linha, Peták et al. (1997) mostraram em ratos da linhagem Sprague-Dawley importante diferença de resposta à MCh quando oferecida via inalatória ou i.v. A partir do exposto, podemos supor que a maior homogeneidade dos resultados que obtivemos nos grupos experimentais em que MCh foi oferecida i.v. possa ser em decorrência da maior ação sobre os subtipos de receptores M3. Adicionalmente, pode-se sugerir que a elevada variabilidade de respostas encontradas no experimento em que MCh foi via inalatória seja em razão da sua distribuição irregular pela árvore traqueobrônquica associada às ações irregulares sobre receptores M1, promovendo elevada heterogeneidade na contração.

É possível observar na literatura que a avaliação da mecânica respiratória em roedores utilizando o flexiVent ainda não chegou a um consenso; diversos métodos existem e estão sendo utilizados e discutidos, entretanto, criteriosa análise deve ser realizada acerca das vantagens e limitações que cada técnica oferece. Optamos inicialmente pela utilização da MCh oferecida via inalatória no sentido de ser um estímulo mais direto no pulmão. Todavia, a heterogeneidade dos resultados nos limitaram a conclusões mais precisas. Assim, em nosso modelo experimental, a MCh via i.v. associada ao uso do bloqueador neuromuscular com menor FR apresentou maiores benefícios para o estudo, notadamente por viabilizar a coleta dos dados de resistência das vias aéreas e de parênquima pulmonar separadamente.

Na busca pela melhor compreensão do papel dos HSF na reatividade das vias aéreas, ampliamos o estudo e avaliamos a resposta de segmentos de traquéia *in vitro* frente às doses de MCh. Assim, poderíamos entender melhor a influência dos HSF em um panorama da função pulmonar no animal vivo, considerando toda a complexidade do sistema biológico e uma investigação mais pontual, no músculo liso isolado.

Observamos que 24 h após a instilação nasal de LPS, houve redução da reatividade traqueal nos animais OVx em relação aos Sham. Adicionalmente, o tratamento dos animais OVx previamente ao LPS com 17 β -estradiol ou progesterona promoveu hiperreatividade dos anéis de traquéia, atingindo escores ainda mais elevados que aqueles apresentados pelos animais Sham 24 h após LPS. Esses dados vão ao encontro dos obtidos na avaliação da mecânica pulmonar, em que observamos redução da resistência e elastância do sistema respiratório nos animais OVx. Por outro lado, 4 h após a administração de LPS, os HSF parecem não alterar a contração da traquéia.

Os resultados obtidos no estudo da reatividade das vias aéreas tanto *in vivo* como *in vitro* nos foram surpreendentes. Pelos dados de pronunciado aumento no infiltrado de neutrófilos no pulmão, com maiores níveis de IL-1 β e menores de IL-10 nos animais OVx, 24 h após o LPS, poderíamos supor que a reatividade das vias aéreas estaria também elevada nesses animais, coerente ao expressivo processo inflamatório. Interessantemente, foi observada redução da reatividade das vias aéreas.

Estudos anteriores conduzidos no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (COELHO et al., 2007; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2006; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2011; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2013) mostraram que o óxido nítrico (NO) exerce efeito importante na inflamação pulmonar, notadamente no que se refere à reatividade das vias aéreas. Assim, quantificamos os níveis de nitritos, utilizado como índice de NO, em sobrenadante de cultura de fragmentos pulmonares e observamos significante

aumento nos animais OVx em relação aos Sham, 24 h após o LPS. Adicionalmente, observamos que os tratamentos com 17β -estradiol ou progesterona foram efetivos em reduzir os níveis de nitritos, sugerindo que a ausência de HSF de alguma forma contribui para aumento da geração de NO. Embora seja diferente o modelo experimental, nossos resultados corroboram aos encontrados por Breithaupt-Faloppa et al. (2013), que mostraram aumento de NO no pulmão de ratas OVx submetidas a I/R intestinal, e o tratamento do 17β -estradiol reverte o aumento.

Fundamentados nos resultados de redução da reatividade da traquéia nos animais OVx e naqueles que mostraram aumento de nitrito no pulmão, optamos por estudar o efeito do NO na reatividade traqueal. Nesse contexto, utilizamos a aminoguanidina, que pertence a classe dos inibidores seletivos da i-NOS e o L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, amplamente utilizado em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Nossos resultados mostraram que tanto os animais tratados com L-NAME como aqueles que receberam aminoguanidina tiveram expressivo aumento na reatividade dos anéis de traquéia. Vale ressaltar que a reatividade traqueal dos animais tratados com aminoguanidina alcançaram valores de contração mais altos que aqueles tratados com L-NAME. Embora nossos dados não permitam tal afirmação, talvez seja possível hipotetizar, a partir dos resultados de expressivo aumento na contração traqueal dos animais OVx tratados com aminoguanidina, importante participação da isoforma i-NOS neste modelo. Todavia, os resultados de elevação de nitritos no pulmão dos animais OVx associado ao aumento da reatividade da traquéia pelo bloqueio da NOS e i-NOS, são altamente sugestivos da participação do NO como mediador da hiporreatividade traqueal nos animais com reduzidos níveis de HSF. Ainda, o tratamento com 17β -estradiol ou progesterona reduziu os níveis de nitritos, apontando, mais uma vez, para a interação de NO com os HSF.

É relevante supor que o aumento da IL-1 β nos pulmão dos animais OVx possa, de alguma forma, estar relacionada com a hiporreatividade encontrada nesses animais. Nesse contexto, apesar de não termos resultados para tal afirmação, nossos dados corroboram aos encontrados por Coelho et al. (2007) que mostraram em modelo de I/R intestinal que a hiporreatividade brônquica ocorre, ao menos em parte, por aumento de IL-1 β e NO, particularmente a isoforma i-NOS.

Em nosso estudo não observamos alteração da resistência e elastância pulmonar dos animais OVx após o tratamento com L-NAME no flexiVent. Nesse sentido, nossos resultados vão ao encontro dos obtidos por Lino dos Santos Franco et al. (2013) que estudaram o envolvimento do formaldeído na inflamação pulmonar induzida por OVA. Os autores

mostraram que o formaldeído contribui para hiporreatividade brônquica avaliada *in vitro* e redução da resistência e elastância pulmonar obtidas no flexiVent, com aumento de NO e i-NOS no pulmão desses animais. O tratamento dos ratos com L-NAME promoveu hiperreatividade brônquica *in vitro*, entretanto, não foi efetivo em elevar a resistência das vias aéreas avaliada no flexiVent.

No que tange o envolvimento dos esteróides sexuais envolvidos na avaliação da reatividade das vias aéreas, estudos mostram que camundongos machos em modelo de asma apresentam resistência pulmonar maior em comparação às fêmeas (ANTUNES et al., 2010; CARD et al., 2007; MATSUBARA et al., 2008) camundongos fêmeas OVx tem menor resistência que aquelas com ovários intactos (RIFFO-VASQUEZ et al., 2007) e que o estrógeno pode reduzir a reatividade das vias aéreas (DEGANO et al., 2001; DIMITROPOULO et al., 2009). Vale ressaltar que dependendo do modelo experimental e do estímulo utilizado para desencadear a inflamação, as ações dos HSF podem ser diferentes.

A importância dos HSF em processos inflamatórios pode ser percebida pelo grande número de estudos realizados. Entretanto, não são frequentes aqueles direcionados para o efeito somente da progesterona. Alguns trabalhos mostram o efeito anti-inflamatório da progesterona, que vão ao encontro dos nossos resultados obtidos neste estudo, entretanto, quase todos são conduzidos em células *in vitro* (CONNELLY et al., 2002; MILLER et al., 1996; MIYAURA; IWATA, 2002; SALZMAN et al., 2000; SU et al., 2009; SUN et al., 2012).

