NOEMI LOURENÇO GIL

PARTICIPAÇÃO DA CORTICOSTERONA NA INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR DE RATOS COM BAIXO PESO AO NASCER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

NOEMI LOURENÇO GIL

PARTICIPAÇÃO DA CORTICOSTERONA NA INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR DE RATOS COM BAIXO PESO AO NASCER

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Richardt Gama Landgraf

Versão original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gil, Noemi
PARTICIPAÇÃO DA CORTICOSTERONA NA INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR DE RATOS COM BAIXO PESO AO NASCER / Noemi Gil; orientador Richardt Landgraf; coorientador Maristella Landgraf. -- São Paulo, 2016.
82 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Baixo peso ao nascer. 2. Inflamação. 3. Corticosterona. 4. Desnutrição. 5. Lesão pulmonar aguda . I. Landgraf, Richardt , orientador. II. Landgraf, Maristella, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Noemi Lourenço Gil

Titulo da Dissertação/Tese: Participação da corticosterona na inflamação aguda pulmonar de ratos com baixo peso ao nascer

Orientador: Prof. Dr. Richardt Gama Landgraf

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **76** nas fls. **21** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Richardt Gama Landgraf,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudos in vivo da interação leptina/corticosterona em ratos Wistar nutridos e desnutridos intrauterinamente*" do qual participam o(s) aluno(s) **Noemi Lourenço Gil** e a Jovem pesquisadora **Maristella Almeida Vitta Landgraf,** 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 NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **22.08.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 28 de agosto de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

, 19 de agosto de 2016
CEUA N 1566150416

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Richardt Gama Landgraf
Depto/Disc: Depto Ciências Biológicas
Pesquisadores associados: Gabriela Araujo De Azevedo (universidade Federal De São Paulo); Noemi Lourenço Gil (universidade Federal De São Paulo); Richardt Gama Landgraf (orientador)

Título do projeto: "PARTICIPAÇÃO DA CORTICOSTERONA NA INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR DE RATOS DESNUTRIDOS IN UTERO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A desnutrição no período gestacional pode comprometer o desenvolvimento fetal e prejudicar a maturação do sistema imune, exercendo efeito negativo prolongado sobre a resposta imunológica. Em estudos anteriores, observamos que animais desnutridos intrauterinamente de 12 semanas, apresentaram redução da resposta inflamatória aguda associada à redução da expressão de ICAM-1 e uma aumentada concentração de corticosterona circulante. O presente estudo utiliza-se deste modelo para investigar a influência da corticosterona sobre a resposta inflamatória pulmonar aguda. Para isso os animais nutridos e desnutridos intrauterinamente serão submetidos à adrenalectomia e receberão corticosterona exógena em níveis fisiológicos; então serão submetidos ao processo de inflamação pulmonar com LPS e posteriormente será análisado o infiltrado celular no tecido pulmonar, a produção de muco e colágeno, a expressão proteica do receptor de corticosterona, a produção de mediadores lipídicos e de citocinas e quimiocinas inflamatórias. A compreensão do papel da corticosterona na resposta inflamatória poderá ser de grande importância no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes.

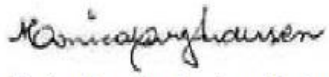
ANIMAIS
Serão utilizados:
20 ratos heterogênicos Wistar, machos 250-350 g, 10-12 semanas.
Procedência: CEDEME
Manutenção: Biotério Central do Campus Diadema

60 ratos heterogênicos Wistar, fêmeas, 250-350 g, 10-12 semanas.
Procedência: CEDEME
Manutenção: Biotério Central do Campus Diadema

Cronograma: junho/2016 com término previsto para: junho/2018

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 11/07/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente



Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Aos meus queridos pais Creuza e Mário, que sempre depositaram em mim suas confianças, e me concederam um grande suporte emocional, financeiro e familiar, fazendo com que eu sempre me sentisse capaz de transpor barreiras, e assim, poder obter conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas portas abertas, boas oportunidades, e excelentes pessoas que tem colocado em meu caminho, além da força concedida para enfrentar os desafios dos dias que compreenderam o processo de mestrado.

Aos meus queridos pais, irmãos, cunhada, sobrinhos e tias, por me amarem e me apoiarem sempre.

Ao Prof. Dr. Richardt Landgraf, pela oportunidade, inteira disposição em atuar como orientador, pela paciência e amizade.

À Profa. Dra. Liliam Fernandes, que me abriu as portas do Laboratório de Inflamação e Farmacologia Vascular (LINFAVA), me permitindo ter a primeira experiência dentro de um laboratório de pesquisa, ainda na Iniciação Científica, se propondo a me ensinar, e me permitindo desenvolver profissionalmente com responsabillidade.

À Profa. Dra. Maristella Landgraf, pela coorientação, e grande auxílio nos estudos e experimentos.

Ao Aleksandro Balbino, por me auxiliar em experimentos longos e complexos com boa vontade, e pela amizade. E à Gabriela Araújo, pelo carinho, confiança e amizade, pelo tempo em que passamos trabalhando juntas no laboratório aprendendo mutuamente.

Ao enorme suporte e amizade que recebi da Cláudia Anjos, Tathiany Torres, Marina Matos e Ana Paula Almeida durante todo o período em que estive no laboratório.

Sou grata, afinal, a toda a equipe do LINFAVA, pela maravilhosa convivência, confiança e colaboração no ambiente de trabalho.

Agradeço imensamente as minhas amigas de graduação, que ainda se fazem presentes: Tássia Hanashiro, Joyce de Paula Souza, Beatriz Pesco, Karina Fudimura, Vera Lygia El ID, e Mayra Domiciano.

"A verdadeira ciência ensina sobretudo a duvidar e a ser ignorante."

Miguel de Unamuno y Jugo

RESUMO

GIL, N.L. **Participação da corticosterona na inflamação aguda pulmonar de ratos com baixo peso ao nascer**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A desnutrição no período gestacional pode comprometer o desenvolvimento fetal e prejudicar a maturação do sistema imune, exercendo efeito negativo prolongado sobre a resposta imunológica. Ratos Wistar de 12 semanas com baixo peso ao nascer, oriundos de mães desnutridas durante a gestação, apresentam resposta inflamatória pulmonar reduzida, e concentração de corticosterona circulante elevada. O presente estudo utilizou-se deste modelo para investigar a influência da corticosterona sobre a resposta inflamatória pulmonar aguda. Retirou-se ambas as adrenais, e após sete dias de reposição de corticosterona em doses fisiológicas, induziu-se lesão pulmonar aguda com LPS i.n. Os resultados obtidos através da contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar, e da análise histopatológica, mostraram que a redução de corticosterona por adrenalectomia promoveu o aumento do infiltrado de leucócitos para o pulmão em animais de baixo peso ao nascer. Além disso, aumentou-se também a produção de IL-6 e MIP-2 no pulmão, e apesar da produção de TNF-α ser semelhante a dos animais de peso normal ao nascer, a adrenalectomia e reposição de corticosterona em doses fisiológicas promoveu uma maior produção desta citocina nos animais de baixo peso ao nascer; não houve diferença entre os grupos na produção de IL-1β. Os animais de baixo peso ao nascer desenvolvendo lesão pulmonar aguda passaram a expressar mais COX-2 e 5-LO e a secretar mais LTB_4 e PGE_2 após a redução de corticosterona por adrenalectomia. Quanto a regulação da corticosterona, notou-se que o ACTH encontrava-se aumentado nos animais que sofreram adrenalectomia, independente do peso ao nascer, e foi reduzido após indução da lesão pulmonar aguda; a expressão pulmonar dos receptores de glicocorticoides apresentou-se reduzida nos animais de baixo peso ao nascer, entretanto, após adrenalectomia e reposição com corticosterona, aumentou-se a expressão dos receptores; não houve diferença entre os grupos na concentração plasmática de transcortina. Por meio destes achados é possível afirmar que as altas concentrações de corticosterona presente em animais de baixo peso ao nascer estão relacionadas a reduzida resposta inflamatória pulmonar aguda.

Palavras-chave: Baixo peso ao nascer. Inflamação. Corticosterona. Desnutrição. Lesão pulmonar aguda.

ABSTRACT

GIL, N.L. **Influence of corticosterone on acute lung inflammation of low birth weight rats**. 2016. 82 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The malnutrition during pregnancy may impair the fetal development and the maturation of immune system, causing prolonged negative effect on immune response. Wistar rats with 12 weeks-old with low birth weight present reduced lung inflammatory response, and increased circulating levels of corticosterone. Using this model, the current work searched investigating the influence of corticosterone upon acute lung inflammatory response. Both adrenals was removed, and after seven consecutive days of corticosterone replacement in physiological levels, the acute lung injury by LPS i.n. was induced. The results obtained by total and differential cells in fluid lavage bronchoalveolar, and histopathological analysis, showed an increase of leucocytes infiltration into lung after adrenalectomy and corticosterone replacement in low birth weight rats. Furthermore, the release of IL-6 and MIP-2 in lung tissue of low birth weight rats with acute lung injury is reduced, however, after adrenalectomy, these cytokines were increased, while TNF-α was similarly released in both groups, however, after adrenalectomy and development of inflammation, this cytokine increased in low birth weight rats; no difference was observed between the groups in IL-1β release. The expression of COX-2 and 5-LO, beyond production of PGE_2 and LTB_4 in low birth weight rats developing acute lung injury was reduced, nevertheless, after adrenalectomy and corticosterone replacement, these enzymes and lipid mediators were increased. Evaluating the corticosterone regulation, the ACTH was increased in adrenalectomized animals, independing of weight birth, and it was reduced after inflammatory stimulus; the lung expression of glucocorticoid receptors was reduced in low birth weight rats, however, after adrenalectomy and corticosterone replacement the expression of receptors was increased; no difference was observed in plasmatic levels of CBG. Through the data it's possible affirm that high levels of corticosterone are related to reduced acute lung inflammatory response developed by low birth weight rats.

Keywords: Low birth weight. Inflammation. Corticosterone. Subnutrition. Acute lung injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da cascata do ácido araquidônico.. 23
Figura 2 - Ilustração do sistema Hipotálamo-pituitária-adrenal. 27
Figura 3 - Esquema representativo de parte da metodologia. 33
Figura 4 - Peso das fêmeas prenhes durante a gestação......40
Figura 5 - Peso da prole......41
Figura 6 - Contagem de células no BAL......43
Figura 7 - Análise histopatológica do tecido pulmonar. 44
Figura 8 - Análise de citocinas e MIP-2. 46
Figura 9 - Expressão proteica das enzimas COX-2 e 5-LO. 48
Figura 10 - Análise dos mediadores lipídicos......49
Figura 11 - Análise dos hormônios......50
Figura 12 - Expressão proteica dos receptores de glicocorticoides. 51
Figura 13 - Análise da Transcortina......52
Figura 14 - Contagem de células mediante tratamento com MET......53
Figura 15 - Análise dos hormônios mediante tratamento com MET......54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11β-HSD	11β-hidróxiesteroide desidrogenase
5-LO	5-Lipoxigenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomia
AP-1	Proteína ativadora 1
APS	Persulfato de amônio
BAL	Lavado broncoalveolar
BPN	Baixo peso ao nascer
BSA	Albumina sérica bovina
CBG	Globulina ligadora de corticosteroide
CORT	Corticosterona
COX	Cicloxigenase
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DBD	Domínio ligante de DNA
DCP	Desnutrição calórico-proteica
DHEA	Desidroepiandrosterona
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FLA_2	Fosfolipase A_2
GC	Glicocorticoide
GR	Receptor de glicocorticoide
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
LDB	Domínio de ligação ao ligante C-terminal
LFA-1	Antígeno 1 associado à função leucocitária
LPA	Lesão pulmonar aguda

LPS	Lipopolissacarídeo
LTB_4	Leucotrieno B_4
MET	Metirapona
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NF-κB	Fator de transcrição nuclear fator κB
NTD	Domínio de transativação N-terminal
PAF	Alquil-acetil-glicerofosfocolina
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PGE_2	Prostaglandina E_2
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PNN	Peso normal ao nascer
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RCF	Restrição do crescimento fetal
RCIU	Restrição do crescimento intrauterino
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilinediamina
TIR	Domínios intracelulares de receptor de Toll de interleucina 1
TLR	Receptor do tipo Toll
TTBS	Tampão tris-salina e Tween 20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....17
1.1 Desnutrição e sistema imunológico 17
1.2 Efeitos da desnutrição durante a gestação 17
1.3 Inflamação.....19
1.3.1 Células envolvidas na inflamação aguda - imunidade inata 20
1.3.2 Receptores do tipo Toll (TLRs).....21
1.3.3 Resposta imunológica ao LPS 22
1.3.4 Mediadores inflamatórios 22
1.3.5 Migração de neutrófilos para o foco inflamatório.....24
1.4 Hormônios glicocorticoides.....25
1.4.1 Adrenais 25
1.4.2 Glicocorticoides 26
1.4.3 Efeitos Fisiológicos, Farmacológicos e Imunológicos da ação dos GCs.....28
1.5 Justificativa.....29
2 OBJETIVOS.....30
2.1 Objetivo central 30
2.2 Objetivos específicos.....30
3 MATERIAIS E MÉTODOS 31
3.1 Animais 31
3.2 Acasalamento, prenhez e desnutrição intrauterina.....31
3.3 Prole, adrenalectomia e reposição de corticosterona 32
3.4 Indução da injúria pulmonar aguda por LPS 33
3.5 Tratamento com a metirapona (MET) 33
3.6 Obtenção de soro e lavado broncoalveolar (BAL) 34
3.7 Contagem de células total e diferencial 34
3.8 Análise histopatológica 34
3.9 Processamento do tecido pulmonar para obtenção de proteínas 35
3.9.1 Extração de Proteínas.....35
3.9.2 Dosagem de proteínas 35
3.10 Expressão proteica de COX-2, 5-LO e GR por Western Blot.....35
3.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....35
3.10.2 Transferência das amostras em gel para membrana de nitrocelulose e Bloqueio 36

3.10.3 Incubação com os anticorpos e Revelação 36
3.11 Quantificação de citocinas e hormônios por multiplex 37
3.12 Quantificação dos mediadores lipídicos 37
3.13 Quantificação da Transcortina 38
3.15 Análise estatística 38
3.16 Drogas e reagentes 39
4 RESULTADOS 40
4.1 Desnutrição intrauterina 40
4.2 Peso das proles 41
4.2 Caracterização da inflamação pulmonar aguda 42
4.2.1 Contagem total e diferencial de células 42
4.2.2 Análise histopatológica 44
4.2.3 Análise de Citocinas e MIP-2 45
4.2.3 Análise dos Mediadores Lipídicos 47
4.3 Quantificação dos Hormônios 50
4.4 Regulação da ação dos Glicocorticoides 51
4.4.1 Análise da expressão proteica do receptor de glicocorticoide 51
*4.4.2 Quantificação da Transcortin*a 52
4.5 Tratamento com metirapona 53
4.5.1 Contagem Total e Diferencial de células 53
4.5.2 Dosagem dos Hormônios 54
5 DISCUSSÃO 55
6 CONCLUSÃO 63
REFERÊNCIAS 64
APÊNDICE - Dados das diferentes reposições de CORT 79

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Desnutrição e sistema imunológico

O funcionamento adequado do sistema de defesa é criticamente afetado pela nutrição, de maneira que deficiências nutricionais interferem na resposta mediada por células, função dos fagócitos, produção de citocinas, atividade do Sistema Complemento, e secreção de anticorpos, assim como a afinidade dos mesmos. Alguns estudos sugerem que a desnutrição calórico-proteica (DCP) relaciona-se com a redução da resposta imune regulatória do microambiente de mucosas, potencializando os mecanismos normais de regulação e intolerância imunológica (CUNNINGHAM-RUNDLES; MCNEELEY; MOON, 2005).