Segundo Dantas (2013) a regulação pelos estrógenos é complexa. Depende do ligante, da proporção de receptores e das moléculas co-reguladoras (comunicação pessoal)³. Novella et al. (2012a) tem demonstrado em modelo de doença cardiovascular em fêmeas que o aumento da idade é acompanhado de alterações dos receptores de estrógenos no sistema vascular, e que os diferentes efeitos exercidos podem ser benéficos ou deletérios (DANTAS et al., 2012a; DANTAS et al., 2012b; NOVELLA et al., 2012a; NOVELLA et al., 2012b; NOVENSA et al., 2011; NOVELLA et al., 2013; NOVENSA et al., 2011)

A extensa literatura apresenta aspectos conflitantes acerca das funções dos HSF em processos fisiopatológicos, notadamente na inflamação. Portanto, investigações minuciosas revestem-se de importância. À luz do exposto, entendemos que o estudo ora apresentado possa fornecer subsídios, pelo menos em parte, para melhor compreensão da ação hormonal

³ informação fornecida pela Dra. Ana Paula Dantas, ministrante da palestra *Estrogen signaling and cardiovascular protection: what can we learn after the Women's Health Initiative?* apresentada no Departamento de Farmacologia do ICB/USP em São Paulo, dia 11 de setembro de 2013.

sobre a inflamação pulmonar aguda e a reatividade das vias aéreas decorrentes da exposição das vias aéreas ao LPS.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os HSF modulam de forma diferente os eventos celulares e de músculo liso. A redução dos HSF circulantes pela OVx contribuiu para o aumento de neutrófilos no pulmão e para a redução da reatividade das vias aéreas. É possível sugerir que esses efeitos sejam decorrentes, ao menos em parte, do aumento de IL-1 β e NO no pulmão dos animais. Pode-se concluir que os HSF exercem papel anti-inflamatório, protegendo o organismo dos efeitos deletérios da inflamação.

REFERÊNCIAS⁴

- ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Critical care medicine**, v. 31, n. 4, p. 195–196, 2003.
- ABRAHAM, E.; MATTHAY, M. A.; DINARELLO, C. A.; VINCENT, J. L.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; GLAUSER, M.; PARSONS, P.; FISHER, C. J.; REPINE, J. E. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical Care Medicine**, v. 28, p. 232-235, 2000.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 499-511, 2004.
- AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. **Proceedings of the Japan Academic. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 85, p. 143-56, 2009.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, 2004.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MARTINS, E. F.; LANDGRAF, R. G. et al. Role of insulin on PGE2 generation during LPS-induced lung inflammation in rats. **Life sciences**, v. 78, n. 6, p. 578–585, 2006.
- ALBERTINE, K. H.; SOULIER, M. F.; WANG, Z. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **The American journal of pathology**, v. 161, n. 5, p. 1783–1796, 2002.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.
- ALEXANDER, H.; PADDOCK, R. Bronchial asthma: response to pilocarpine and epinephrine. **Archives of Internal Medicine**, vol. 27, p. 184-191, 1921.
- ALLEN, G. B. et al. Acid aspiration-induced airways hyperresponsiveness in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, p. 1763-1770, 2009.
- ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v. 34 Suppl 1, p. 15–21, 2010.
- ALVING, K.; FORNHEM, C.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M. Nitric oxide mediates cigarette smoke-induced vasodilatory responses in the lung. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 146, n. 3, p. 407–408, 1992.

⁴ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

AMATO, M. B. P.; CARVALHO, C. R. R.; ISOLA, A.; et al. Mechanical ventilation in Acute Lung Injury (ALI)/Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). **Jornal brasileiro de pneumologia : publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 33 Suppl 2, p. S119–27, 2007.

AMATO, M. B.; BARBAS, C. S.; MEDEIROS, D. M.; et al. Beneficial effects of the “open lung approach” with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 152, n. 6 Pt 1, p. 1835–1846, 1995.

AMATO, M. B.; BARBAS, C. S.; MEDEIROS, D. M.; et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 338, n. 6, p. 347–54, 1998.

ANGELE, M. K.; FRANTZ, M. C.; CHAUDRY, I. H. Gender and sex hormone influence the response to trauma and sepsis - potential therapeutic approaches. **Clinics**, v. 61, p. 479–88, 2006.

ANGELE, M. K.; SCHWACHA, M. G.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. **Shock**, v. 14, p. 81–90, 2000.

ANGELE, M. K.; XU, Y. X.; AYALA, A.; SCHWACHA, M. G.; CATANIA, R. A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K.; CHAUDRY, I. H. Gender dimorphism in trauma-hemorrhage-induced thymocyte apoptosis. **Shock**, v. 12, p. 316–22, 1999.

ANGELI, P.; PRADO, C. M.; XISTO, D. G.; et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 294, n. 6, p. L1197–205, 2008.

ANTUNES, M. A.; ABREU, S. C.; SILVA, A. L.; et al. Sex-specific lung remodeling and inflammation changes in experimental allergic asthma. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 109, n. 3, p. 855–63, 2010.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 2, p. 349–60, 1993.

ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, p. 319–23, 1967.

ASTI, C.; RUGGIERI, V.; PORZIO, S.; et al. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 61–9, 2000.

BAEUEERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 141–79, 1994.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565–8, 1998.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annual review of immunology**, v. 15, p. 675–705, 1997.

BARBAS, C. S. V.; MATTOS, G. F. DE; BORGES, E. D. R. Recruitment maneuvers and positive end-expiratory pressure/tidal ventilation titration in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome: translating experimental results to clinical practice. **Critical care (London, England)**, v. 9, n. 5, p. 424–426, 2005.

BARBAS, C.; MATOS, G. Goal-oriented respiratory management for critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. **Critical care research**, v. 2012, p. 952168, 2012.

BARNES, P. J.; BELVISI, M. G. Nitric oxide and lung disease. **Thorax**, v. 48, n. 10, p. 1034–43, 1993.

BATES, J. H. T. Assessment of mechanics. In: MARINI, J. J.; SLUTSKY, A. S. (Ed.) **Physiological basis of ventilatory support**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 231-59.

BATES, J. H. T. et al. Exaggerated airway narrowing in mice treated with intratracheal cationic protein. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, p. 500-6, 2006.

BATES, J. H. T. **Lung mechanics**. An Inverse Modeling Approach. New York: Cambridge, 2009. 220 p.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor- κ B: a key regulator in health and disease of lungs. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 335–51, 2011.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor- κ B: a key regulator in health and disease of lungs. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 335–51, 2011.

BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J.; FALKE, K.; HUDSON, L.; LAMY, M.; LEGALL, J. R.; MORRIS, A.; SPRAGG, R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, p. 818-24, 1994.

BERSTEN, A. D.; EDIBAM, C.; HUNT, T.; MORAN, J. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 4, p. 443–8, 2002.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 169-76, 2003.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, v. 316, n. 6028, p. 552–4.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of pathology**, v. 202, n. 2, p. 145–56, 2004.

BISHOP, A.; ANDERSON, J. E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, v. 208, n. 2, p. 193–205, 2005.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **British journal of anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 110–7, 1996.

BLANCHET, M. R.; ISRAEL-ASSAYAG, E.; CORMIER, Y. Modulation of airway inflammation and resistance in mice by a nicotinic receptor agonist. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 21-7, 2005.

BOER, J. DE; MEURS, H.; FLENDRIG, L.; KOOPAL, M.; ZAAGSMA, J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 8, p. 1235–42, 2001.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–16, 2001.

BOZANICH, E. M. et al. Methacholine responsiveness in mice from 2 to 8 wk of age. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 542-46, 2007.

BOZANICH, E. M. et al. Developmental changes in airway and tissue mechanics in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 108-13, 2005.

BOZANICHA, E. M. et al. Acute Influenza A infection induces bronchial hyper-responsiveness in mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 162, p. 190-6, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 9030–3, 1989.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; FANTOZZI, E. T.; ASSIS-RAMOS, M. M.; et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 40, n. 3, p. 203–9, 2013.

BREITHAUPT-FALOPPA, A.C.; VITORETTI, L.B.; COELHO, F.R.; DOS SANTOS FRANCO A. L.; DOMINGOS, H. V.; SUDO-HAYASHI, L. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TAVARES DE LIMA, W. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. **Shock**, v.32 p. 55-61, 2009.

BRIEL, M.; MEADE, M.; MERCAT, A.; et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 303, n. 9, p. 865–73, 2010.

BRIGHAM, K. L.; MEYRICK, B. Endotoxin and lung injury. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 133, p. 913-27, 1986.

BRITO, J. M.; AOKI, F. G.; GARCIA, E. K. I.; SANTOS, L. M. O.; SONCINI, R.; MORIYA, H. T. Avaliação da mecânica respiratória em modelo animal de enfisema: Efeito da caixa torácica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 23., 2012, Porto de Galinhas. **Anais - CBEB2012**. Porto de Galinhas: SBEB, 2012. 1CD-ROM.

BROSENS, J. J.; TULLET, J.; VARSHOCHI, R.; LAM, E. W.-F. Steroid receptor action. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 265–83, 2004.

BRUN-BUISSON, C.; MINELLI, C.; BERTOLINI, G.; et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. **Intensive care medicine**, v. 30, n. 1, p. 51–61, 2004.