Fatores desfavoráveis que comprometem o desenvolvimento fetal podem prejudicar a maturação do sistema imune, exercendo efeito negativo prolongado sobre a resposta imunológica (CHANDRA, 1997; MOORE et al., 2006).

1.2 Efeitos da desnutrição durante a gestação

O crescimento normal do feto depende de uma crítica regulação de proliferação celular, organização e diferenciação do embrião, e esse processo depende do perfil genético do embrião, da unidade fetal-placentária-maternal, além de nutrientes e oxigenação que supram adequadamente o desenvolvimento, e a influência hormonal entre mãe e feto (ERGAZ; AVGIL; ORNOY, 2005). BARKER (1990) hipotetizou que o crescimento fetal prejudicado durante o período gestacional está fortemente correlacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida tardia.

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) ou a restrição do crescimento fetal (RCF) pode ter diversas etiologias, dentre elas, o uso de drogas de abuso, infecções congênitas, gestação múltipla, hipóxia, deficiências em vitaminas essenciais e minerais, restrição calórica e proteica, e excesso de glicocorticoides (GCs) (ERGAZ et al., 2005; VO; HARDY, 2012). A RCIU/RCF pode resultar num peso ao nascer que é pequeno para a idade gestacional (PIG).

Estudos epidemiológicos demonstraram que crianças com baixo peso ao nascer (menos que 2500 g), apresentam uma incidência aumentada no desenvolvimento de diabetes do tipo II, hipertensão e doenças cardiovasculares (HALES et al., 1991; HUXLEY et al., 2007; JAQUET et al., 2000). Ainda, modelos animais de RCIU reforçam a hipótese de Barker, pois mediante o desenvolvimento *in utero* prejudicado, apresentaram comprometimento no metabolismo da glicose, colesterol e triglicérides na vida adulta (DAHRI et al., 1991; LANGLEY; BROWNE; JACKSON, 1994; LUCAS et al., 1996; SOHI et al., 2011).

Os PIGs apresentam uma resposta imunológica reduzida além de imunocompetência prejudicada que pode permanecer durante anos. Infecções no trato respiratório inferior e superior são três vezes mais frequentes em crianças PIGs (CHANDRA, 2002).

Neel (1962) descreveu a hipótese do fenótipo poupador, enquanto Barker (1991) a estabeleceu: a restrição alimentar materna, durante a gestação, provoca mudanças no armazenamento de energia pelo feto, adaptando-o ao ambiente intrauterino. O feto responde com retardo no crescimento quando faltam nutrientes em seu ambiente. Essa adaptação permanece na vida pós-natal, de maneira que, ao se deparar com uma oferta maior de nutrientes, é gerado um desequilíbrio, que pode acarretar no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. Além disso, estas alterações permaneceriam e seriam transmitidas a gerações futuras.

Durante o cerco alemão na Holanda, entre o fim de 1944 e início de 1945, na segunda guerra mundial, uma severa restrição alimentar foi provocada em mulheres gestantes. Os fetos que sofreram desnutrição no primeiro trimestre de gestação desenvolveram obesidade na vida adulta, enquanto os que sofreram restrição em estágios posteriores do período gestacional, tiveram diversas outras consequências, como por exemplo, maior predisposição à doenças cardiovasculares (KYLE; PICHARD, 2006).

Surgiu posteriormente a hipótese da resposta adaptativa-preditiva, sugerindo que, o organismo em fase de desenvolvimento, placentário ou em lactação, através de sinais hormonais maternos, prevê o ambiente no qual crescerá, fazendo com que sua fisiologia seja ajustada para tal. Na maturidade, ao se deparar com o ambiente não previsto, há o aumento no risco de desenvolvimento de doenças que provavelmente irão se manifestar após o período reprodutivo (GLUCKMAN; HANSON, 2004; GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Há também a hipótese

de que a desnutrição materna e a insuficiência placentária resultam em desnutrição fetal, com consequente diminuição do crescimento do feto (JANSSON, T.; POWELL, 2007). Sabe-se que a desnutrição materna aumenta os níveis de GCs maternos e reduz a expressão de 11β-hidróxisteroide desidrogenase do tipo 2 (11β-HSD2) placentário, aumentando a exposição do feto aos GCs maternos, causando alterações que podem se perpetuar durante gerações (EDWARDS et al., 1993; SECKL, 2004).

Diferentes modelos animais com abordagem de intervenção nutricional tem sido de grande valia para se compreender os fatores e as consequências da RCF, dentre eles, ratos e camundongos compartilham características genéticas, bioquímicas, estruturais e fisiológicas com humanos, o que auxilia na compreensão dos desafios nutricionais enfrentados em países subdesenvolvidos (VUGUIN, 2007).

1.3 Inflamação

O processo inflamatório é desencadeado frente a necessidade de sobrevivência do tecido perante dano ou lesão causados por algum agente infeccioso ou não (RYAN; MAJNO, 1977). Há indutores exógenos microbianos da inflamação, como patógenos e fatores de virulência, assim como não microbianos, que podem ser: consumo de álcool, tabaco e dieta hipercalórica. Fatores endógenos oriundos de tecido danificado, sob estresse, ou em mal funcionamento, também podem desencadear uma resposta inflamatória, porém estes sinais ainda carecem de informações (MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória caracteriza-se por mudanças na homeostase tecidual e fluxo sanguíneo, por secreção e ação de mediadores inflamatórios mediante ativação e migração de células do sistema imunológico (HOUCK, 1976). As manifestações clínicas típicas descritas são: calor, dor, rubor e edema, decorrentes da ação de mediadores na microcirculação da região (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; RATHER, 1971). A vasodilatação que ocorre nas arteríolas permite maior aporte sanguíneo para a região inflamada provocando calor e rubor. Há aumento de permeabilidade e da expressão das moléculas de adesão nas vênulas para permitir o extravasamento do plasma dos vasos para o tecido, e, a migração de células para o foco inflamatório. Este líquido acumulado nos tecidos é que ocasiona

o edema, podendo pressionar as terminações nervosas causando dor, que também pode ser resultado da ação de mediadores inflamatórios (LAWRENCE et al., 2002).

Inflamações agudas são geralmente autolimitantes, se instalando apenas com o intuito de restabelecer o equilíbrio fisiológico. É o que ocorre em casos de infecção e lesão tecidual em que o agente é removido, e o tecido, reparado. Entretanto, há situações em que o processo inflamatório pode se prolongar, passando a ser crônico e prejudicial ao organismo (NATHAN; DING, 2010). Os mecanismos de inflamação induzidos por infecção são melhores compreendidos do que os processos inflamatórios desencadeados por outros indutores. Os mecanismos de estados inflamatórios crônicos sistêmicos, como por exemplo, doenças autoimunes, síndromes metabólicas e neoplasias, ainda necessitam de mais estudos, e portanto, não cabem neste padrão clássico de transição entre inflamação aguda e crônica (ALESSANDRI et al., 2013; FREIRE; VAN DYKE, 2013; MEDZHITOV, 2008).

1.3.1 Células envolvidas na inflamação aguda - imunidade inata

Algumas células originadas na medula óssea, de precursores mieloides, podem se diferenciar para linhagem granulocítica, dando origem aos neutrófilos. Após maturação, parte dos neutrófilos permanecem na medula, enquanto outra vai para a circulação, onde sobrevivem durante algumas horas. São as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório em grande número (DE KLEER et al., 2014; OHLS et al., 1995).

Os precursores de origem mieloide que se diferenciam em pró-monócitos vão para o sangue, onde são chamados de monócitos. Alguns migram para diferentes tecidos onde se diferenciam para macrófagos e residem por longo período de tempo (DE KLEER et al., 2014; SCHULZ et al., 2012; VAN FURTH, 1980).

A resposta inflamatória pode ser iniciada quando os macrófagos residentes em contato com algum patógeno são ativados liberando citocinas e quimiocinas que agem sobre a microcirculação, atraindo e permitindo a passagem de neutrófilos através dos vasos (FREIRE; VAN DYKE, 2013; LEY et al., 2007). Os mastócitos, células do tecido conjuntivo, presentes nos vasos sanguíneos, também podem participar quando ativados, pois nessa condição, liberam substâncias vasoativas, dentre elas, mediadores lipídicos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

Estes leucócitos apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que por sua vez, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPS), sendo que o último pode ativar as mesmas proteínas que o primeiro (MILLS, 2011).

1.3.2 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Os TLRs são proteínas transmembrânicas de única passagem, com domínios externos repetidos ricos em leucina que medeiam o reconhecimento dos PAMPS e DAMPS, e domínios intracelulares de receptores de Toll de interleucina 1(IL-1), os chamados TIR, os quais interagem com outros domínios do tipo TIR presentes em outras moléculas. Estes receptores estão presentes na membrana plasmática, endossomal, lisossomal e endolisossomal (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KOVACH; STANDIFORD, 2011).

Amplamente conservados entre as espécies, dentre 10 TLRs funcionais encontrados em humanos, e 12 em camundongos, estudos mostraram que há uma molécula em cada espécie em comum que apresenta alto grau de similaridade entre si. Os TLRs são capazes de reconhecer lipídios, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos presentes em diversos patógenos tais como bactérias, vírus e fungos (AKIRA et al., 2006).

A ativação de TLRs desencadeia diferentes tipos de vias de sinalização, culminando na ação de distintos fatores de transcrições, resultando na produção de citocinas, fatores quimiotáticos e peptídeos antimicrobianos, por exemplo (AKIRA et al., 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; KOVACH; STANDIFORD, 2011).

O receptor TLR4 foi o primeiro membro da família de TLRs a ser descrito. Este reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de células bacterianas gram-negativas, as quais podem levar ao choque séptico (KAWAI; AKIRA, 2010).

1.3.3 Resposta imunológica ao LPS

O Lipopolissacarídeo é o maior componente externo à membrana de bactérias gram-negativas, e apresenta a função de conferir resistência a perigos externos, sendo de extrema importância para a sobrevivência destes microrganismos. Uma *E.coli* contém cerca de $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS (LEONE et al., 2007; RIETSCHEL et al., 1994).

Quando ocorre lise ou crescimento bacteriano, o LPS é liberado, deixando o lipídio A exposto, por meio do qual se inicia a resposta imunológica (VAN AMERSFOORT; VAN BERKEL; KUIPER, 2003). O LPS livre é então capaz de ativar TLR4 desencadeando um processo de sinalização intracelular, com consequente ativação do fator de transcrição nuclear fator κB (NF-κB), que por sua vez, leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF-α (KAGAN et al., 2008; TANIMURA et al., 2008).

1.3.4 Mediadores inflamatórios

Os mediadores envolvidos com o processo inflamatório podem ser oriundos das proteínas do plasma, ou secretados pelas células locais. A concentração plasmática dos mediadores pode aumentar acentuadamente como resultado da secreção elevada de precursores pelos hepatócitos durante a resposta de fase aguda. De acordo com suas propriedades bioquímicas podem ser classificados em sete grupos: citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do sistema complemento, enzimas proteolíticas e mediadores lipídicos (FREIRE; VAN DYKE, 2013; MEDZHITOV, 2008;2010).

Citocinas pró-inflamatórias são secretadas por diferentes tipos de células e são pleiotrópicas, exercendo atividades como: ativação de leucócitos e endotélio. Exemplo de citocinas envolvidas com a resposta de fase aguda são: fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), sendo secretadas nesta fase principalmente por macrófagos e mastócitos. As quimiocinas, também secretadas por diversos tipos celulares agem como substâncias atrativas de leucócitos para o sítio inflamado (STRIZ et al., 2014).

O aumento intracelular de íons Ca^{2+} pode promover a ação da enzima fosfolipase A_2 (FLA_2) sobre os fosfolipídeos de membrana, gerando o ácido araquidônico, que é metabolizado para a forma de eicosanóides pela ação das enzimas cicloxigenase 1 ou 2 (COX-1 ou COX-2) gerando as prostaglandinas e tromboxanos, ou pode ser metabolizado pela 5-lipoxigenase (5-LO), gerando os leucotrienos e lipoxinas, como ilustrado pela figura 1 (MEDZHITOV, 2008).

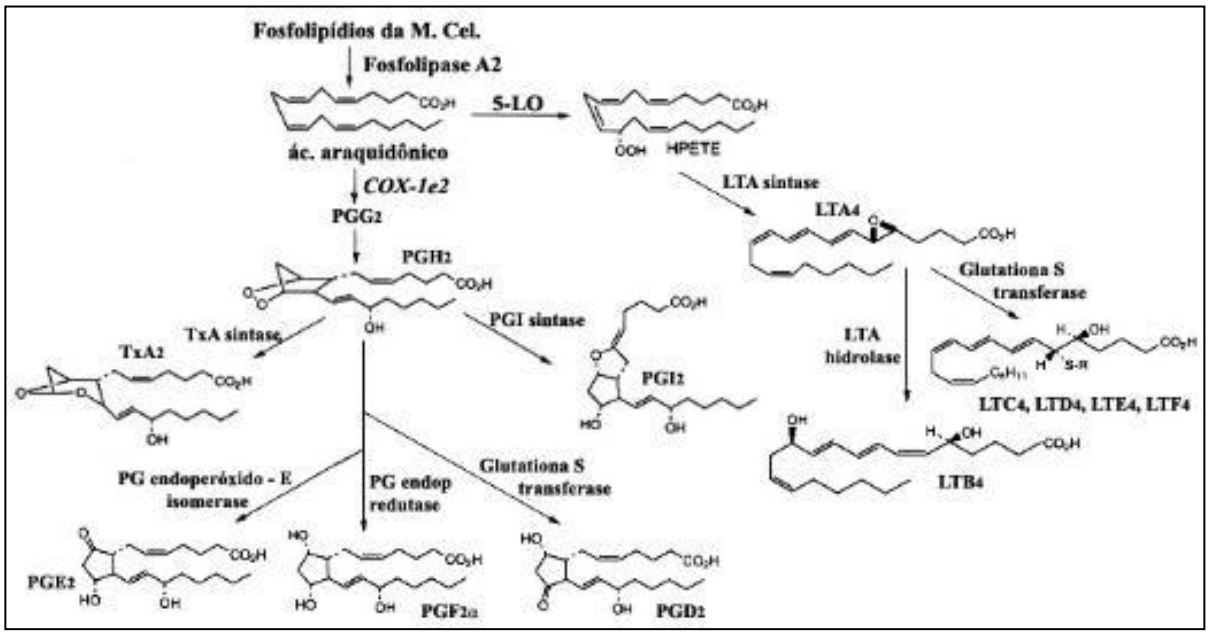


Figura 1 - Representação da cascata do ácido araquidônico. A FLA_2 age sobre os fosfolipídeos de membrana resultando na formação do ácido araquidônico. Este, por sua vez, mediante ação das enzimas COX-1 ou 2, gera as prostaglandinas e tromboxanos, tendo formação de lipídios intermediários e ação de outras enzimas antes de chegar ao produto final. Quando o ác. araquidônico é catalisado pela 5-LO são gerados os leucotrienos, tendo como produto intermediário o LTA_4. Adaptação de Kuehl, Egan (1980) .

As prostaglandinas agem sinergicamente com outros mediadores contribuindo para a ocorrência das manifestações clínicas da inflamação, como o edema, por serem vasodilatadores potentes, apesar de não aumentarem a permeabilidade vascular, e dor, por diminuir o limiar de receptores algésicos, causando hiperalgesia (PERRETTI; AHLUWALIA, 2000; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007; WILLIAMS; MORLEY, 1973). São também potentes agentes piréticos. A prostaglandina E_2 (PGE_2) é capaz de causar febre quando produzida por células não neuronais, provavelmente as endoteliais dos vasos que perfundem o hipotálamo, em resposta

ao estímulo de IL-1 produzida por macrófagos perante infecções bacterianas e virais (NAKAMURA, 2011; SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012).

Dentre os produtos da ação da 5-LO, o Leucotrieno B_4 (LTB_4) exerce função importante sobre os neutrófilos como agente quimiotático e agente aderente ao endotélio. Além disso, o LTB_4 tem grande importância na imunidade inata por aumentar a atividade microbicida de macrófagos ativando a Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada (NADPH-oxidase), e portanto, a produção de espécies reativas de oxigênio (LE BEL; BRUNET; GOSSELIN, 2014).

1.3.5 Migração de neutrófilos para o foco inflamatório

Como mencionado, nas vênulas pós-capilares localizadas na região do foco inflamatório é que ocorre a migração transendotelial dos leucócitos através das interações entre as moléculas de adesão. As primeiras células a migrarem são os neutrófilos, e a primeira etapa envolvida é a interação entre a L-selectina presente na membrana destas células, com moléculas expressas pelas células endoteliais, de maneira que os neutrófilos diminuem a velocidade de rolamento até estabelecerem contato mais estável com o endotélio (WILKINSON, 1974; WILKINSON; MCKAY, 1974).

Em segunda instância, quimiocinas associadas à membrana das células endoteliais ativam os neutrófilos, fazendo com que a integrina expressa pelo neutrófilo, antígeno 1 associado à função leucocitária (LFA-1), adquira conformação de alta afinidade pela molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) presente no endotélio, e isso possibilita que os neutrófilos possam aderir e se espraiar sobre o endotélio (APLIN et al., 1998; GONZALEZ-AMARO; SANCHEZ-MADRID, 1999).

Após a adesão, os neutrófilos então passam pelas junções entre as células do endotélio por meio da interação entre as moléculas de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM) presentes em ambos os tipos celulares. Fora dos vasos, os neutrófilos continuam migrando para o local de inflamação por quimiotaxia (PETRI; PHILLIPSON; KUBES, 2008).

A migração transendotelial de neutrófilos depende da ação de mediadores inflamatórios, como por exemplo, o LTB_4, quimiocinas como IL-8 e proteína

inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2), e as citocinas TNF-α e IL-1 (BAGGIOLINI, 1998; BAGGIOLINI; LOETSCHER, 2000).

1.4 Hormônios glicocorticoides

1.4.1 Adrenais

As glândulas adrenais localizam-se anatomicamente sobre cada um dos rins, envolvidas por tecido adiposo, e são compostas por duas camadas: o córtex adrenal (parte externa) e a medula adrenal (parte interna). O córtex adrenal é composto por três zonas (glomerulosa, fasciculada e reticular) que produzem diversos hormônios esteroides derivados do colesterol: mineralocorticoides, glicocorticoides e hormônios sexuais (KEMPNA; FLUCK, 2008).

O principal mineralocorticoide é a aldosterona, que age nos túbulos distais e coletores dos rins, promovendo a retenção de Na^+ e eliminação de K^+. Sendo assim, a ausência deste hormônio provoca perda de Na^+, que é retentor de água, e consequente choque circulatório, podendo levar o indivíduo a morte (SIMPSON; TAIT; BUSH, 1952). Sua secreção é aumentada pela atividade do sistema Renina-Angiotensina quando há redução de Na^+ na circulação e queda da pressão arterial (MULROW; FRANCO-SAENZ, 1996).

Apesar da produção de hormônios sexuais ocorrerem majoritariamente nas gônadas, o córtex da adrenal também produz estes hormônios, tanto do sexo correspondente, como do sexo oposto. A desidroepiandrosterona (DHEA) possui maior importância biológica, com menor androgeneidade em comparação à testosterona no sexo masculino, porém, com significância fisiológica androgênica no sexo feminino (CASSON et al., 2000; ORENTREICH et al., 1984).

A medula adrenal é composta por células cromafins, as quais consistem em neurônios simpáticos pós-ganglionares modificados, pois liberam seus neurotransmissores, neste caso, hormônios, diretamente na circulação. As catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), armazenadas nos grânulos cromafins, são liberadas após impulso simpático sobre a adrenal em condições de medo ou estresse (GOLDSTEIN; EISENHOFER; KOPIN, 2003; TANK; LEE WONG, 2015).

1.4.2 Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GCs) foram assim nomeados por conta do seu efeito sobre o metabolismo dos carboidratos, porém, regulam diversas outras funções, dentre elas, desenvolvimento e inflamação. Estes hormônios são sintetizados e liberados pelo córtex adrenal, num ritmo circadiano, em resposta a algum estímulo fisiológico e ao estresse (MILLER; AUCHUS, 2011; RHEN; CIDLOWSKI, 2005; SAPOLSKY, 1996).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) regula a concentração dos GCs na circulação, como ilustrado pela figura 2. Sob estímulo, o núcleo paraventricular do hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que age na pituitária anterior, estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Os GCs são então rapidamente sintetizados e liberados quando o ACTH estimula o córtex adrenal (WEBSTER et al, 2002). O sistema HPA é balanceado pelo efeito de *feedback* negativo que os GCs exercem ao agir sobre a pituitária anterior e hipotálamo, sinalizando para a diminuição da secreção de CRH, e, consequentemente, de ACTH (JOHN; BUCKINGHAM, 2003; MALKOSKI; DORIN, 1999).

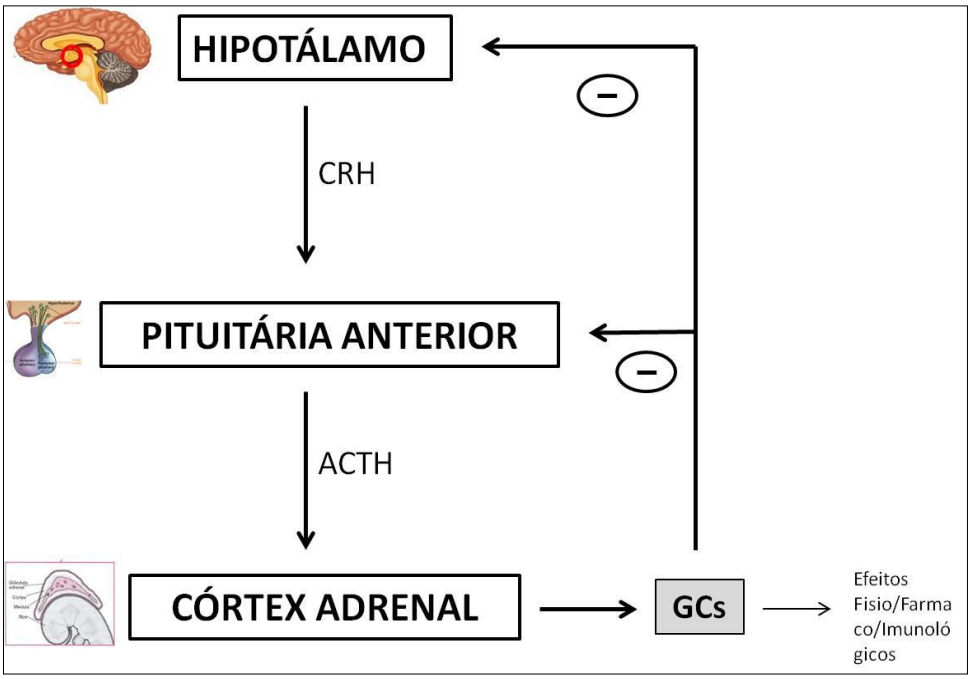


Figura 2 - Ilustração do sistema Hipotálamo-pituitária-adrenal. O CRH é secretado pelo Hipotálamo perante algum estímulo, e age na pituitária anterior estimulando-a a secretar o ACTH, que por sua vez, age sobre o córtex adrenal fazendo com que este sintetize rapidamente os GCs para serem secretados. O mecanismo normal de regulação consiste em um *feedback* negativo do GC, que em alta concentração sinaliza para o Hipotálamo e Pituitária reduzirem a secreção de CRH e ACTH respectivamente. Adaptação de De Guia, Rose e Herzig (2014).

O eixo HPA é o sistema central de resposta ao estresse, de maneira que sua regulação prejudicada foi relacionada a diversas patologias, tais quais o desenvolvimento de autoimunidades, hipertensão, desordens afetivas e, principalmente, depressão (BREUNER; ORCHINIK, 2002).

Os principais GCs ativos são o cortisol em humanos, e a corticosterona (CORT) em murinos. Por serem substâncias lipídicas, com baixa solubilidade no plasma, são transportados por uma proteína glicosilada, denominada globulina ligadora de corticosteroide (CBG), denominada também de transcortina, que contém um único sítio de ligação para GCs e progesterona, ambos com alta afinidade (GARREL, 1996; PUGEAT et al., 1989). Somente os GCs circulantes livres, cerca de 5%, é que são capazes de exercer efeito fisiológico, sendo que de 80-90% estão ligados à CBG, e o remanescente, à albumina (SIITERI et al., 1982). Secretada primeiramente pelos hepatócitos, a CBG é uma proteína de fase aguda negativa, pois durante o processo inflamatório, inclusive na sepse, sua concentração

plasmática é diminuída, provavelmente para se aumentar a quantidade de GCs livres (PUGEAT et al., 1989).

Os GCs exercem suas funções fisiológicas e farmacológicas através do receptor de glicocorticoide (GR), que pertence à família de receptores nucleares. Trata-se de uma proteína modular, constituída por três domínios funcionais: um central ligante de DNA (DBD), domínio N-terminal de transativação (NTD), e o domínio de ligação ao ligante C-terminal (LDB) (KUMAR; THOMPSON, 2005).

Os GRs, quando na ausência dos ligantes, se situam no citoplasma, associados a um complexo multiproteico, que contém proteínas chaperonas e imunofilinas (GRAD; PICARD, 2007). A ligação do hormônio ao seu receptor faz com que este se dissocie do complexo e se transloque para o núcleo da célula, podendo agir diretamente como um fator de transcrição gênica, ou transreprimindo a atividade transcricional de outros fatores, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e NF-κB, envolvidos com a transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório (ROGATSKY; IVASHKIV, 2006).

1.4.3 Efeitos Fisiológicos, Farmacológicos e Imunológicos da ação dos GCs

Os GCs provocam aumento da concentração de glicose no sangue utilizando estoques de proteína e gordura: estimula a gliconeogênese hepática; inibe a absorção de glicose por muitos tecidos, exceto o cérebro; estimula a degradação de proteínas principalmente nos músculos e facilita a lipólise (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Estes hormônios apresentam ampla ação imunomodulatória, sendo uma das drogas mais prescritas mundialmente (SCHACKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002). Os GCs agem aumentando a transcrição de genes anti-inflamatórios e diminuindo a de genes inflamatórios (BARNES, 1998). O Resultado desta ação pode ser a inibição da produção de mediadores lipídicos e citocinas, tais como a IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, GM-CSF, e de quimiocinas, como a IL-8 (FLOWER; ROTHWELL, 1994; NELSON et al., 1993; NORTHROP; ULLMAN; CRABTREE, 1993). Além disso, os GCs podem interferir na expressão das moléculas de adesão, por exemplo, a ICAM-1 e E-selectina, indiretamente, pela redução da liberação de citocinas, e diretamente, reprimindo a transcrição gênica (CRONSTEIN et al., 1992).

1.5 Justificativa

Doenças cardiometabólicas são as mais discutidas em se tratando de adversidades intrauterinas, entretanto, outras enfermidades têm sido estudadas, por exemplo, a asma (FISHER; STEELE; KARROW, 2012; LANDGRAF et al., 2008). Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos envolvidos nas alterações do sistema imunológico de um indivíduo que sofreu restrição alimentar *in utero*.

Alguns dados obtidos anteriormente mostram que ratos Wistar desnutridos intrauterinamente apresentam menor número de leucócitos circulantes, além de reduzida expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 perante estímulo, e reduzida expressão basal de L-selectina nos leucócitos. Foi visto ainda, que ratos Wistar adultos (12 semanas), oriundos de mães desnutridas durante a gestação, apresentam atenuamento da resposta inflamatória alérgica, caracterizada pelo menor infiltrado de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL). Hipotetizou-se que esta reduzida resposta inflamatória poderia estar relacionada aos altos níveis circulantes de CORT que estes animais apresentam (LANDGRAF et al., 2005; LANDGRAF et al. 2008; LANDGRAF et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo central

Este trabalho teve o intuito de investigar a influência da alta concentração de corticosterona sobre a reduzida resposta inflamatória em ratos de baixo peso ao nascer.

2.2 Objetivos específicos

- avaliar a resposta inflamatória pulmonar aguda após redução da concentração de corticosterona em animais com BPN;
- analisar as vias de regulação do hormônio corticosterona.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos da linhagem Wistar, machos e fêmeas (8 - 9 semanas), foram obtidos do Biotério Central – ICB/USP, e mantidos no biotério da Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, unidade José Alencar, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo quatro animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a temperatura ambiente de 22 °C ± 1, com água e ração *ad libtum*. Os protocolos de experimentação utilizados foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – ICB (n° 76) e UNIFESP (nº 1566150416), estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Acasalamento, prenhez e desnutrição intrauterina

Para o acasalamento realizou-se primeiramente o exame microscópico do esfregaço vaginal das fêmeas para detecção da fase de estro, caracterizada pelo grande número de células descamativas, queratinizadas e anucleadas no material vaginal, coletadas por introdução de um *swab* na cavidade vaginal embebido em solução salina. Duas fêmeas (8-16 semanas) para cada um macho (8-16 semanas) foram colocadas por uma noite. Na manhã seguinte após a retirada do macho, foi avaliada a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal das fêmeas para confirmação do cruzamento. A presença destes no esfregaço determinou então o primeiro dia da gestação**.** A dieta de restrição alimentar foi conduzida com base no protocolo desenvolvido por Franco e colaboradores (2002), onde se obteve o consumo médio de ração antes do acasalamento e durante a gestação. A partir deste dado inicial, a oferta de ração às ratas prenhes durante todo o período gestacional foi reduzida em 50%, retornando a alimentação normal após o nascimento da prole. As fêmeas do grupo nutrido receberam ração padrão do laboratório *ad libitum*. O peso das fêmeas prenhes foi acompanhado durante todo o período gestacional. A composição nutricional da ração está contida na tabela 1.