BURCHELL, J. T. et al. Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 296, p. 307-19, 2009.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8410–3, 1993.

BUTTS, C. L.; SHUKAIR, S. A.; DUNCAN, K. M.; et al. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. **International immunology**, v. 19, n. 3, p. 287–96, 2007.

CALIPPE, B.; DOUIN-ECHINARD, V.; DELPY, L.; et al. 17Beta-estradiol promotes TLR4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor alpha signaling in macrophages in vivo. **Journal of immunology**, v. 185, n. 2, p. 1169–76, 2010.

CALZOLARI, A. Reserches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et cells des testicules. **Archives Italiennes de Biologie (Pisa)**, v. 30, p. 71, 1898.

CAMATEROS, P.; MARINO, R.; FORTIN, A.; et al. Identification of novel chromosomal regions associated with airway hyperresponsiveness in recombinant congenic strains of mice. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 21, n. 1-2, p. 28–38, 2010.

CANETTI, C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 8, p. 1619–28, 2001.

CANNIZZARO, V. et al. High tidal volume ventilation in infant mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 162, p. 93-9, 2008.

CARD, J. W.; CAREY, M. A.; BRADBURY, J. A.; DEGRAFF, L. M.; MORGAN, D. L.; MOORMAN, M. P.; FLAKE, G. P.; ZELDIN, D. C. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 621-30, 2006.

CARD, J. W.; VOLTZ, J. W.; FERGUSON, C. D.; et al. Male sex hormones promote vagally mediated reflex airway responsiveness to cholinergic stimulation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 292, n. 4, p. L908–14, 2007.

CAREY, M. A. et al. Spontaneous airway hyperresponsiveness in estrogen receptor- α -deficient mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 126-35, 2007.

CAREY, M. A.; CARD, J. W.; VOLTZ, J. W.; et al. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 293, n. 2, p. L272–8, 2007.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2431-4, 2003.

CARRERAS, M. C.; PARGAMENT, G. A.; CATZ, S. D.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS letters**, v. 341, n. 1, p. 65–8, 1994.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–70, 1975.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology today**, v. 16, n. 1, p. 21–6, 1995.

CATANIA, R. A.; CHAUDRY, I. H. Immunological consequences of trauma and shock. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 28, p. 120-32, 1999.

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TREZENA, A. G.; et al. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **European journal of pharmacology**, v. 494, n. 2-3, p. 241–9, 2004.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**, v. 410, p. 37-40, 2001.

CHAUDRY, I. H.; SAMY, T. S.; SCHWACHA, M. G.; WANG, P.; RUE, L. W.; BLAND, K. I. Endocrine targets in experimental shock. **The Journal of Trauma**, v. 54, p. 118-25, 2003.

CHEN, B.; LIU, G.; SHARDONOFSKY, F.; et al. Tidal breathing pattern differentially antagonizes bronchoconstriction in C57BL/6J vs. A/J mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 101, n. 1, p. 249–55, 2006.

CHEN, G.; SHI, J.; JIN, W. et al. Progesterone administration modulates TLRs/NF- κ B signaling pathway in rat brain after cortical contusion. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 38, p. 65-74, 2008.

CHEN, L.-F.; GREENE, W. C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 5, p. 392–401, 2004.

CHIBA, Y.; MATSUSUE, K.; MISAWA, M. RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. **Journal of pharmacological sciences**, v. 114, n. 3, p. 239–47, 2010.

CHIBA, Y.; MISAWA, M. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. **Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi**, v. 40, n. 4-5, p. 155–67, 2004.

CHIGNARD, M.; BALLOY, V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 6, p. L1083–90, 2000.

COCKCROFT, D. W.; DAVIS, B. E. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 118, n. 3, p. 551–9; quiz 560–1, 2006.

COELHO, F. R.; CAVRIANI, G.; SOARES, A. L.; et al. Lymphatic-borne IL-1beta and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 694–9, 2007.

COLLART, M. A.; BAEUERLE, P.; VASSALLI, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 4, p. 1498–506, 1990.

COLLINS, R. A. et al. Site of inflammation influences site of hyperresponsiveness in experimental asthma. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 139, p. 51-61, 2003.

COLLUCCI, C. Só 27% dos médicos sabem reconhecer a sepse, diz pesquisa. **Folha de São Paulo**, 28 jan. 2009.

COLOTTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, v. 80, n. 8, p. 2012–20, 1992.

CONNEELY, O. M.; MULAC-JERICEVIC, B.; DEMAYO, F.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W. Reproductive functions of progesterone receptors. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 339–55, 2002.

CONTI, G.; TAMBALO, S.; VILLETTE, G.; et al. Evaluation of lung inflammation induced by intratracheal administration of LPS in mice: comparison between MRI and histology. **Magma (New York, N.Y.)**, v. 23, n. 2, p. 93–101, 2010.

CORTELING, R.; WYSS, D.; TRIFILIEFF, A. *In vivo* models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. **BMC Pharmacology**, v. 2, p. 1-8, 2002.

COULSON, F. R.; FRYER, A. D. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 98, n. 1, p. 59–69, 2003.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4613–21, 1997.

CURRAN, E. M.; BERGHAUS, L. J.; VERNETTI, N. J.; SAPORITA, A. J.; LUBAHN, D. B.; ESTES, D. M. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. **Cellular Immunology**, v. 214, p. 12-20, 2001.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S.; MAIS, A. T. Estrogens, the immune response and autoimmunity. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 13, p. 217-26, 1995.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SAUTEBIN, L.; SERRAINO, I.; DUGO, L.; CALABRO, G.; CAPUTI, A. P.; MAGGI, A. The protective role of endogenous estrogens in carrageenan-induced lung injury in the rat. **Molecular Medicine**, v. 7, p. 478-87, 2001.

DANTAS, A. P. V.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. DE. Vascular disease in diabetic women: Why do they miss the female protection? **Experimental diabetes research**, v. 2012, p. 570598, 2012b.

DANTAS, A. P.; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; VILA, E. Vascular aging: facts and factors. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 325, 2012a.

DATASUS. **Internações hospitalares em São Paulo - 2012**. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nrsp.def>> Acesso em: 5 set 2013.

DE OLIVEIRA, A. P. L.; DOMINGOS, H. V.; CAVRIANI, G.; DAMAZO, A. S.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; OLIANI, S. M.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; DE LIMA, W. T. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. **American Journal of Physiology. Cellular Physiology**, v. 293, p. 1120-8, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P.; PERON, J. P.; DAMASO, A. S.; FRANCO, A. L.; DOMINGOS, H. V.; OLIANI, S. M.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES-DE-LIMA, W. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung e-selectin in rats. **Respiratory Research**, v. 11, 2010.

DEGANO, B.; PRÉVOST, M. C.; BERGER, P.; et al. Estradiol decreases the acetylcholine-elicited airway reactivity in ovariectomized rats through an increase in epithelial acetylcholinesterase activity. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1849–54, 2001.

DELEUZE, V.; LEFORT, J.; BUREAU, M. F.; SCHERMAN, D.; VARGAFTIG, B. B. LPS-induced bronchial hyperreactivity: interference by mIL-10 differs according to site of delivery. **American Journal Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, p. 98-105, 2004.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 296-327, 2008.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; 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.

DENG, L.; WANG, C.; SPENCER, E.; YANG, L.; BRAUN, A.; YOU, J.; SLAUGHTER, C.; PICKART, C.; CHEN, Z. J. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, v. 103, p. 351-61, 2000.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334–50, 1999.

DIMITROPOULOU, C. et al. Estrogen Replacement Therapy Prevents Airway Dysfunction in a Murine Model of Allergen-Induced Asthma. **Lung**, v. 187, p. 116-127, Apr 2009.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095–147, 1996.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–32, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–8, 2000.

DIODATO, M. D.; KNÖFERL, M. W.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Gender differences in the inflammatory response and survival following hemorrhage and subsequent sepsis. **Cytokine**, v. 14, p.162-9, 2001.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1102–13, 2006.

DRISCOLL, K. E.; HASSENBEIN, D. G.; HOWARD, B. W.; et al. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. **Journal of leukocyte biology**, v. 58, n. 3, p. 359–64, 1995.

DUGUET, A. et al. Bronchial responsiveness among inbred mouse strains - Role of airway smooth-muscle shortening velocity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 839-48, 2000.

DUSHIANTHAN, A; GROCOTT, M. P. W.; POSTLE, A D.; CUSACK, R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgraduate medical journal**, v. 87, n. 1031, p. 612–22, 2011.