Nutrientes		Nutrientes	
Proteína, *g/kg*	220,0	Biotina, *mg/kg*	0,05
Gordura, *g/kg*	42,0	Vitamina B_1, *mg/kg*	5,0
Caloria, *kcal/kg*	2900,0	Vitamina B_2, *mg/kg*	6,0
Carbohidrato, *g/kg*	435,0	Vitamina B_6, *mg/kg*	7,0
Celulose, *g/kg*	80,0	Vitamina B_{12}, *mg/kg*	20,0
Água, *mL*	125,0	Ferro, *mg/kg*	50,0
Cálcio, *g/kg*	14,0	Zinco, *mg/kg*	60,0
Fósforo, *g/kg*	8,0	Cobre, *mg/kg*	10,0
Vitamina A, *IU/kg*	12,000,0	Iodo, *mg/kg*	2,0
Vitamina D3, *IU/kg*	1,800,0	Manganês, *mg/kg*	60,0
Vitamina E, *mg/kg*	30,0	Selênio, *mg/kg*	0,05
Vitamina K, *mg/kg*	3,0	Cobalto, *mg/kg*	1,5
Niacina, *mg/kg*	60,0	Lisina, *mg/kg*	100,0
Ácido pantotênico, *mg/kg*	20.0	Antioxidante, *mg/kg*	100,0
Colina, *mg/kg*	600,0	Ácido fólico, *mg/kg*	1,0

Tabela 1 - Dados nutricionais da ração. Fonte: Nuvital.

3.3 Prole, adrenalectomia e reposição de corticosterona

Os filhotes, machos e fêmeas, foram pesados no dia do nascimento e em um intervalo de 5 dias (dia 5, 10, 15 e 20) até o 20° dia de vida.

Os ratos machos com 12 semanas de idade, oriundos ou não de mães desnutridas durante a gestação, foram pesados, e em seguida anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) i.p. Sob condições assépticas, duas incisões bilaterais (uma de cada lado) foram realizadas 2 cm abaixo da costela, afetando pele e músculo. A adrenal direita e esquerda foram retiradas e a incisões, suturadas. Os animais falso-operados sofreram incisão na região das duas adrenais, mas não tiveram suas glândulas retiradas.

A contar o dia da cirurgia, os animais receberam reposição de 3 mg/kg de CORT i.p. em PBS 72% e etanol 28%. O hormônio foi administrado durante 7 dias,

durante os quais os animais receberam, também, água suplementada com 0,9% de NaCl e ração *ad libtum*.

3.4 Indução da injúria pulmonar aguda por LPS

No sétimo dia após a cirurgia, os ratos foram anestesiados com cetamina e xilasina i.p., e receberam, cada um, 750 µg de LPS em 200 µl de solução salina por instilação intranasal. Os animais controle receberam apenas salina. Após 6 h foram eutanasiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) i.p., e as amostras, coletadas para análise. Todas as eutanásias foram realizadas no período da tarde.

O procedimento metodológico percorrido desde a cirurgia até a eutanásia encontra-se ilustrado na figura 3.

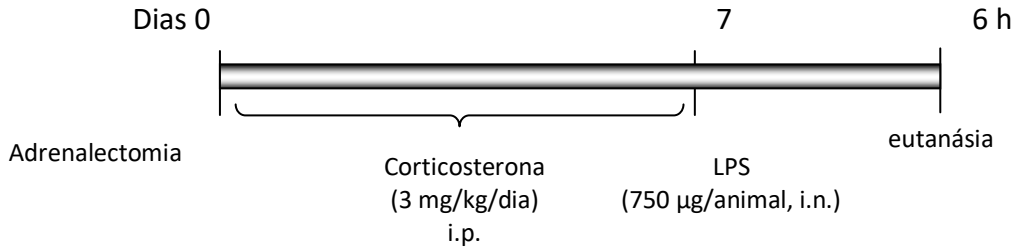


Figura 3 - Esquema representativo de parte da metodologia.

3.5 Tratamento com a metirapona (MET)

Os ratos machos com 12 semanas de idade, oriundos ou não de mães desnutridas durante a gestação, foram tratados com 50 mg/kg de MET i.p. ou veículo (PBS 72% e etanol 28%) 1 h antes da instilação com LPS ou solução salina i.n (ALEXANDER; FEWELL, 2011; INCERPI et al., 2015). Após 6 h de instilado o LPS/salina, as amostras foram coletadas conforme descrição na seção 3.6.

3.6 Obtenção de soro e lavado broncoalveolar (BAL)

Após 6 h de LPS ou salina, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) i.p. para se efetuar a perfusão transcardíaca. A amostra sanguínea foi centrifugada (2655 x g rpm, 30 min, 25 °C) no equipamento Centrifugue 5804R (Eppendorf, Nordrhein-Westfalen, Alemanha), e o soro coletado foi mantido à - 80 °C para análise posterior.

Para obtenção do BAL, a canulação traqueal foi realizada; injetou-se 5 ml de PBS, e após 5 s, aspirou-se a solução para obtenção do lavado broncoalveolar (BAL). Este procedimento foi repetido por mais uma vez.

3.7 Contagem de células total e diferencial

O BAL foi centrifugado (300 x g, 10 min, 4 ºC), o sobrenadante removido, e o botão celular ressuspenso em 1 ml de PBS. Um volume de uma solução contendo 0,5% de cristal violeta dissolvido em 30% de ácido acético foi adicionado a 9 volumes da suspensão celular. O número total de células foi então determinado por contagem em uma câmara de Neubauer. De 50 a 150 µl da mesma solução de BAL foi levada à citocentrífuga (19 x g, 3 min) Excelsa Flex 3400 (FANEM®, São Paulo, SP, Brasil) e após secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (Instant-Prov, New prov, Brasil).

3.8 Análise histopatológica

Os pulmões foram retirados e fixados em solução de formalina (10%) tamponada com PBS por 24 h. Posteriormente, foram mantidos em álcool 70% para fixação. Os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados e corados com hematoxilina-eosina para que o tipo de infiltrado inflamatório e sua localização fossem analisados. As imagens foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico Axiovert 100M (Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha).

3.9 Processamento do tecido pulmonar para obtenção de proteínas

3.9.1 Extração de Proteínas

O tecido pulmonar dos animais foi retirado, fragmentado em pequenos pedaços e armazenado à - 80 °C. Para a extração de proteínas do tecido, pesou-se cerca de 60 mg do tecido pulmonar, e adicionou-se a essa massa, 300 µl do tampão de lise: 50 mM tris HCl pH 7,4 (1 M), 0,5 mM NP-40 (10%), 100 mM cloreto de sódio (NaCl) (5 M), e 10 µl de coquetel inibidor de proteases (Aprotinina, Bestatina, E-64, Leupeptina, Fluoreto de Sódio, Ortovanadato de sódio, Pirofosfato de sódio e β-glicerofosfato) para um total de 1 ml de tampão; o tecido foi então triturado (2 ciclos de 5000 rpm, 20 s) na Precellys® 24 (Bertin Technologies, Washington, EUA). Em seguida, a amostra foi centrifugada (14.000 x g, 4 °C, 20 min) no equipamento Centrifugue 5804R, e o sobrenadante, coletado para análise posterior.

3.9.2 Dosagem de proteínas

Realizou-se a dosagem de proteínas através do kit comercial Pierce^{TM} BCA Protein Assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA), de maneira que as amostras e os padrões de albumina sérica bovina (BSA) foram diluídos em água ultrapura, e o ensaio feito em placa de 96 cavidades, para posterior leitura a 560 nm em leitor de placas de ELISA Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA).

3.10 Expressão proteica de COX-2, 5-LO e GR por Western Blot

3.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após extração e dosagem de proteínas, descritas na seção 3.9, foi acrescentado ao extrato proteico o tampão de amostra 5X (300 mM Tris-hCl pH 6,8, 10% dodecil sulfato de sódio (SDS), 50% glicerol, 25% mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol). A eletroforese foi realizada em dodecil sulfato de sódio (SDS) de

poliacrilamida (SDS-PAGE) com gel de 8,5% de acrilamida, composto por 2,55 ml de solução estoque de 30% de acrilamida (0,81 M de Acrilmida, 13 mM de Bis-acrilamida), 2,25 ml de tampão inferior (300 ml de água ultrapura, 91 g de Tris base, pH 8,8), 27 µl de persulfato de amônio (APS), 15 µl de TEMED, e 4,2 ml de água ultrapura.

Extratos proteicos (90 µg para GR, 60 µg para COX-2 e 45 µg para 5-LO) dos tecidos pulmonares obtidos dos animais (conforme descrito na seção 3.9; ver 3.9.1), assim como o padrão de peso molecular, foram carregados nos géis e submetidos à eletroforese (60 mA até total desaparecimento da amostra), em uma cuba para eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra cell (BioRad, Hercules, CA, EUA). O tampão de corrida foi preparado com 0,025 M Tris-base, 0,19 M glicina, e 1% de SDS, pH 8,3.

3.10.2 Transferência das amostras em gel para membrana de nitrocelulose e bloqueio

Após o término da eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Thermo Fischer Scientific) em câmara úmida (Owl VEP-2 Mini Tank Electroblotting System (Thermo Fischer Scientific) por 2 h, utilizando-se tampão de transferência, constituído de: 25 mM de Tris-base e 0,2 M de glicina, dissolvidos em água ultrapura, e 20% de metanol. A membrana foi previamente mantida no tampão de transferência durante 10 min.

Após transferência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio, constituído por 1% de leite em pó desnatado diluído em tampão TTBS (0,2 M Tris base, 1,4 M Cloreto de sódio e 0,1% Tween 20 em água ultrapura), durante 1 h. Posteriormente, a membrana sofreu 3 lavagens com TTBS, de 10 min cada, por imersão e agitação.

3.10.3 Incubação com os anticorpos e Revelação

As membranas foram incubadas com anticorpo anti-GR, anti-COX-2 ou anti-5-LO (1:1000) diluídos em tampão de bloqueio, *overnight*, à 4 °C sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TTBS por 3 vezes de 10 min. Em seguida, incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho,

conjugado à HRP (1:2000) diluído em tampão de bloqueio por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Repetiu-se então as lavagens.

Para normalizar as medições, foi introduzido um padrão endógeno, onde a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-β-actina (1:2000), e seu respectivo secundário, sob as mesmas condições.

As membranas foram lavadas com TTBS por três vezes durante 10 min, e reveladas utilizando-se kit de revelação Pierce® ECL Plus (Thermo Fischer Scientific). A revelação se deu em fotodocumentador GeneGnome XRQ (Syngene, Cambridge, RU) e as imagens foram analisadas através do software Gene Tools (Syngene, Cambridge, RU).

3.11 Quantificação de citocinas, MIP-2 e hormônios por multiplex

As concentrações de citocinas nas amostras extraídas do tecido pulmonar, conforme descrito na seção 3.9, e de hormônios no soro, foram determinadas utilizando-se um kit de multiplex descrito pelo protocolo de fabricação Millipore - Billerica (Millipore Corporation, MA, EUA). Os mediadores (IL-1β, IL-6, TNF-α, e MIP-2) compunham um kit separado dos hormônios (corticosterona e ACTH).

De acordo com as instruções do fabricante, a microplaca de titulação com 96 cavidades foi incubada *overnight*, à 4 °C sob agitação, após adição das amostras, anticorpos primários e as *beads* magnéticas. No dia seguinte, após lavagem, os anticorpos de detecção e os conjugados estreptavidina-ficoeritrina foram adicionados à placa, e a leitura foi realizada em equipamento específico Magpix® (Luminex, Austin, TX, EUA). Os dados foram analisados no software Milliplex Analyst 5.0 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

3.12 Quantificação dos mediadores lipídicos

Os eicosanoides PGE_2 e LTB_4 foram determinados utilizando-se kit de ensaio imunoenzimático descrito pelo protocolo de fabricação (Cayman Chemical Co., MI, EUA).

O extrato proteico obtido conforme descrito na seção 3.9 foi diluído em solução do kit (1:150 para PGE_2 e 1:50 para LTB_4) e incubado com o conjugado

eicosanoide-acetilcolinesterase, e com o anticorpo específico, em uma placa de 96 cavidades pré-tratada com anticorpos Imunoglobulina G anti-coelho. Após a incubação *overnight* à 4 °C, as placas foram lavadas e o substrato da enzima (Reagente de Ellman) foi adicionado por 60 a 120 min a 25 °C. A densidade óptica das amostras foi determinada à 410 nm, para ambos os eicosanoides, em um leitor de placas de ELISA, e a concentração foi calculada a partir da curva padrão.

3.13 Quantificação da Transcortina

A proteína carreadora de glicocorticoides, transcortina, foi determinada utilizando-se kit de ensaio imunoenzimático descrito pelo protocolo de fabricação (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, EUA).

De acordo com as instruções do fabricante, o soro foi diluído em 1:1000 de PBS e incubado em placa de 96 cavidades pré-tratada com um anticorpo específico para a transcortina, juntamente a biotina conjugada a um outro anticorpo específico para a transcortina, por 1 h à 37 °C. Após lavagem, a placa foi incubada com avidina conjugada a HRP, e por último, o substrato foi adicionado. A densidade óptica das amostras foi determinada à 450 nm em um leitor de placas de ELISA, e a concentração da transcortina foi calculada a partir da curva padrão.

3.15 Análise estatística

A diferença entre os grupos foi vista por análise de variância. No caso de análises múltiplas, foi empregado o ANOVA de duas vias quando comparado o crescimento dos filhotes durante os 20 dias, e uma via, nas demais comparações, aplicando-se Bonferroni como pós-teste (Graphpad Prism versão 5.0 GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). $P<0,05$ foi utilizado como nível de significância.

3.16 Drogas e reagentes

Os anestésicos (cetamina e xilasina) foram obtidos da Ceva (Brasil), enquanto a CORT, MET, LPS, e cristal violeta, da Sigma-Aldrich (EUA).

Acrilamida, Bis-acrilamida, Tris-base (tris(hidroximetil)aminometano), SDS (dodecil-sulfado de sodio), APS (persulfato de amonio), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilinediamina), glicina, tween-20, azul de bromofenol, mercaptoetanol e nonidet (NP40), foram obtidos da Amresco (EUA); NaCl (cloreto de sodio), metanol, ácido acético, etanol, Na_2HPO_4.7H2O (fosfato de sódio bibásico hepta-hidratado) e KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico anidro) foram obtidos da Synth (Brasil); MgCl (cloreto de magnesio) foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA); formaldeído foi obtido da Merck (Alemanha); o coquetel inibidor de proteases (Halth^{TM} Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail) foi comprado da Thermo Scientific (EUA).