EGLEN, R. M.; HEGDE, S. S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacological reviews**, v. 48, n. 4, p. 531–65, 1996.

EISENMENGER, S. J.; WICHMANN, M. W.; ANGELE, P.; FAIST, E.; HATZ, R.; CHAUDRY, I. H.; JAUCH, K. H.; ANGELE, M. K. Differences in the expression of LPS-receptors are not responsible for the sex-specific immune response after trauma and hemorrhagic shock. **Cellular Immunology**, v. 230, p. 17-22, 2004.

ELLMANN, S.; STICHT, H.; THIEL, F.; et al. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 15, p. 2405–26, 2009.

ERLANDSSON, M. C.; OHLSSON, C.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLSTEN, H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. **Immunology**, v. 103, p. 17-25, 2001.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration “in vivo” by indirect mechanisms. **Agents and actions**, v. 30, n. 3-4, p. 344–9, 1990.

FAFFE, D. S.; SEIDL, V. R.; CHAGAS, P. S.; et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **The European respiratory journal**, v. 15, n. 1, p. 85–91, 2000.

FALLER, S. et al. Inhaled hydrogen sulfide protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Medical gas research**, v. 2:26, p. 1-6, 2012.

FAN, E.; WILCOX, M. E.; BROWER, R. G.; et al. Recruitment maneuvers for acute lung injury: a systematic review. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 178, n. 11, p. 1156–63, 2008.

FANTOZZI, E. T. Hormônios sexuais femininos como moduladores da geração de mediadores inflamatórios em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal. 115 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FARRAJ, A. K. et al. Increased lung resistance after diesel particulate and ozone co-exposure not associated with enhanced lung inflammation in allergic mice. **Inhalation Toxicology**, v. 22, p. 33-41, 2010.

FERGUSON, A. C.; WONG, F. W. Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children. Correlation with macrophages and eosinophils in bronchial lavage fluid. **Chest**, v. 96, n. 5, p. 988–91, 1989.

FERNANDES, L.; D’APRILE, A.; SELF, G.; et al. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. **European journal of pharmacology**, v. 550, n. 1-3, p. 155–61, 2006.

FERREIRA, C. M.; CHEN, J. L.; LI, J.; et al. Genetic interactions between chromosomes 11 and 18 contribute to airway hyperresponsiveness in mice. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29579, 2012.

FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. IP₃ receptors. Ligand-activated calcium channels in multiple forms. **Advances in second messenger and phosphoprotein research**, v. 26, p. 95–107, 1992.

FIALKOW, L.; VIEIRA, S. R. R.; FERNANDES, A. K.; SILVA, D. R.; BOZZETTI, M. C. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. **Intensive care medicine**, v. 28, n. 11, p. 1644–8, 2002.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 737–44, 2008.

FITZGERALD, K. A.; MCWHIRTER, S. M.; FAIA, K. L.; ROWE, D. C.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; COYLE, A. J.; LIAO, S. M.; MANIATIS, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 4, p. 491–6, 2003.

FITZGERALD, K. A.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; BOWIE, A. G.; JEFFERIES, C. A.; MANSELL, A. S.; BRADY, G.; BRINT, E.; DUNNE, A.; GRAY, P.; HARTE, M. T.; MCMURRAY, D.; MITH, D. E.; SIMS, J. E.; BIRD, T. A.; O'NEILL, L. A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, p. 78–83, 2001.

FRINK, M.; THOBE, B. M.; HSIEH, Y. C.; CHOUDHRY, M. A.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. 17beta-estradiol inhibits keratinocyte-derived chemokine production following trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, p. 585–91, 2007.

FRUSH, S. et al. The Role of the Extracellular Matrix Protein Mindin in Airway Response to Environmental Airways Injury. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 1403–8, 2011.

FRYER, A. D.; JACOBY, D. B. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 158, n. 5 Pt 3, p. S154–60, 1998.

FRYER, A. D.; WILLS-KARP, M. Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 71, n. 6, p. 2255–61, 1991.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 1, p. 32–9, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–6, 1980.

GALANI, V.; TATSAKI, E.; BAI, M.; et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. **Pathology, research and practice**, v. 206, n. 3, p. 145–50, 2010.

GALANOS, C. et al. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. **Eur. J. Biochem.**, v.140, p. 221-227, 1984.

GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; FURFINE, E. S.; et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 8, p. 4959–63, 1997.

GATTINONI, L.; TOGNONI, G.; PESENTI, A.; et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 8, p. 568–73, 2001.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular research**, v. 55, n. 2, p. 250–60, 2002.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 837–48, 2008.

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. 225–60, 1998.

GIMMI, C. D.; FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J. G.; GRAY, G.; NADLER, L. M. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6586-90, 1993.

GLEZER, I.; MUNHOZ, C. D.; KAWAMOTO, E. M.; et al. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 8, p. 1120–9, 2003.

GOLDBLUM, S. E.; WU, K. M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 1978-85, 1985.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth defects research. Part B. Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, p. 84-97, 2007.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 14, n. 6, p. 523–35, 2003.

GOVERS, R.; RABELINK, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 280, n. 2, p. F193–206, 2001.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–8, 1982.

GRIFFITHS, M. J.; MESSENT, M.; MACALLISTER, R. J.; EVANS, T. W. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 963–8, 1993.

GROPPER, M. A.; WIENER-KRONISH, J. The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Current opinion in critical care**, v. 14, n. 1, p. 11–5, 2008.

GROSS, S. S.; STUEHR, D. J.; AISAKA, K.; et al. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 170, n. 1, p. 96–103, 1990.

GUEDERS, M. M.; PAULISSEN, G.; CRAHAY, C.; et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society**, v. 58, n. 12, p. 845–54, 2009.

GUÉRIN, C.; REIGNIER, J.; RICHARD, J.-C.; et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 23, p. 2159–68, 2013.

HÄCKER, H.; KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 17, p. 1-19, 2006.

HÄCKER, H.; REDECKE, V.; BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; HSU, L. C.; WANG, G. G.; KAMPS, M. P.; RAZ, E.; WAGNER, H.; HÄCKER, G.; MANN, M.; KARIN, M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, p. 204-7, 2006.

HALL, I. P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. **The European respiratory journal**, v. 15, n. 6, p. 1120–7, 2000.

HAMACHER, J.; LUCAS, R.; LIJNEN, H. R.; et al. Tumor necrosis factor-alpha and angiotatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, n. 5, p. 651–6, 2002.

HANTOS, Z.; DARÓCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S.; FREDBERG, J. J. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 1, p. 168–78, 1992.

HARANT, H.; MARTIN, R. DE; ANDREW, P. J.; et al. Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the

transcription factor NF-kappaB. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 43, p. 26954–61, 1996.

HARGREAVE, F. E.; RYAN, G.; THOMSON, N. C.; et al. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 68, n. 5, p. 347–55, 1981.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes & development**, v. 18, n. 18, p. 2195–224, 2004.

HEBA, G.; KRZEMIŃSKI, T.; PORC, M.; GRZYB, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 52, n. 1, p. 39–52, 2001.

HEDRICH, C. M.; BREAM, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunologic research**, v. 47, n. 1-3, p. 185–206, 2010.

HEEG, K.; DALPKE, A. TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2, p. S61–7, 2003.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; YAMAMOTO, M.; KAISHO, T.; SANJO, H.; KAWAI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 1641-50, 2004.

HEWITT, S. C.; HARRELL, J. C.; KORACH, K. S. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. **Annual review of physiology**, v. 67, p. 285–308, 2005.

HILDEBRAND, F.; HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M. A.; THOBE, B. M.; PAPE, H. C.; CHAUDRY, I. H. Effects of 17beta-estradiol and flutamide on inflammatory response and distant organ damage following trauma-hemorrhage in metestrus females. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 759-65, 2006.

HIROTA, J. A.; ELLIS, R.; INMAN, M. D. Regional differences in the pattern of airway remodeling following chronic allergen exposure in mice. **Respiratory Research**, v. 7, 2006.

HITCHCOCK P.J.; LEIVE, L.; MÄKELÄ, P.H.; RIETSCHER, E. T.; STRITTMATTER. W.; MORRISON, D.C. Lipopolysaccharide nomenclature - past, present, and future. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 699-705, 1986.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 5, p. 971-4, 2004.

HORNUNG, V.; ROTHENFUSSER, S.; BRITSCH, S.; KRUG, A.; JAHRSDORFER, B.; GIESE, T.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 4531-7, 2002.

HSIEH, Y. C.; FRINK, M.; HSIEH, C. H.; CHOUDHRY, M. A.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Downregulation of migration inhibitory factor is critical for estrogen-mediated attenuation of lung tissue damage following trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, p. 1227-32, 2007.

HUDSON, L. D.; MILBERG, J. A.; ANARDI, D.; MAUNDER, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, p. 293-301, 1995.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, 1987.

INOUE, G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. **J Infect Chemother**, v. 6, p. 51-60, 2000.

IVANOVA, M. M.; MAZHAWIDZA, W.; DOUGHERTY, S. M.; MINNA, J. D.; KLINGE, C. M. Activity and intracellular location of estrogen receptors alpha and beta in human bronchial epithelial cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 305, n. 1-2, p. 12-21, 2009.

IWASAKI, A. and MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, p. 987-995, 2004.

JANEWAY, C. A. and MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JEFFERY, P. K.; WARDLAW, A. J.; NELSON, F. C.; COLLINS, J. V.; KAY, A. B. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. **The American review of respiratory disease**, v. 140, n. 6, p. 1745-53, 1989.

JOHNSTON, R. A. et al. Diet-induced obesity causes innate airway hyperresponsiveness to methacholine and enhances ozone-induced pulmonary inflammation. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, p. 1727-35, 2008.

JONASSON, S. et al. Allergen-induced formation of F(2)-isoprostanes in a murine asthma model identifies oxidative stress in acute airway inflammation in vivo. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, p. 1-7, 2009b.

JONASSON, S. et al. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 165, p. 229-36, Feb 28 2009a.

KAGAN, J. C.; SU, T.; HORNG, T.; CHOW, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nature Immunology**, v. 9, p. 361-8, 2008.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, p. 115-22, 1999.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, p. 637-650, 2011.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 154, n. 3, p. 631-9, 1981.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **American journal of clinical pathology**, v. 100, n. 5, p. 567-75, 1993.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 738-47, 2006.

KIM, K. et al. Induced hypothermia attenuates the acute lung injury in hemorrhagic shock. **The Journal of Trauma**, v. 68, p. 373-381, 2010.

KIM, S. R. et al. Involvement of sirtuin 1 in airway inflammation and hyperresponsiveness of allergic airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 449-60, 2010.

KITAZAWA, R.; KIMBLE, R. B.; VANNICE, J. L.; KUNG, V. T.; PACIFICI, R. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 6, p. 2397-406, 1994.

KLEINERT, H.; EUCHENHOFER, C.; IHRIG-BIEDERT, I.; FÖRSTERMANN, U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 11, p. 6039-44, 1996.

KNÖFERL, M. W.; ANGELE, M. K.; DIODATO, M. D.; SCHWACHA, M. G.; AYALA, A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. **Annals of Surgery**, v. 235, p. 105-12, 2002.

KNÖFERL, M. W.; JARRAR, D.; ANGELE, M. K.; AYALA, A.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. 17beta-estradiol normalizes immune responses in ovariectomized females after trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology. Cellular Physiology**, v. 281, p. 1131-8, 2001.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical journal**, v. 298 (Pt 2, p. 249-58, 1994.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5159-62, 1989.

KOEHLER, K. F.; HELGUERO, L. A.; HALDOSÉN, L.-A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-A. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 3, p. 465–78, 2005.

KOMORI, S.; ITAGAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol act on common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **European journal of pharmacology**, v. 277, n. 2-3, p. 173–80, 1995.

KONO, H.; WHEELER, M. D.; RUSYN, I.; LIN, M.; SEABRA, V.; RIVERA, C. A.; BRADFORD, B. U.; FORMAN, D. T.; THYRMAN, R. G. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 278, p. 652-61, 2000.

KOSHLAND, D. E. The molecule of the year. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5090, p. 1861, 1992.

KOTANI, S. H. et al. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an Escherichia coli Re-mutant. **Infect. Immun.**, v. 49, p.225-237, 1985.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. The function of neutrophils in sepsis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 3, p. 321–7, 2012.

KSONTINI, R.; MACKAY, S. L.; MOLDAWER, L. L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 133, n. 5, p. 558–67, 1998.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 11, p. 4651–5, 1991.

KÜHN, R.; LÖHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263–74, 1993.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925–30, 1996.

KUMAGAI, Y.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate receptors. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, p. 86-92, 2008.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **The Biochemical Journal**, v. 420, p. 1-16, 2009.

KUNKEL, S. L.; STRIETER, R. M.; LINDLEY, I. J.; WESTWICK, J. Chemokines: new ligands, receptors and activities. **Immunology today**, v. 16, n. 12, p. 559–61, 1995.

KUO, H. P.; LIU, S.; BARNES, P. J. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. **European journal of pharmacology**, v. 221, n. 2-3, p. 385–8, 1992.

LAING, K. J.; SECOMBES, C. J. Chemokines. **Developmental and comparative immunology**, v. 28, n. 5, p. 443–60, 2004.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 14, p. 6348–52, 1992.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211–20, 2009.

LARCOMBE, A. N. et al. Absence of cholinergic airway tone in normal BALB/c mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 161, p. 223–9, 2008.

LEE, A.; WHYTE, M. K.; HASLETT, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **Journal of leukocyte biology**, v. 54, n. 4, p. 283–8, 1993.

LEE, J. I.; BURCKART, G. J. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. **Journal of clinical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 981–93, 1998.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. **Current opinion in critical care**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2001.

LEFORT, J.; MOTREFF, L.; VARGAFTIG, B. B. Airway administration of *Escherichia coli* endotoxin to mice induces glucocorticosteroid-resistant bronchoconstriction and vasopermeation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, p. 345–51, 2001.

LEFORT, J.; SINGER, M.; LEDUC, D.; RENESTO, P.; NAHORI, M. A.; HUERRE, M.; CRÉMINON, C.; CHIGNARD, M.; VARGAFTIG, B. B. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyperreactivity dissociated from TNF- α formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 474–80, 1998.

LEICK-MALDONADO, E. A.; KAY, F. U.; LEONHARDT, M. C.; et al. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 34, n. 1, p. 145–52, 2004.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973–83, 1996.

LESER, H. G.; GROSS, V.; SCHEIBENBOGEN, C.; et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 101, n. 3, p. 782–5, 1991.

LEVAN, T. D.; BLOOM, J. W.; BAILEY, T. J.; KARP, C. L.; HALONEN, M.; MARTINEZ, F. D.; VERCELLI, D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 5838-44, 2001.

LEWANDOWSKI, K. and LEWANDOWSKI, M. Epidemiology of ARDS. **Minerva Anestesiologica**, v. 72, p. 473-7, 2006.

LI, G.; MALINCHOC, M.; CARTIN-CEBA, R.; et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 1, p. 59–66, 2011.

LI, X. Y.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability: the role of nitric oxide. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 4 Pt 1, p. 1027–33, 1998.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; DA SILVA, Z. L.; BORELLI, P.; TAVARES DE LIMA, W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 20-7, 2004.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; PERON, J. P. S.; SANTOS FRANCO, A. L.; et al. Ovariectomized OVA-sensitized mice display increased frequency of CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells in the periphery. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65674, 2013.

LIM, D. H. et al. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 291, p. 265-71, 2006.

LINDLEY, I. J. D.; WESTWICK, J.; KUNKEL, S. L. The Chemokines: Biology of the Inflammatory Peptide Supergene Family (II). **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.351, 1993.

LINO DOS SANTOS FRANCO, A.; DAMAZO, A. S.; BERALDO DE SOUZA, H. R.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; OLIANI, S. M.; COSTA, S. K.; TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicol Appl Pharmacology**, v. 214, p. 35-42, 2006.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; AMEMIYA, R. M.; LIGEIRO DE OLIVEIRA A. P.; BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; DAMAZO A. S.; OLIVEIRA-FILHO RM, TAVARES-DE-LIMA W. Differential effects of female sex hormones on cellular recruitment and tracheal reactivity after formaldehyde exposure. **Toxicol Lett**, v. 205, p. 327-35, 2011.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; CORREA-COSTA, M.; DURÃO, A. C. C. DOS S.; et al. Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. **Toxicology letters**, v. 207, n. 3, p. 278–85, 2011.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA, A. P. L. et al. Differential effects of formaldehyde exposure on the cell influx and vascular permeability in a rat model of allergic lung inflammation. **Toxicology letters**, v. 197, n. 3, p. 211–8, 2010.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; GIMENES-JÚNIOR, J. A.; LIGEIRO-DE-OLIVEIRA, A. P.; et al. Formaldehyde inhalation reduces respiratory mechanics in a rat model with allergic lung inflammation by altering the nitric oxide/cyclooxygenase-derived products relationship. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 731–8, 2013.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; SHIA, M. K.; DOMINGOS, H. V.; BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; DE OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES-DE-LIMA, W. Connective tissue mast cells are the target of formaldehyde to induce tracheal hyperresponsiveness in rats: putative role of leukotriene B₄ and nitric oxide. **Toxicol Lett.**, v. 192, p. 85-90, 2010.