O anticorpo secundário assim como o anti-β-actina foram obtidos da Cell Signaling (EUA); o anticorpo anti-GR, da Santa Cruz Biotechnology (EUA); o anticorpo anti-5-LO foi adquirido da Cayman Chemical (EUA), e o anticorpo anti-COX-2, além do padrão de peso molecular (Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder) foram comprados da Thermo Scientific (EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Desnutrição intrauterina

O peso das fêmeas prenhes obtido durante o período gestacional mostrou que enquanto as fêmeas controle apresentaram aumento progressivo de peso, as fêmeas submetidas à restrição alimentar não apresentaram ganho de peso durante todo o período gestacional (figura 4).

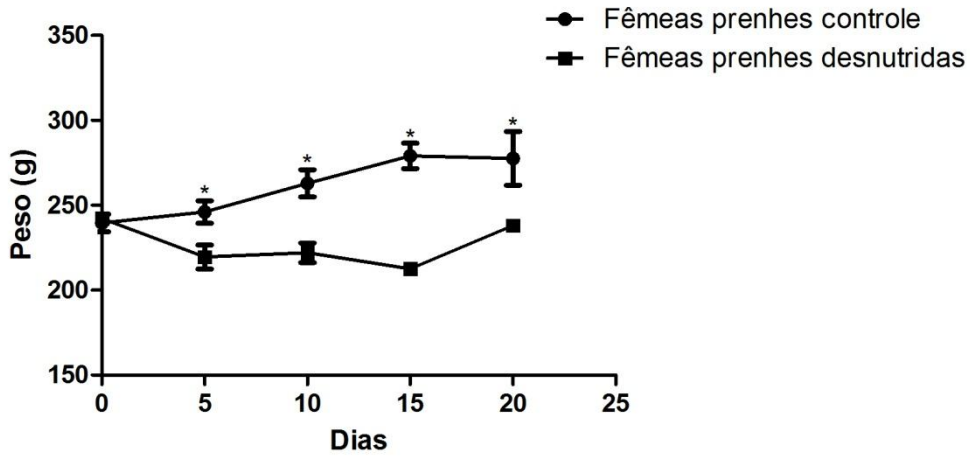


Figura 4 - Peso das fêmeas prenhes durante a gestação. As ratas fêmeas recebendo ração *ad libtum* (●*)*, e as que tiveram 50% de restrição de ração (■) durante toda a gestação foram pesadas a cada 5 dias, até o 20° dia de gestação. Os resultados estão representados pela média ± EPM do peso em g, n=10 cada grupo, *P<0,05.

4.2 Peso das proles

Observa-se na figura 5 que há uma diferença significativa entre os pesos das proles no dia do nascimento. A prole de ambos os sexos oriunda de mães desnutridas durante a gestação nasceram com o peso reduzido. A partir do 5° dia de vida o peso entre as proles foram igualados, até que no 15° dia a prole oriunda de mães desnutridas atingiu peso significativamente maior que a prole oriunda de mães nutridas. Com 12 semanas, idade em que os animais foram submetidos a adrenalectomia, não houve diferença entre os pesos.

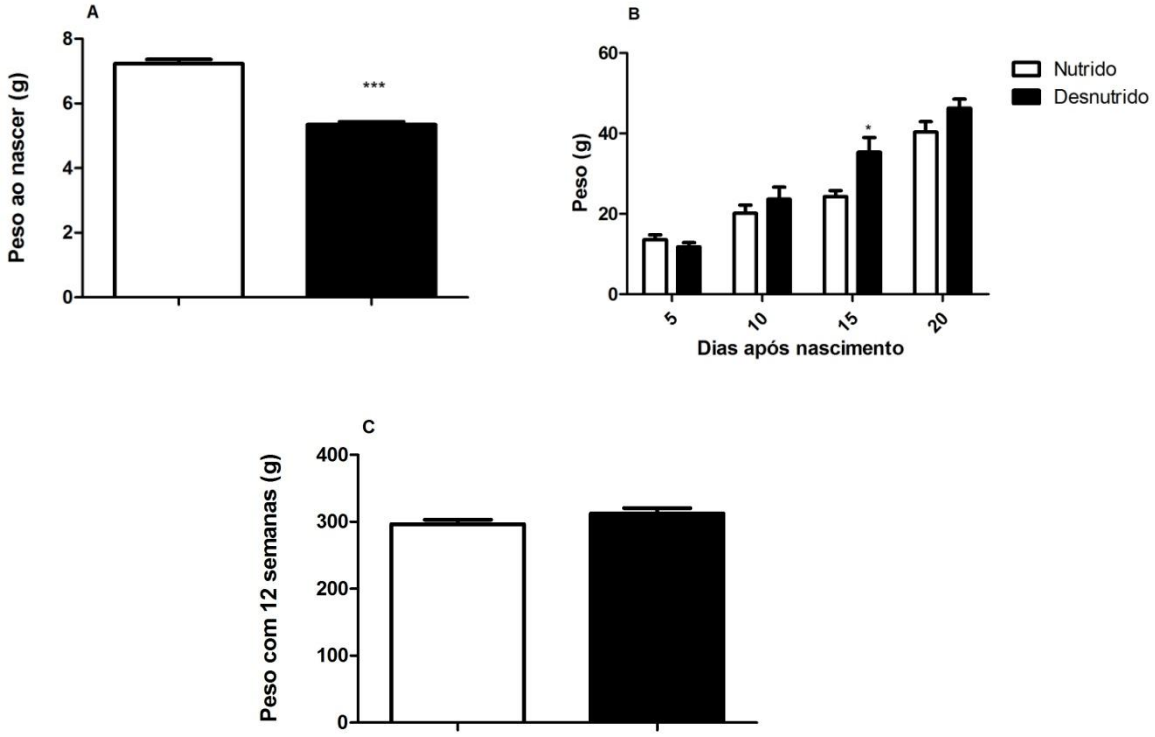


Figura 5 - Peso da prole. A prole de ambos os sexos foi pesada no dia do nascimento (A). A partir do dia do nascimento a prole foi pesada a cada 5 dias até o 20° dia de vida (B). A prole macho, com 12 semanas de idade foi pesada antes de ser submetida a cirurgia (C). Os resultados estão representados pela média ± EPM do peso, n= 10-11 cada grupo, *P<0,05,***P<0,001.

4.2 Caracterização da inflamação pulmonar aguda

4.2.1 Contagem total e diferencial de células

A figura 6 mostra que a indução da lesão pulmonar aguda (LPA) por LPS levou ao aumento do número de células totais no BAL tanto nos animais com peso normal ao nascer (PNN) quanto nos de baixo peso ao nascer (BPN), porém, o grupo com BPN apresentou uma quantidade significativamente menor de células totais. Após a cirurgia e reposição em doses fisiológicas de CORT, seguida da indução à LPA, os animais com BPN passaram a apresentar quantidades semelhantes de células totais no BAL quando comparados com os animais de PNN. O mesmo foi observado com o infiltrado de neutrófilos, que foi aumentado nos animais com BPN após ADX. Nenhuma alteração foi observada com relação ao número de células mononucleares. Os animais com BPN e PNN falso-operados apresentaram resultados semelhantes em termos de número total e diferencial de células no BAL, em comparação aos animais que não foram manipulados que receberam LPS ou salina. Por este motivo, os experimentos foram conduzidos comparando-se estatisticamente apenas os grupos não operados com os grupos operados que receberam reposição de 3 mg/kg de CORT.

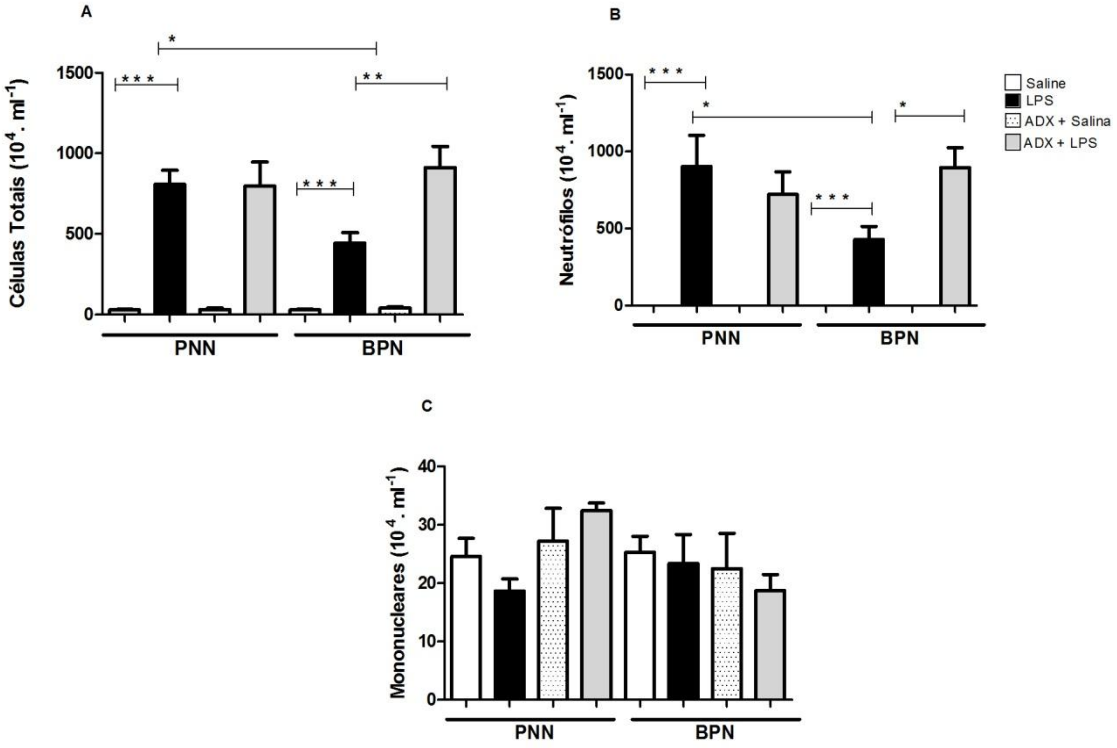


Figura 6 - Contagem de células no BAL. O BAL foi coletado, centrifugado, e resuspenso em 1 ml de PBS. Uma solução de cristal violeta foi adicionado a 9 volumes da suspensão celular, que foi colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de céluas (A). De 50 a 100 µl da suspensão celular foi levada a uma citocentrífuga, e as lâminas foram coradas com HE para a contagem diferencial de células, realizadas por meio de um microscópio óptico (B) e (C). Todos os grupos ADX receberam reposição de 3 mg/kg de CORT. Os resultados estão representados pela média ± EPM do número de células, n= 8-14 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.2.2 Análise histopatológica

Os cortes histológicos de pulmão presentes na figura 7 mostraram menor quantidade de infiltrado celular no espaço alveolar e intersticial do animal com BPN desenvolvendo lesão pulmonar aguda em relação ao de PNN. Após ADX e reposição com CORT, a quantidade de células no tecido do animal com BPN foi aumentada e encontra-se semelhante aos animais com PNN.

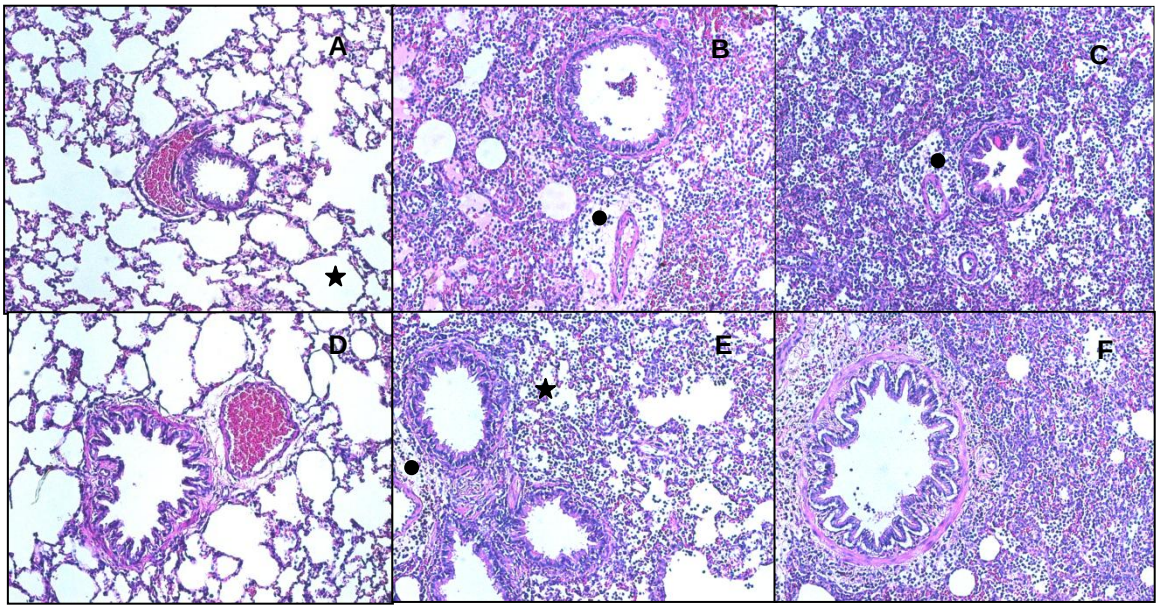


Figura 7 - Análise histopatológica do tecido pulmonar. Os pulmões foram retirados, fixados, cortados e corados com HE. As imagens microscópicas em aumento de 200X mostram o tecido pulmonar dos animais de PNN salina (A), PNN com LPA (B), PNN adrenalectomizado com LPA (C), BPN salina (D), BPN com LPA (E), e BPN adrenalectomizado com LPA. São indicadas as localizações de células no interior dos alvéolos (★) e no interstício entre vaso sanguíneo e bronquíolo (●).

4.2.3 Análise de Citocinas e MIP-2

Tanto os animais com PNN quanto os de BPN tiveram aumento da produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α durante o desenvolvimento da lesão pulmonar aguda. No entanto, a produção de IL-6 foi menor no grupo de BPN, fenômeno que pode ser revertido após ADX. Na figura 8 é possível observar uma diferença significativa na produção de IL-6 entre animais de PNN desenvolvendo LPA e animais de BPN na mesma condição. Com relação ao TNF-α, apesar da produção ser equivalente entre os grupos com PNN que desenvolveram lesão pulmonar aguda e BPN na mesma condição, houve uma maior produção desta citocina após ADX nos animais com BPN.

A quimiocina MIP-2 mostrou-se aumentada no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda tanto em animais com PNN quanto nos de BPN. Entretanto, sua produção nos animais com BPN foi menor, visto que há uma diferença significativa entre a produção desta quimiocina entre animais com PNN desenvolvendo lesão pulmonar aguda, e animais de BPN sob a mesma condição. Esta baixa produção nos animais com BPN foi revertida após ADX e reposição com CORT.