LIU, H.-C.; HSIA, C. Y. Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 25, n. 8, p. 767–80, 2003.

LIU, Z.; YANG, Z.; FU, Y.; et al. Protective effect of gossypol on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society**, v. 62, n. 5, p. 499–506, 2013.

LUH, S. P.; CHIANG, C. H. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. **Journal of Zhejiang University. Science B.**, v. 8, p. 60-9, 2007.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England journal of medicine**, v. 338, n. 7, p. 436–45, 1998.

MACNAUL, K. L.; HUTCHINSON, N. I. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 196, n. 3, p. 1330–4, 1993.

MAKITA, H.; NISHIMURA, M.; MIYAMOTO, K.; NAKANO, T.; TANINO, Y.; HIROKAWA, J.; NISHIHARA, J.; KAWAKAMI, Y. Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, p. 573-9, 1998.

MALLAT, Z.; BESNARD, S.; DURIEZ, M.; et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. **Circulation research**, v. 85, n. 8, p. e17–24, 1999.

MANCERO, J.; FERNÁNDEZ, R.; BLANCH, L.; et al. A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 11, p. 1233–9, 2006.

MANIATIS, N. A.; ORFANOS, S. E. The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Current opinion in critical care**, v. 14, n. 1, p. 22–30, 2008.

MARINI, J. J. Unproven clinical evidence in mechanical ventilation. **Current opinion in critical care**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2012.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231–4, 1993.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–30, 1994.

MARQUES, R. H.; REIS, F. G.; STARLING, C. M.; et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates physical stress-induced lung hyper-responsiveness and oxidative stress in animals with lung inflammation. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, n. 3, p. 158–70, 2012.

MARRIOTT, I.; BOST, K. L.; HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, p. 12-27, 2006.

MARTIN, T. R. Cytokines and lung injury: searching for useful biomarkers. **Critical care medicine**, v. 33, n. 1, p. 230–2, 2005.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; ANGER, D. B. C.; et al. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. **Shock**, v. 33, n. 1, p. 76–82, 2010.

MARTINS, J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; et al. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 31, n. 4, p. 404–9, 2009.

MATSUBARA, S.; SWASEY, C. H.; LOADER, J. E.; et al. Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 501–8, 2008.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, p. 379-399, 2008.

MATUTE-BELLO, G.; DOWNEY, G.; MOORE, B. B.; GROSHONG, S. D.; MATTHAY, M. A.; SLUTSKY, A.S.; KUEBLER, W. M. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 44, p. 725-738, 2011.

MAURER, M.; STEBUT, E. VON. Macrophage inflammatory protein-1. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 10, p. 1882–6, 2004.

MCGLADE, J. P. et al. Suppression of the asthmatic phenotype by ultraviolet B-induced, antigen-specific regulatory cells. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 1267-76, 2007.

MCGOWAN, J. E.; BARNES, M. W.; FINLAND, M. Bacteremia at Boston City Hospital: occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972) with special reference to hospital-acquired cases. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 132, p. 316-35, 1975.

MCINTYRE, R. C.; PULIDO, E. J.; BENSARD, D. D.; SHAMES, B. D.; ABRAHAM, E. Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 28, n. 9, p. 3314-31, 2000.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-7, 1997.

MELDRUM, D. R. Estrogen increases protective proteins following trauma and hemorrhage. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Corporative Physiology**, v. 290, p. 809-11, 2006.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5728, p. 1583-7, 2005.

MEURS, H.; GOSENS, R.; ZAAGSMA, J. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. **The European respiratory journal**, v. 32, n. 2, p. 487-502, 2008.

MEURS, H.; MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 9, p. 450-5, 2003.

MEYLAN, E.; BURNS, K.; HOFMANN, K.; BLANCHETEAU, V.; MARTINON, F.; KELLIHER, M.; TSCHOPP, J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. **Nature Immunology**, v. 5, p. 503-7, 2004.

MICHEL, O.; KIPS, J.; DUCHATEAU, J.; VERTONGEN, F.; ROBERT, L.; COLLET, H.; PAUWELS, R.; SERGYSELS, R. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. **American Journal of Physiology and Critical Care Medicine**, v. 154, p. 1641-6, 1996.

MICHEL, T.; LI, G. K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6252-6, 1993.

MILLER, L.; ALLEY, E. W.; MURPHY, W. J.; RUSSELL, S. W.; HUNT, J. S. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 3, p. 442-50, 1996.

MILTON, P. L.; DICKINSON, H.; JENKIN, G.; LIM, R. Assessment of Respiratory Physiology of C57BL/6 Mice following Bleomycin Administration Using Barometric Plethysmography. **Respiration**, 2011.

MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 3, p. 1087-94, 2002.

MOEINPOUR, F.; CHOUDHRY, M. A.; KAWASAKI, T.; TIMARES, L.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. 17 β -estradiol normalizes Toll receptor 4, mitogen activated protein kinases and inflammatory response in epidermal keratinocytes following trauma-hemorrhage. **Molecular Immunology**, v. 44, p.3317-23, 2007.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 240-73, 2009.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 2, p. 137-42, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709-15, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MOORE, P. K.; AL-SWAYEH, O. A.; CHONG, N. W.; EVANS, R. A.; GIBSON, A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 408-12, 1990.

MOR, G.; SAPI, E.; ABRAHAMS, V. M.; et al. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 1, p. 114-22, 2003.

MORIYA, H. T. **Contribuições não lineares e aproximação do domínio do tempo do modelo de fase constante na mecânica respiratória em camundongos**. 112 f. (Tese) Doutorado em Engenharia Biomédica - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends in immunology**, v. 25, n. 2, p. 75-84, 2004.

MOSS, M.; MANINO, D. M. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: an analysis of multiple cause mortality data. **Critical Care Medicine**, v. 30, p. 1679-85, 2002.

MOSS, M.; MANNINO, D. M. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: an analysis of multiple-cause mortality data (1979-1996). **Critical care medicine**, v. 30, n. 8, p. 1679-85, 2002.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS letters**, v. 392, n. 1, p. 49-53, 1996.

MOXLEY, G.; STERN, A. G.; CARLSON, P.; ESTRADA, E.; HAN, J.; BENSON, L. L. Premenopausal sexual dimorphism in lipopolysaccharide-stimulated production and secretion of tumor necrosis factor. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, p. 686-94, 2004.

MUL, F. P.; ZUURBIER, A. E.; JANSSEN, H.; et al. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 68, n. 4, p. 529–37, 2000.

MÜLSCH, A.; BUSSE, R. NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 341, n. 1-2, p. 143–7.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VAN'T VEER, C.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L. P.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 5998-6004, 2000.

NAVA, E.; LÜSCHER, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 13, n. 2, p. S39–48, 1995.

NICOD, L. P. Cytokines. 1. Overview. **Thorax**, v. 48, n. 6, p. 660–7, 1993.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 123, n. 3, p. 333–9, 2002.

NOVELLA, S.; DANTAS, A. P.; SEGARRA, G.; et al. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 11, p. 1329–37, 2013.

NOVELLA, S.; DANTAS, A. P.; SEGARRA, G.; MEDINA, P.; HERMENEGILDO, C. Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth? **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 165, 2012a.

NOVELLA, S.; HERAS, M.; HERMENEGILDO, C.; DANTAS, A. P. Effects of estrogen on vascular inflammation: a matter of timing. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, n. 8, p. 2035–42, 2012b.

NOVENSÀ, L.; NOVELLA, S.; MEDINA, P.; et al. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. **PLoS one**, v. 6, n. 9, p. e25335, 2011.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 425–8, 2007.

O'NEILL, L. A. and BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domains-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 353-64, 2007.

OBERHOLZER A.; KEEL, M.; ZELLWEGER, R.; STECKHOLZER, U.; TRENTZ O.; ERTEL, W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. **The Journal of Trauma**, v. 48, p. 932-7, 2000.

OLIVEIRA, R. H. R.; BASILLE FILHO, A. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. **Jornal brasileiro de pneumologia : publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 32, n. 1, p. 35–42.

PACIFICI, R.; RIFAS, L.; MCCracken, R.; et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 7, p. 2398–402, 1989.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–6.

PASARE, C. and MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 560, p. 11–8, 2005.

PASCOE, C. D.; WANG, L.; SYYONG, H. T.; PARÉ, P. D. A Brief History of Airway Smooth Muscle's Role in Airway Hyperresponsiveness. **Journal of allergy**, v. 2012, p. 768982, 2012.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–70, 2004.

PETÁK, F.; HANTOS, Z.; ADAMICZA, A.; ASZTALOS, T.; SLY, P. D. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 82, n. 5, p. 1479–87, 1997.

PETTY, T. L.; ASHBAUGH, D. G. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. **Chest**, v. 60, n. 3, p. 233–9, 1971.

PHOENIX, S. I.; PARAVASTU, S.; COLUMB, M.; VINCENT, J.-L.; NIRMALAN, M. Does a higher positive end expiratory pressure decrease mortality in acute respiratory distress syndrome? A systematic review and meta-analysis. **Anesthesiology**, v. 110, n. 5, p. 1098–105, 2009.

PINELLI, V.; MARCHICA, C. L.; LUDWIG, M. S. Allergen-induced asthma in C57Bl/6 mice: Hyper-responsiveness, inflammation and remodelling. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 169, p. 36–43, 2009.

PLIYEV, B. K. Chemotactically active proteins of neutrophils. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 9, p. 970–84, 2008.

POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; HE, X.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; MCNALLY, O.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; DU, X.; THOMPSON, P.; CHAN, E. K.; LEDESMA, J.; ROE, B.; CLIFTON, S.; VOGEL, S. N.; BEUTLER, B. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 24, p. 340–55, 1998.

POSTMA, D. S.; BLEECKER, E. R.; AMELUNG, P. J.; et al. Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. **The New England journal of medicine**, v. 333, n. 14, p. 894–900, 1995.

PRADO, C. M.; LEICK-MALDONADO, E. A.; ARATA, V.; et al. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 288, n. 4, p. L741–8, 2005.

PRADO, C. M.; LEICK-MALDONADO, E. A.; YANO, L.; et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 457–65, 2006.

PRADO, C. M.; MARTINS, M. A.; TIBÉRIO, I. F. L. C. Nitric oxide in asthma physiopathology. **ISRN allergy**, v. 2011, p. 832560, 2011.

PROUST, B.; NAHORI, M. A.; RUFFIE, C.; LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic Balb/c and IL-4 α knockout mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 119-131, 2003.

QUINTAR, A. A.; ROTH, F. D.; DE PAUL, A. L.; AOKI, A.; MALDONADO, C. A. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 664-72, 2006.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5193–7, 1990.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 746–52, 1990.

REISS, L. K.; UHLIG, U.; UHLIG, S. **Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults**. *European journal of cell biology*, v. 91, p. 590-601, 2012.

REMICK, D. G.; BOLGOS, G.; COPELAND, S.; SIDDIQUI, J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2751–7, 2005.

RETTEW, J. A.; HUET, Y. M.; MARRIOTT, I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility *in vivo*. **Endocrinology**, v. 150, p. 3877-84, 2009.

RETTEW, J. A.; HUET-HUDSON, Y. M.; MARRIOTT, I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of Toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 432-7, 2008.

REUTERSHAN, J.; BASIT, A.; GALKINA, E. V.; LEY, K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury.

American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 289, p. 807-15, 2005.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 6, p. 453-61, 2004.

RIBEIRO, A. et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. **Eur J Pharmacol.**, v. 678, p. 78-85, 2012.

RICCIARDOLO, F. L. M. Multiple roles of nitric oxide in the airways. **Thorax**, v. 58, n. 2, p. 175-82, 2003.

RICCIARDOLO, F. L. M.; STERK, P. J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-65, 2004.

RIESENFELD, E. P. et al. Inhaled salmeterol and/or fluticasone alters structure/function in a murine model of allergic airways disease. **Respiratory Research**, v. 11, 2010.

RIFFO-VASQUEZ, Y.; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; PAGE, C. P.; SPINA, D.; TAVARES DE LIMA, W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 459-70, 2007.

RINCON, M.; IRVIN, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 9, p. 1281-90, 2012.

RIO-SANTOS, F.; BENJAMIM, C. F.; ZAVERY, D.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v. 19, p. 61-5, 2003.

ROCCO, P. R. M.; PELOSI, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? **Current opinion in critical care**, v. 14, n. 1, p. 50-5, 2008.

ROGER, T.; DAVID, J.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. **Nature**, v. 414, p. 920-4, 2001.

RUBINI, A.; BONDÌ, M. Effect of the oestral cycle on respiratory mechanics in the rat. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 189, n. 4, p. 379-83, 2007.

RUIZ-JÚNIOR, R. L.; CARVALHO, L. R.; CATANEO, A. J. M. Crescimento pulmonar compensatório (CPC): massa corpórea, conteúdo protéico e massa pulmonares em ratos subnutridos trilobectomizados. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, p. 146 - 152, 2004.

RUSSO, M.; NAHORI, M. A.; LEFORT, J.; GOMES, E.; DE CASTRO KELLER, A.; RODRIGUEZ, D.; RIBEIRO, O. G.; ADRIOYCH, S.; GALLOIS, V.; DE FARIA, A. M.; VARGAFTIG, B. B. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, p. 518-26, 2001.

RYLANDER, R.; BAKE, B.; FISCHER, J. J.; HELANDER, I. M. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 140, p. 981-6, 1989.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–60, 2011.

SALERNO, F. G.; LUDWIG, M. S. Effect of the route and mode of agonist delivery on functional behaviour of the airways. **Respiration physiology**, v. 106, n. 1, p. 71–80, 1996.

SALES-JÚNIOR, J. A. L.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; DIAS, M. D. A.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, p. 9-17, 2006.

SALEZ, L.; BALLOY, V.; VAN ROOIJEN, N.; LEBASTARD, M.; TOUQUI, L.; MCCORMACK, F. X.; CHIGNARD, M. Surfactant protein A suppresses lipopolysaccharide-induced IL-10 production by murine macrophages. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 6376–82, 2001.

SALZMAN, A. L.; LINN, S. C.; SZABO, C. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in human intestinal epithelial cells. **International journal of molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 209–16, 2000.

SANCÉAU, J.; KAISHO, T.; HIRANO, T.; WIETZERBIN, J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 46, p. 27920–31, 1995.

SANCTIS, G. T. DE; MERCHANT, M.; BEIER, D. R.; et al. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. **Nature genetics**, v. 11, n. 2, p. 150–4, 1995.

SANDSTRÖM, T.; BJERMER, L.; RYLANDER, R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects causes bronchoalveolar neutrophilia, lymphocytosis, and fibronectin increase. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 25, p. 103-4, 1994.

SÁRVÁRI, M.; HRABOVSKY, E.; KALLÓ, I.; et al. Menopause leads to elevated expression of macrophage-associated genes in the aging frontal cortex: rat and human studies identify strikingly similar changes. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 264, 2012.

SATO, S.; SUGIYAMA, M.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, Y.; KAWAI, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 4304-10, 2003.

SCHULTHEIS, A. H.; BASSETT, D. J.; FRYER, A. D. Ozone-induced airway hyperresponsiveness and loss of neuronal M2 muscarinic receptor function. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 76, n. 3, p. 1088–97, 1994.

SCHUSTER, D. P. What Is Acute Lung Injury? What is ARDS? **Chest**, v. 107, p. 1721-6, 1995.

SCHÜTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **The European respiratory journal**, v. 9, n. 9, p. 1858–67, 1996.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical care (London, England)**, v. 7, n. 4, p. 291–307, 2003.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.

SELLON, R. K.; TONKONOGY, S.; SCHULTZ, M.; et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5224–31, 1998.

SEMENOV, I.; HERLIHY, J. T.; BRENNER, R. In vitro measurements of tracheal constriction using mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, , n. 64, 2012.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705–16, 1986.

SHALABY, K. H. et al. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. **Respiratory Research**, v. 11, 2010.

SHAW, J.; DECATANZARO, D. Estrogenicity of parabens revisited: impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. **Reproductive toxicology**, v. 28, n. 1, p. 26–31, 2009.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1777-82, 1999.

SICA, A.; WANG, J. M.; COLOTTA, F.; et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 8, p. 3034–8, 1990.