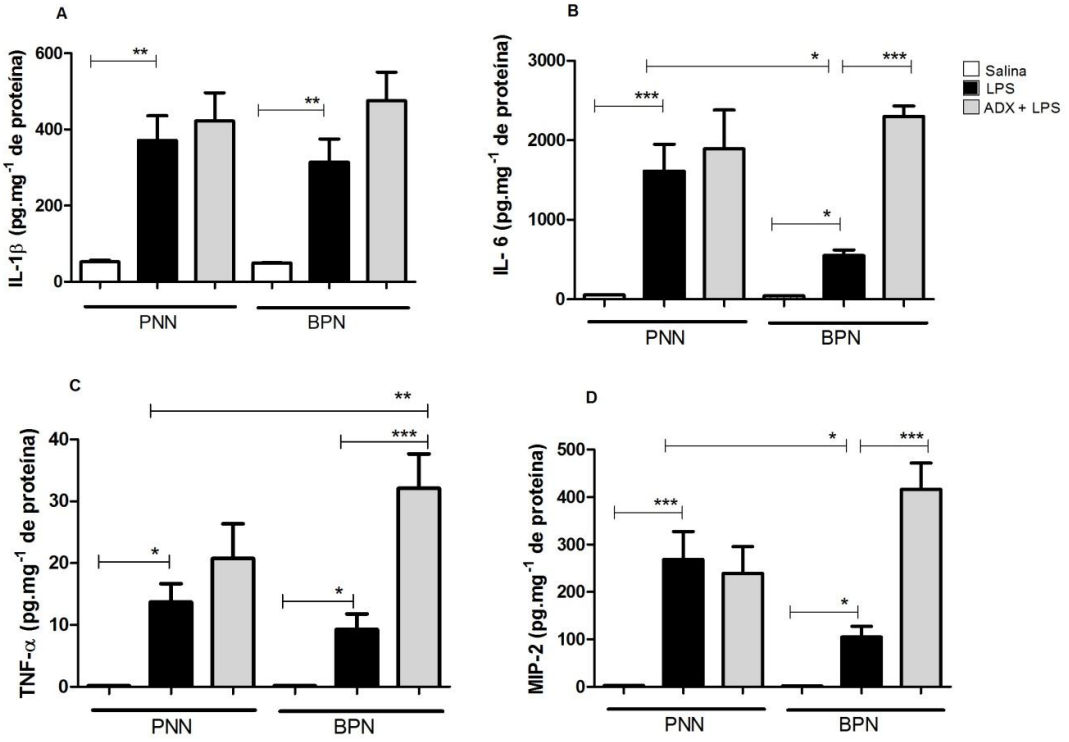


Figura 8 - Análise de citocinas e MIP-2. O tecido pulmonar foi submetido a extração e dosagem de proteínas totais; 25 µl do extrato proteico foi incubado em uma placa de 96 cavidades de um kit multiplex juntamente a *beads* magnéticas e anticorpos específicos para detecção de IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) e MIP-2 (D). Os dados finais foram obtidos relacionando-se a concentração da citocina ou MIP-2, pela concentração de proteínas totais da amostra, e estão representados pela média ± EPM, n= 5 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.2.3 Análise dos Mediadores Lipídicos

4.2.3.1 Expressão proteica de cicloxigenase 2 e 5-lipoxigenase

Conforme mostrado na figura 9, COX-2 e 5-LO aumentaram sua expressão após indução à LPA com LPS nos animais de PNN. Este aumento não foi evidenciado nos animais de BPN, porém, a cirurgia e reposição com CORT permitiu que a expressão destas enzimas fossem aumentadas nos animais de BPN após indução à LPA. A análise quantitativa das bandas mostraram uma diferença significativa na expressão de ambas as enzimas entre os animais de PNN após desenvolvimento de LPA e os animais de BPN sob a mesma condição. A análise quantitativa das bandas ainda mostraram que houve diferença significativa entre os animais de BPN com lesão pulmonar aguda e os de BPN adrenalectomizados desenvolvendo LPA.

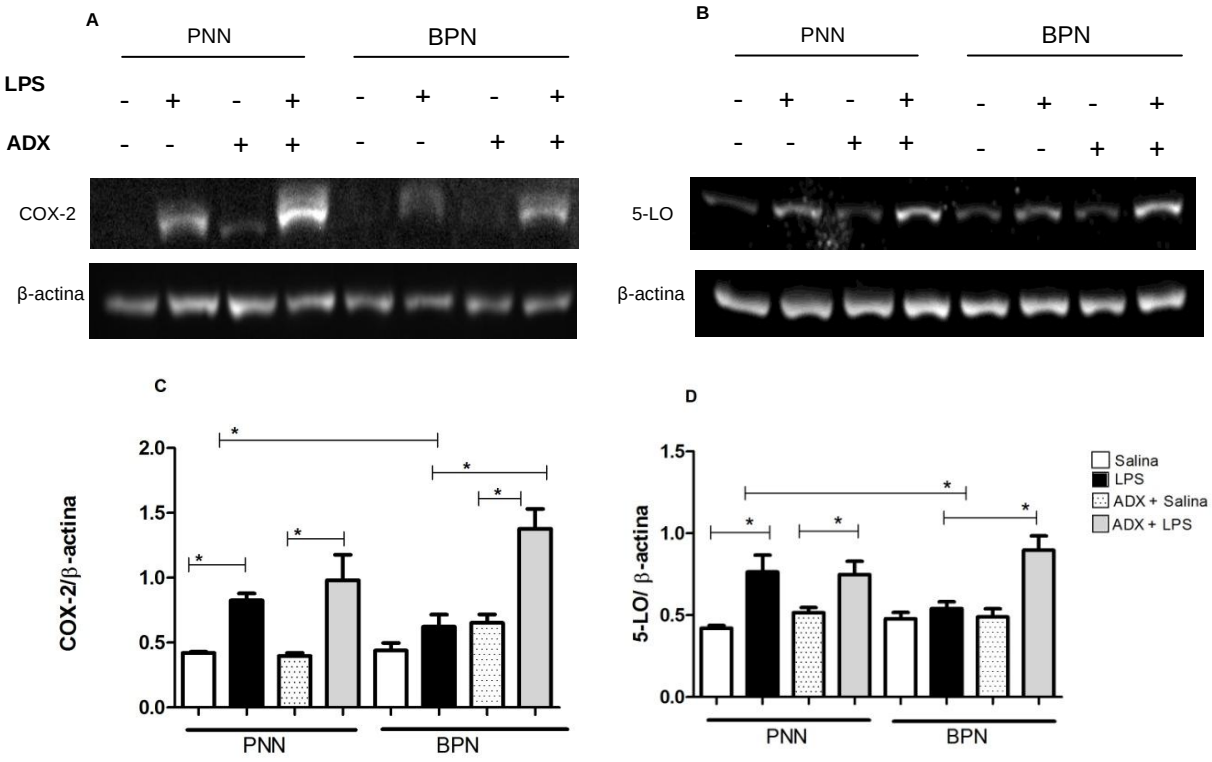


Figura 9 - Expressão proteica das enzimas COX-2 e 5-LO. O tecido pulmonar foi submetido a extração e dosagem de proteínas totais. 60 µg do extrato proteico para detecção de COX-2, e 45 µg para detecção de 5-LO foram carregadas no gel de poliacrilamida, juntamente ao padrão de peso molecular, e submetidos a eletroforese; após transferência das amostras em gel para a membrana de nitrocelulose, seguida da incubação com os anticorpos, as membranas foram reveladas, evidenciando a presença de COX-2 em 72 kDa (A), e 5-LO em 70 kDa (B), ambas tendo a β-actina como controle endógeno em 45 kDa; a análise quantitativa das bandas de COX-2 (C) e 5-LO (D) mostram os resultados em média ± EPM da relação em pixels da proteína/β-actina, n= 3-4 cada grupo, *P<0,05.

4.2.4.2 Produção de Prostaglandina E_2 e Leucotrieno B_4

A figura 10 demonstra uma menor produção de PGE_2 e LTB_4 nos animais de BPN após indução à lesão pulmonar aguda por LPS. Há uma diferença significativa entre os animais de PNN desenvolvendo LPA e de BPN sob a mesma condição na produção de ambos os mediadores. Após ADX e desenvolvimento de LPA, os animais de BPN passaram a apresentar produção de LTB_4 e PGE_2 semelhante aos animais de PNN.

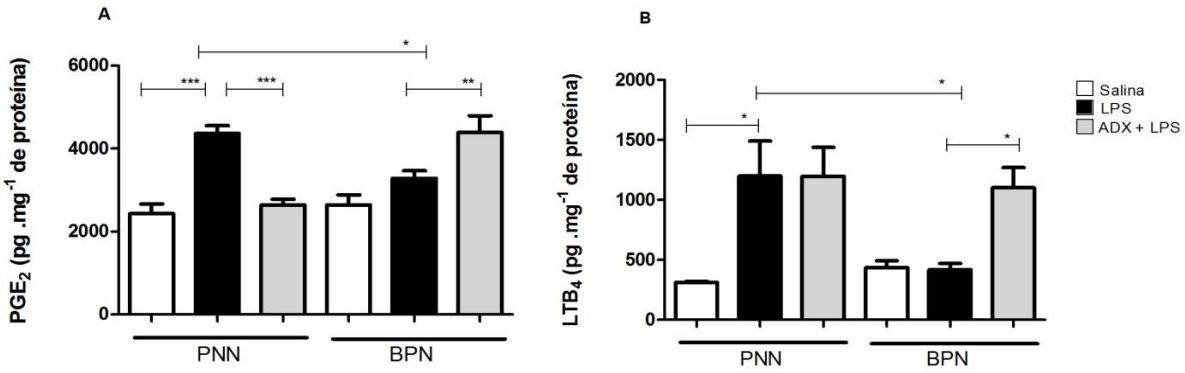


Figura 10 - Análise dos mediadores lipídicos. O tecido pulmonar foi submetido a extração e dosagem de proteínas totais. O extrato proteico diluído em solução do kit, 1:150 para dosagem de PGE_2 e 1:50 para LTB_4, foi incubado em placa de 96 cavidades seguindo as recomendações do fabricante. A densidade óptica das amostras na placa foi obtida, e as concentrações foram calculadas a partir da curva padrão. Os dados finais tratam-se da relação entre a concentração de PGE_2 (A) e LTB_4 (B), pela concentração de proteínas totais da amostra. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n= 5-6 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.3 Quantificação dos Hormônios

Analisando a figura 11 é possível confirmar a alta concentração de CORT circulante nos animais de BPN, conforme dado anteriormente observado por Landgraf e colaboradores (2008). A lesão pulmonar aguda induzida por LPS provocou o aumento da concentração de CORT nos animais de PNN, o que não ocorreu com os animais de BPN, que já apresentavam concentração elevada de CORT. Observa-se que a concentração de CORT nos animais de PNN e BPN adrenalectomizados que desenvolveram LPA, ou não, permanecem a mesma.

A concentração de ACTH é significativamente maior nos animais adrenalectomizados. Apesar de tanto os animais de PPN quanto os de BPN adrenalectomizados e desenvolvendo LPA apresentarem redução da concentração circulante de ACTH, apenas os de BPN tiveram uma redução ao nível da concentração de ACTH dos grupos não adrenalectomizados. Contudo, não houve diferença na concentração de ACTH entre animais de PNN e BPN.

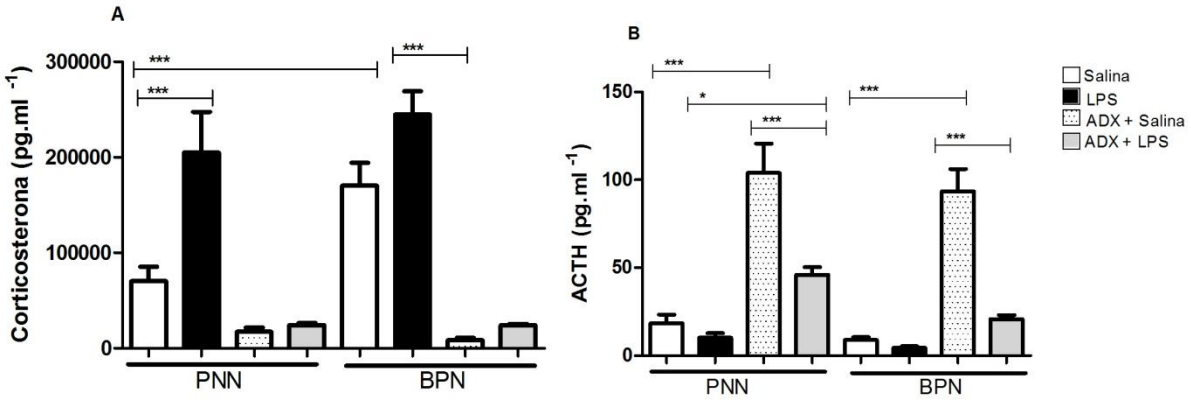


Figura 11 - Análise dos hormônios. O soro foi utilizado para quantificação dos hormônios, de maneira que, conforme recomendações do fabricante, 25 µl do soro foi incubado em uma placa de 96 cavidades de um kit multiplex, juntamente a *beads* magnéticas e anticorpos específicos para detecção de corticosterona (A) e ACTH (B). Os resultados estão representados pela média ± EPM da concentração do hormônio, n= 5 cada grupo, *****P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.4 Regulação da ação dos Glicocorticoides

4.4.1 Análise da expressão proteica do receptor de glicocorticoide

Na figura 12, observa-se que a expressão dos receptores de glicocorticoides encontrou-se reduzida após indução à lesão pulmonar aguda por LPS nos animais de PNN, o que não ocorreu com os animais de BPN, que já se encontrava com sua expressão basal reduzida. Após ADX, os animais de BPN expressaram seus receptores de glicocorticoides de maneira semelhante aos animais de PNN. A análise quantitativa das bandas mostraram uma diferença significativa na expressão de GR entre os animais de PNN e animais de BPN, e uma diferença significativa entre os animais de BPN e BPN adrenalectomizados.

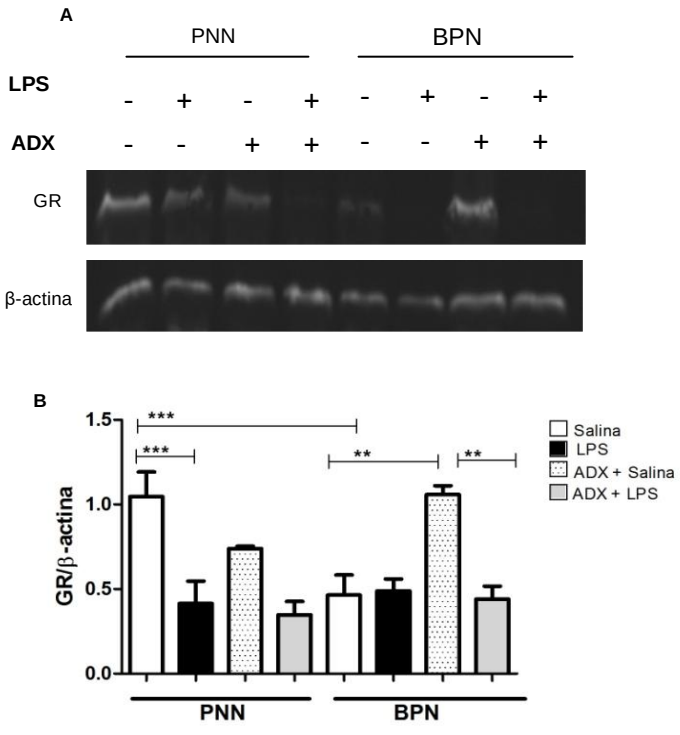


Figura 12 - Expressão proteica dos receptores de glicocorticoides. O tecido pulmonar foi submetido a extração e dosagem de proteínas totais. 90 µg do extrato proteico foram carregadas no gel de poliacrilamida, juntamente ao padrão de peso molecular, e submetidos a eletroforese; após transferência das amostras em gel para a membrana de nitrocelulose, seguida da incubação com os anticorpos, a membrana foi revelada, evidenciando a presença de GR em 90 kDa; a análise quantitativa das bandas (B) mostram os resultados em média ± EPM da relação entre os valores em pixels de GR e β-actina, n= 3 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.4.2 Quantificação da Transcortina

Na figura 13 é possível perceber que não houve diferença significativa na quantidade de transcortina entre nenhum grupo.

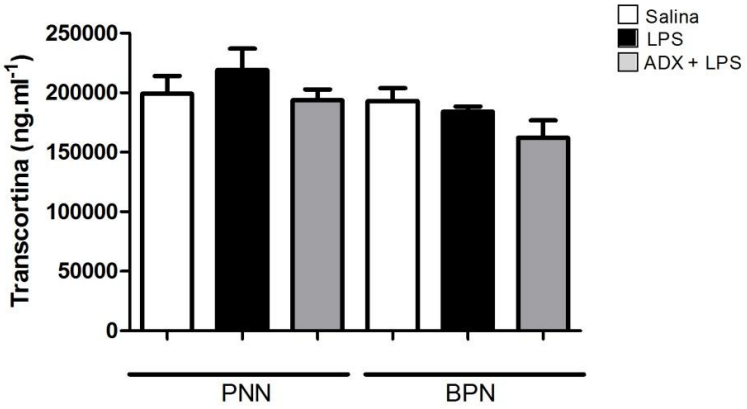


Figura 13 - Análise da Transcortina. O soro diluído em PBS (1:1000) foi incubado em placa de 96 cavidades pré tratada com anticorpos específicos, seguindo as recomendações do fabricante. A densidade óptica das amostras na placa foi obtida, e as concentrações, calculadas a partir da curva padrão. Os resultados estão representados pela média ± EPM da concentração, n= 5-6 cada grupo, *P<0,05.

4.5 Tratamento com metirapona

4.5.1 Contagem Total e Diferencial de células

A figura 14 mostra que o infiltrado de células totais no lavado broncoalveolar dos animais de PNN+veículo desenvolvendo lesão pulmonar aguda é significativamente maior que o infiltrado de células dos animais de BPN+veículo. Após o tratamento com MET, o infiltrado de células totais nos animais de BPN com lesão pulmonar aguda passou a ser significativamente maior do que o infiltrado dos animais de PNN. Resultado semelhante foi observado para o número de neutrófilos. O número de células mononucleares apresentou-se significativamente maior apenas nos animais de BPN adrenalectomizados desenvolvendo LPA.

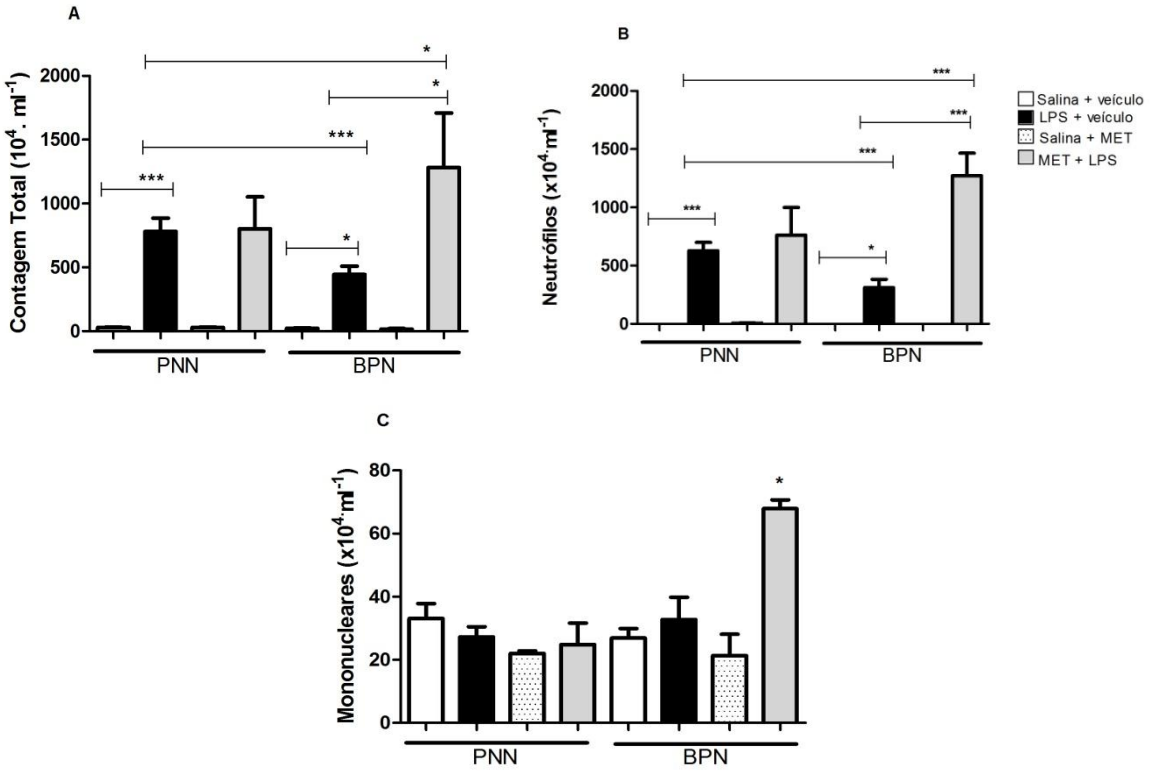


Figura 14 - Contagem de células mediante tratamento com MET. O BAL de animais de PNN e BPN, desenvolvendo LPA ou não, foi coletado, centrifugado, e resuspenso em 1 ml de PBS. Uma solução de cristal violeta foi adicionado a 9 volumes da suspensão celular, que foi colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de células (A). De 50 a 100 µl da suspensão celular foi levada a uma citocentrífuga, e as lâminas foram coradas com HE para a contagem diferencial de células, realizadas por meio de um microscópio óptico (B) e (C). Os resultados estão representados pela média ± EPM do número de células, n= 8-14 cada grupo, *P<0,05, ***P<0,001.

4.5.2 Dosagem dos Hormônios

Por meio da análise da figura 15 constata-se que o tratamento com MET permitiu que a concentração de CORT ficasse semelhante ao dos animais de PNN tratados apenas com o veículo.

Quanto a secreção de ACTH, observou-se uma redução da concentração do hormônio apenas nos animais de BPN após LPA. Animais de PNN e BPN tratados com MET apresentaram concentrações significativamente maiores de ACTH, de maneira que a concentração do hormônio nos animais de BPN tratados com MET ainda é maior que os de PNN tratados apenas com sob a mesma condição. Com relação aos tratados com MET, os MET desenvolvendo LPA, tanto de PNN quanto de BPN apresentaram concentrações menores de ACTH; e em relação aos animais desenvolvendo LPA, apenas os de BPN tratados com MET apresentaram uma concentração maior do que os de BPN não tratados com MET.

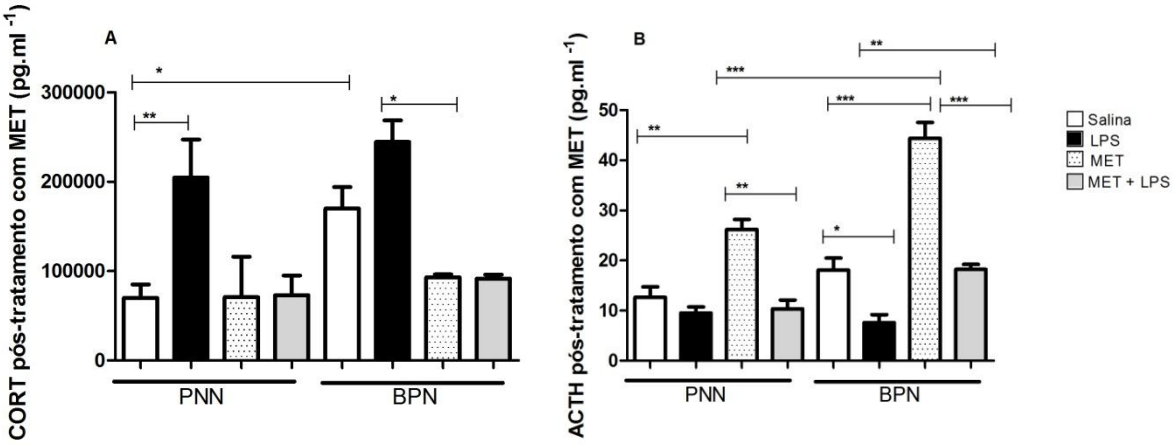


Figura 15 - Análise dos hormônios mediante tratamento com MET. O soro foi utilizado para quantificação dos hormônios, de maneira que, conforme recomendações do fabricante, 25 µl do soro foi incubado em uma placa de 96 cavidades de um kit multiplex, juntamente a *beads* magnéticas e anticorpos específicos para detecção de corticosterona (A) e ACTH (B). Os resultados estão representados pela média ± EPM da concentração do hormônio, n= 5 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

5 DISCUSSÃO

O protocolo de 50% de restrição global da ração dada as ratas prenhes gerou alguns efeitos sobre as gestantes e os filhotes, os quais foram previamente estudados por Landgraf e colaboradores (2005).

O baixo peso ao nascer pode ser consequência da privação nutricional intraútero, resultando na restrição do crescimento fetal (HOFMAN et al., 2004). Ao sair de uma situação restritora de crescimento para outra com oferta adequada de nutrientes, pode haver acelerada recuperação do crescimento para se atingir o potencial geneticamente determinado (PRADER; TANNER; VON, 1963). Este perfil de crescimento acelerado é denominado *Catch-up growth*, que pode ser definido como a velocidade de ganho de peso e/ou de crescimento maior que os limites estatísticos de normalidade para idade e maturidade, durante um período de tempo definido, o qual se segue um período de inibição transitória do crescimento. Trata-se de um processo fisiológico cuja premissa é a recuperação do tamanho de um organismo submetido à restrição, com a finalidade de se alcançar o tamanho próprio para idade, sexo e grau de maturação (BOERSMA; WIT, 1997).

O processo inflamatório pulmonar desencadeado por meio do estímulo com LPS simula a lesão pulmonar aguda (LPA), do inglês, *acute lung injury* (ALI), ou síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), do inglês, *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) que ocorre em humanos, e cujas etiologias podem ser sepse ou infecções do trato respiratório (GUO et al., 2012; MEI et al., 2007; WARE; MATTHAY, 2000). Trata-se de uma lesão pulmonar aguda que se instala em um período entre seis e quarenta e oito horas, com manifestações clínicas, histopatológicas e radiográficas específicas, tais como hipoxemia e aumento do infiltrado celular no pulmão (HUDSON et al., 1995; PEPE et al., 1982). O reconhecimento do LPS pelo TLR4 leva a ativação do fator de transcrição NF-κB, que ativa genes envolvidos com a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, resultando no recrutamento de neutrófilos, que por sua vez, secreta mais citocinas, demais mediadores inflamatórios, e enzimas, causando lesão nas células do epitélio alveolar e do endotélio capilar, amplificando assim as características da LPA (JOHNSON; MATTHAY, 2010; OPITZ et al., 2010).

Ao se instilar LPS i.n nos animais, notou-se o aumento do infiltrado de leucócitos no BAL, principalmente, o de neutrófilos. Este aumento foi observado nos animais de PNN, no entanto, apesar de o número de neutrófilos também aumentar nos animais de BPN, e este aumento ser significativo, foi menor do que o dos animais de PNN. É estabelecido que em modelos animais de LPA, uma das características da síndrome seja o aumento do número absoluto de neutrófilos no BAL (AEFFNER; BOLON; DAVIS, 2015; MATUTE-BELLO et al., 2011).

A LPA em animais é evidenciada histologicamente por acúmulo de neutrófilos nos espaços alveolares e intersticiais, espessamento da parede alveolar, formação de membranas hialinas, presença de debris proteináceos no espaço alveolar, evidência de hemorragia, e alterações macroscópicas grosseiras, como por exemplo, descoloração dos pulmões (AEFFNER et al., 2015; MATUTE-BELLO et al., 2011). Quando é visto um baixo número de neutrófilos nos espaços alveolares dos cortes histológicos, os dados devem ser confirmados através da contagem total e diferencial no BAL, sendo um método citológico mais sensível, pois permite a obtenção de resultados quantitativos, passíveis de análise estatística (AEFFNER et al., 2015). Na análise qualitativa do corte histológico, os neutrófilos podem se localizar nos espaços alveolares, septo alveolar e interstício (MATUTE-BELLO et al., 2011). Outra característica importante que se faz presente, é a notável distância intersticial dada pela perda de conectividade entre os tecidos em volta do bronquíolo e vasculatura. Isso se deve ao acúmulo de fluido no interstício, ocasionando o edema (PARKER; TOWNSLEY, 2004), fenômeno que ocorre somente após a água extravascular no interstício dos tecidos aumentar por mais de 35% (WU et al., 1995).

Pela análise histopatológica, foi observado na figura 7(B) um aumento do infiltrado de células no tecido pulmonar em animais de PNN, e pela contagem diferencial, confirma-se que este infiltrado trata-se de neutrófilos, de maneira que não houve diferença no número de células mononucleares. O edema não foi observado nestes cortes histológicos. Entretanto, a informação mais importante, confirmada também pela contagem diferencial de células no BAL, é que o infiltrado de células no pulmão de animais com BPN desenvolvendo LPA, visto pela figura 7(E), está reduzido em comparação aos animais de PNN.

Outra característica da LPA é o aumento de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no tecido pulmonar e BAL (AEFFNER et al., 2015; MATUTE-BELLO et al., 2011), dentre elas, IL-1β (MARON-GUTIERREZ et al., 2013), IL-6, e TNF-α

(WANG et al., 2015; XU et al., 2014). A citocina IL-1β, umas das primeiras a serem produzidas perante o estímulo, apresenta a capacidade de, assim como TNF-α, estimular a produção de IL-6 e MIP-2, ao passo que, IL-6, pode inibir a produção das outras duas citocinas (BURGER; DAYER, 1995; JORDAN et al., 1995).