SILVA, E.; PEDRO, M. DE A.; SOGAYAR, A. C. B.; et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. R251–60, 2004.

SIROIS, M. G.; JANCAR, S.; BRAQUET, P.; PLANTE, G. E.; SIROIS, P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN52021 and L-655,240. **Prostaglandins**, v. 36, p. 631-44, 1988.

SLY, P. D.; WILLET, K. E.; KANO, S.; LANTERI, C. J.; WALE, J. Pirenzepine blunts the pulmonary parenchymal response to inhaled methacholine. **Pulmonary pharmacology**, v. 8, n. 2-3, p. 123–9, 1995.

SMALL, R. C.; BERRY, J. L.; BURKA, J. F.; et al. Potassium channel activators and bronchial asthma. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 22, n. 1, p. 11–8, 1992.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. **Annual review of physiology**, v. 52, p. 857–74, 1990.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–6, 1994.

SPEYER, C. L.; RANCILIO, N. J.; MCCLINTOCK, S. D.; CRAWFORD, J. D.; GAO, H.; SARMA, J. V.; WARD, P. A. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 288, p. 881-90, 2005.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record**, v. 254, p. 116-26, 1999.

STARLING, C. M.; PRADO, C. M.; LEICK-MALDONADO, E. A.; et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 165, n. 2-3, p. 185–94, 2009.

STEINBERG, K. P.; HUDSON, L. D.; GOODMAN, R. B.; et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 16, p. 1671–84, 2006.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14533–6, 2001.

SU, L.; SUN, Y.; MA, F.; et al. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. **Immunology letters**, v. 125, n. 2, p. 151–5, 2009.

SULTZER, B. M.; CASTAGNA, R.; BANDEKAR, J.; WONG, P. Lipopolysaccharide nonresponder cells: the C3H/HeJ defect. **Immunobiology**, v. 187, p. 257-71, 1993.

SUN, Y.; CAI, J.; MA, F.; et al. miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. **Immunology letters**, v. 146, n. 1-2, p. 25–30, 2012.

SWEDIN, L. et al. Comparison of Aerosol and Intranasal Challenge in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 153, p. 249-58, 2010.

SYLVESTER, J. T. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 287, n. 4, p. L624–30, 2004.

SZARKA, R. J.; WANG, N.; GORDON, L.; NATION, P. N.; SMITH, R. H. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **Journal of immunological methods**, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TAM, A.; MORRISH, D.; WADSWORTH, S.; et al. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. **BMC women's health**, v. 11, p. 24, 2011.

TANG, W. W.; YI, E. S.; REMICK, D. G.; et al. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. IX. Contribution of CD11a/ICAM-1 to neutrophil emigration. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 5 Pt 1, p. L653–9, 1995.

TANINO, Y.; MAKITA, H.; MIYAMOTO, K.; BETSUYAKU, T.; OHTSUKA, Y.; NISHIHARA, J.; NISHIMURA, M. Role of macrophage migration inhibitory factor in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, p. 156-62, 2002.

TAVAF-MOTAMEN, H.; MINER, T. J.; STARNES, B. W.; SHEA-DONOHUE, T. Nitric oxide mediates acute lung injury by modulation of inflammation. **The Journal of surgical research**, v. 78, n. 2, p. 137–42, 1998.

TAVARES DE LIMA, W.; STEIL, A. A.; RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; TEIXEIRA, C. F.; JANCAR, S. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 358, p. 69-75, 1998.

TEMPLE S. E.; PHAM, K.; GLENDENNING, P.; PHILLIPS, M.; WATERER, G. W. Endotoxin induced TNF and IL-10 mRNA production is higher in male than female donors: correlation with elevated expression of TLR4. **Cellular Immunology**, v. 251, p. 69-71, 2008.

THAMRIN, C. et al. Sensitivity analysis of respiratory parameter estimates in the constant-phase model. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 815-22, 2004.

THANOS, D. and MANIATIS, T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. **Cell**, v. 83, p. 1091-100, 1995.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; DOZ, E.; NOULIN, N.; JANOT, L.; SECHER, T.; GASSE, P.; LIMA, C.; COELHO, F. R.; VASSEUR, V.; ERARD, F.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I.; MOSER, R. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 387-91, 2007.

TOMIOKA, S.; BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillations. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p. 263-70, 2002.

TREMBLAY, G. B.; TREMBLAY, A.; COPELAND, N. G.; et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, n. 3, p. 353-65, 1997.

TREMBLAY, L. N.; SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 1, p. 24-33, 2006.

TSUSHIMA, K.; KING, L. S.; AGGARWAL, N. R.; et al. Acute lung injury review. **Internal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 48, n. 9, p. 621-30, 2009.

ULICH, T. R.; HOWARD, S. C.; REMICK, D. G.; et al. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. L245-50, 1995.

ULICH, T. R.; WATSON, L. R.; YIN, S. M.; et al. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 6, p. 1485-96, 1991a.

ULICH, T. R.; YIN, S.; GUO, K.; et al. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 5, p. 1097-101, 1991b.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 693-733, 2009.

VASTA, V.; MEACCI, E.; FARNARARO, M.; BRUNI, P. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 206, n. 3, p. 878-84, 1995.

VEGETO, E.; GHISLETTI, S.; MEDA, C.; ETTERI, S.; BELCREDITO, S.; MAGGI, A. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17beta-estradiol in macrophage cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, p. 59-66, 2004.

WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G. R.; INOUE, J.; CHEN, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v. 412, p. 346-51, 2001.

WARD, D. T.; LAWSON, S. A.; GALLAGHER, C. M.; CONNER, W. C.; SHEA-DONOHUE, T. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. **The Journal of surgical research**, v. 89, n. 1, p. 13-9, 2000.

WARDLAW, A. J.; DUNNETTE, S.; GLEICH, G. J.; COLLINS, J. V.; KAY, A. B. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma.

Relationship to bronchial hyperreactivity. **The American review of respiratory disease**, v. 137, n. 1, p. 62–9, 1988.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 6, p. 1376–83, 2001.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of internal medicine**, v. 235, n. 4, p. 317–27, 1994.

WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O. Chemische Erforschung von Lipopolysaccharide Gram-negative Bakterien. **Anger. Chem.** v. 66, p. 407–417, 1954.

WICHMANN, M. W.; ZELLWEGE, R.; DEMASO, C. M.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Enhanced immune responses in females as opposed to decreased responses in males following hemorrhagic shock. **Cytokine**, v. 8, p. 853–63, 1996.

WIEDEMANN, H. P.; WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R.; et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 24, p. 2564–75, 2006.

WIEDERMANN, F. J.; MAYR, A. J.; KANEIDER, N. C.; et al. Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS. **Chest**, v. 125, n. 1, p. 212–9, 2004.

WIENER-KRONISH, J. P.; ALBERTINE, K. H.; MATTHAY, M. A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 3, p. 864–75, 1991.

WILLS-KARP, M.; EWART, S. L. The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 4 Pt 2, p. S89–96, 1997.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 6, p. 1430–42, 2000.

WONG, G. K.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology, dialysis, transplantation**, v. 11, n. 1, p. 215–20, 1996.

XIONG, Y.; KARUPIAH, G.; HOGAN, S. P.; FOSTER, P. S.; RAMSAY, A. J. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 1, p. 445–52, 1999.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v. 301, p. 640–3, 2003.

YI, E. S.; REMICK, D. G.; LIM, Y.; TANG, W.; NADZIENKO, C. E.; BEDOYA, A.; YIN, S.; ULICH, T. R. The intratracheal administration of endotoxin: X. Dexamethasone

downregulates neutrophil emigration and cytokine expression *in vivo*. **Inflammation**, v. 20, p. 165-75, 1996.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S.; et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9233–7, 1987.

YUNHE, F.; BO, L.; XIAOSHENG, F.; et al. The effect of magnolol on the Toll-like receptor 4/nuclear factor κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **European journal of pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 255–61, 2012.

ZAREMBER, K. A. and GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 554-61, 2002.

ZHANG, S. Y.; JOUANGUY, E.; SANCHO-SHIMIZU, V.; VON BERNUTH, H.; YANG, K.; ABEL, L.; PICARD, C.; PUEL, A.; CASANOVA, J. L. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. **Immunological Reviews**, v. 220, p. 225-36, 2007.

ZOSKY, G. R. et al. Airway hyperresponsiveness is associated with activated CD4 (+) T cells in the airways. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, p. 373-L9, 2009.

ZOSKY, G. R. et al. Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 829-38, 2008.