Os resultados mostraram que IL-6 foi a única das três citocinas com produção diminuída nos animais de BPN desenvolvendo LPA, no entanto, após a redução da concentração de CORT por adrenalectomia, a produção de IL-6 foi aumentada, ao passo que, TNF-α foi produzido de maneira similar nos animais de PNN e BPN desenvolvendo LPA, porém, após redução de CORT por adrenalectomia, apenas os animais de BPN desenvolvendo LPA tiveram aumento exacerbado da concentração pulmonar de TNF-α. Os GCs endógenos conferem uma importante defesa ao hospedeiro contra endotoxina, no entanto, sabe-se que seus efeitos sobre o sistema imune dependerá da dose e tempo de exposição (BERTINI; BIANCHI; GHEZZI, 1988; EVANS; ZUCKERMAN, 1991). Foi demonstrado que baixas doses fisiológicas de CORT pode aumentar a produção de IL-6 e TNF-α em resposta ao LPS (LIAO et al., 1995; ZHANG, T. Y.; DAYNES, 2007). Alguns estudos mostraram que a adrenalectomia pode aumentar, ou não surtir nenhum efeito sobre as concentrações plasmáticas de TNF-α após estímulo com LPS. Porém, quando houve este efeito, sugeriu-se que estivesse relacionado à perda de adrenalina, e não de corticosterona (LE CONTEL et al., 1995; MELTZER et al., 2003; MORROW et al., 1993; PERRETTI et al., 1993; PETTIPHER et al., 1996). Visto que tanto animais de PNN, quanto de BPN estão com ausência de adrenalina, e o aumento de TNF-α no pulmão ocorreu apenas nos animais de BPN desenvolvendo LPA, e que a desnutrição *in utero* acarreta em uma série de alterações ainda não muito bem compreendidas, pode-se inferir que a ausência desta catecolamina, ou o sistema que a integra, possam estar alterados nos animais de BPN, todavia, mais estudos seriam necessários para se compreender estas alterações e entender a relação entre catecolaminas e produção de TNF-α. Além disso, Lim et al. (2007) observaram que macrófagos de ratos adrenalectomizados, extraídos do peritônio por tioglicolato, apresentaram secreção de TNF-α antes mesmo de serem estimulados com LPS, indicando que a adrenalectomia pode deixar estas células pré-ativadas. Levando em consideração as alterações da desnutrição intrauterina, mais informações acerca da atividade de macrófagos, e outros leucócitos em animais de BPN, seriam necessárias.

A quimiocina MIP-2, sistematicamente conhecida por CXCL 2 ou 3, que apresenta homologia funcional à CXCL8 (IL-8), também participa do desenvolvimento da LPA no recrutamento de neutrófilos (CHUANG et al., 2013; KONRAD; REUTERSHAN, 2012), e também pode ter sua produção reduzida mediante os efeitos dos glicocorticoides (JANSSON, A. H.; ERIKSSON; WANG, 2005). O dado obtido no presente estudo mostra que os animais de BPN desenvolvendo LPA apresenta produção reduzida de MIP-2, e que esta produção foi aumentada após redução de CORT por adrenalectomia.

Analisando-se a expressão das enzimas envolvidas na cascata do ácido araquidônico, e dos mediadores lipídicos, observou-se que tanto a COX-2, como a 5-LO, são aumentadas após instilação de LPS i.n. em animais de PNN. A enzima COX-2 pode ser aumentada durante a inflamação em resposta a ação de citocinas, e agravar a lesão pulmonar aguda, contribuindo com a produção dos prostanoides, dentre eles, a PGE_2 (JAKUBOWSKI et al., 2009). A ação da 5-LO está intimamente relacionada a produção de LTB_4, que por sua vez, participa da LPA recrutando polimorfonucleares e produzindo o edema pulmonar (ANTONELLI et al., 1994; MASCLANS et al., 2007).

Os animais de BPN não apresentaram aumento das enzimas, e consequentemente, também dos mediadores no desenvolvimento da LPA. Contudo, após redução da concentração de CORT por adrenalectomia, tanto as enzimas, como os mediadores, tiveram aumento durante a LPA. Os GCs podem impedir a geração de ácidos graxos livres a partir dos fosfolipídios de membrana, diminuir a ação e expressão de FLA_2, fatores que comprometem a geração dos eicosanoides (BAILEY, 1991; BECKER; GRASSO; DAVIS, 1988; MALCHER-LOPES; BUZZI, 2009; VISHWANATH et al., 1993). Além disso, modulando a expressão de citocinas, por transrepressão de NFκB, os glicocorticoides também interferem na produção de PGE_2 via COX-2 (MITCHELL et al., 1994; RAE et al., 2004; YANG et al., 2012).

A dosagem de hormônios mostrou que há um aumento de CORT durante o desenvolvimento da LPA nos animais de PNN, enquanto que nos animais de BPN, isso não ocorre, visto que a concentração de CORT já se encontra elevada. Os animais adrenalectomizados, tanto de PNN, quanto de BPN, apresentaram concentrações semelhantes de CORT, uma vez que, como não apresentam adrenal, a CORT detectada pelo ensaio de multiplex é apenas a da reposição.

É bem estabelecido na literatura que durante uma resposta de fase aguda, induzida por LPS, por exemplo, ocorre ativação do eixo HPA, com consequente aumento da concentração de ACTH e CORT no plasma dentro de minutos (KARROW, 2006). A concentração em doses fisiológicas de 3 mg/kg de CORT foi administrada com base na literatura (CAMPOLONGO et al., 2009; JACOBI, 2006; LISTON; GAN, 2011; ZHANG, Y. C. et al., 2010), porém, ainda assim, foram administrados mais dois valores da concentração de CORT como reposição para se determinar a dose mais adequada para o experimento em questão. A dose de 5 mg/kg também proporcionou um maior infiltrado de células totais e neutrófilos no BAL de animais com BPN desenvolvendo LPA (Figura 1, em apêndice), entretanto, a dose de 7 mg/kg, permitiu que as células totais e o número de neutrófilos no BAL ainda permanecessem reduzidos nos animais de BPN desenvolvendo LPA (Figura 3, em apêndice). Com relação a dosagem dos hormônios nos animais submetidos a reposição com diferentes concentrações de CORT, foi observado que ambos os hormônios (Figuras 2 e 4, em apêndice), em ambas as doses de reposição surtiram resultados semelhantes aos da reposição de 3 mg/kg, utilizada no decorrer dos experimentos.

Sainio, Lehtola e Roininen (1998) observaram que a meia-vida da CORT total no plasma de ratos é de 25 min. Partindo deste pressuposto, e levando em consideração que a eutanásia ocorreu 24 h após a última reposição, justifica-se os níveis de CORT estarem bastante reduzidos nos animais adrenalectomizados recebendo uma única dose de reposição diária de 3 mg/kg, 5 mg/kg, ou 7 mg/kg.

Não houveram diferenças na produção de ACTH entre animais de BPN e PNN, mesmo a CORT dos animais de BPN estando elevada. Foi observado que os animais adrenalectomizados, independente do peso ao nascer, apresentaram maior concentração de ACTH, o que é justificado pela ausência da adrenal e níveis reduzidos de CORT. Interessantemente, mesmo sem adrenal, o que impossibilita uma regulação normal do eixo HPA, as concentrações de ACTH foram reduzidas nos animais adrenalectomizados desenvolvendo LPA.

A análise da expressão proteica dos receptores de GCs também forneceu algumas informações importantes. Foi observado que animais de PNN apresentaram redução da expressão destes receptores durante o desenvolvimento da LPA, enquanto que os de BPN não apresentam esta redução, visto que os níveis basais de expressão dos receptores já se encontravam reduzidos.

Zhang, et al. (2010) mostraram que em um modelo murino de choque induzido por LPS, ocorreu diminuição da expressão gênica de GR nos pulmões 6h após a injeção da endotoxina. Foi visto também em um modelo de choque suíno induzido por endotoxina, que a expressão de GR estava diminuída nos pulmões, fígado e rim, com aumento de mediadores inflamatórios tais como TNF-α, e os fatores de transcrição, AP-1 e NF-κB, 6 h após injeção intravenosa da endotoxina (DA; CHEN; HEDENSTIERNA, 2007). As citocinas produzidas durante o processo inflamatório podem regular a afinidade e o número de GRs, inferindo que, a inflamação pode modular a resposta celular dos GCs através de mediadores inflamatórios produzidos no local (KAM et al., 1993; SHER et al., 1994; VERHEGGEN et al., 1996).

As concentrações plasmáticas de proteínas, em especial a albumina, pode estar reduzida em alguns processos de desnutrição (JAMES; HAY, 1968). Landgraf (2005) não observou nenhuma alteração na concentração sérica de albumina neste modelo de desnutrição intrauterina. A transcortina é responsável por transportar mais de 80% de CORT do plasma, e apresenta interação com proteinases-alvo, possibilitando sua mudança conformacional, permitindo assim, sua maior ou menor interação com os GCs. Por estes achados, acredita-se que a transcortina não se limita apenas a transportar os GCs, mas liberá-los em tecidos-alvo (LIN; MULLER; HAMMOND, 2010; PEMBERTON et al., 1988; PEROGAMVROS; RAY; TRAINER, 2012). Nenhuma diferença foi observada na concentração de transcortina no plasma entre os grupos, por outro lado, não se sabe acerca da sua afinidade pelos GCs nos animais de BPN.

A metirapona (MET) é um inibidor seletivo da síntese de GCs, em humanos e roedores (ROOZENDAAL; BOHUS; MCGAUGH, 1996). A administração da MET resultou em doses similares de CORT em animais de PNN e BPN, que receberam salina ou LPS, de maneira que reduziu a concentração de CORT nos animais de BPN. Essa redução dos níveis de CORT pelo uso da MET, assim como pela adrenalectomia, aumentou o número de células totais e neutrófilos no BAL de animais com BPN desenvolvendo LPA, todavia, em se tratando da MET, este aumento foi ainda maior que o grupo de PNN. Além disso, a MET aumentou o número de mononucleares no BAL dos animais de BPN com lesão pulmonar aguda. Peruzzo, et al. (2010) demonstrou que a MET aumenta a expressão de IL-1β, TNF-α e IL-6 em doenças inflamatórias. Apesar de não dosadas as citocinas nesta

circunstância, pode-se deduzir que o aumento de células no BAL nos animais de BPN se deva ao aumento de citocinas por influência da MET, associada a uma possível desregulação no padrão de resposta das células imunológicas destes animais.

Os dados do presente estudo mostram que na ausência da adrenal e reposição de CORT em doses fisiológicas, os animais de BPN passam a responder à LPA de maneira semelhante ao animal de PNN. Estudos mostram que ratos adrenalectomizados apresentam aumento do influxo de neutrófilos nas regiões da inflamação (LEECH et al., 2000; ROVAI; HERSCHMAN; SMITH, 1998). Este evento pode estar relacionado ao controle negativo que os GCs exercem sobre as moléculas de adesão dos leucócitos (CAVALCANTI et al., 2006; FARSKY; SANNOMIYA; GARCIA-LEME, 1995).

As alterações no processo de regulação e ação dos GCs podem ter origem no desenvolvimento do feto, que acabam sendo levadas para a vida adulta, e até para outras gerações. Belkacemi e colaboradores (2011) descreveram que a restrição alimentar produz uma resposta estressora na mãe com evidente elevação de CORT, alterando as enzimas regulatórias placentárias (11β-HSD1 e 2), e a regulação do eixo HPA da mãe e da prole (CORREIA-BRANCO; KEATING; MARTEL, 2015; EDWARDS et al., 1993; SECKL, 2004). A expressão gênica de 11β-HSD1 e 2 pulmonar em animais de PNN e BPN foi avaliada, porém os dados são inconclusivos e experimentos adicionais serão necessários.

Foi relatado que a prole de ratos macho desnutridos *in utero*, um bom modelo de restrição do crescimento intrauterino (RCIU), nasce com CORT elevada, peso da adrenal diminuído, e concentração de ACTH reduzida, enquanto que nos estágios intermediários da vida, não se observam muitas alterações; quando se atinge 8 meses de vida, por apresentarem concentrações elevadas e normais de CORT e ACTH respectivamente, hipotetiza-se que apresentam o córtex da adrenal hipersensível a estimulação de ACTH, ou que a secreção de CORT é, pelo menos em partes, independente da ação de ACTH (LESAGE et al., 2001; VIEAU et al., 2007). Estes mesmos autores postulam que a desnutrição maternal severa provoca efeitos a curto e longo prazo no eixo HPA da prole adulta. É então viável que a desnutrição maternal, por meio da desregulação da secreção de GCs na prole,

possa contribuir com a programação de doenças inflamatórias e imunológicas (KARROW, 2006).

Estudos já demonstraram que a restrição alimentar de 50% das mães durante a gestação elevam os níveis de GCs maternos e prejudicam a angiogênese e o desenvolvimento do pulmão da prole (KHORRAM et al., 2014; REHAN et al., 2014).

Sabe-se também que a restrição proteica provoca hipometilação nos promotores dos genes de GRs, alteração esta que pode ser propagada para as futuras gerações, porém que pode ser revertida com suplementação por ácido fólico e glicina (BRAWLEY et al., 2004; JACKSON et al., 2002; LILLYCROP et al., 2005). Acredita-se através destes achados que a restrição do crescimento fetal (RCF) não seja uma consequência direta da superexposição dos fetos aos GCs maternos, entretanto, esta superexposição, consequente da desnutrição materna, esteja envolvida com a programação fetal de doenças na vida adulta (BARKER, 1990; BELKACEMI et al., 2011; CORREIA-BRANCO et al., 2015).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que a concentração elevada de CORT, presente em animais de BPN, está modulando negativamente a resposta inflamatória pulmonar aguda. Ainda que a redução de CORT nos animais com BPN desenvolvendo LPA resultou em aumento dos mediadores inflamatórios que estavam com sua produção diminuída, alguns efeitos observados não estão totalmente compreendidos. É possível então supor que, além da concentração elevada de CORT, os animais de BPN podem apresentar outras alterações que interferem na resposta imunológica aguda, como atividade dos fagócitos e regulação do sistema nervoso autônomo simpático, entretanto, outros estudos se fazem necessários para confirmação.

REFERÊNCIAS*

AEFFNER, F.; BOLON, B.; DAVIS, I. C. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements. **Toxicol. Pathol.,** v. 43, n. 8, p. 1074-1092, Dec 2015.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell,** v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006.

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol. Ther.,** v. 139, n. 2, p. 189-212, Aug 2013.

ALEXANDER, B. N.; FEWELL, J. Metyrapone restores the febrile response to *Escherichia coli* LPS in pregnant rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. 1588-1595, Jun 2011.

ANTONELLI, M. et al. Leukotrienes and alpha tumor necrosis factor levels in the bronchoalveolar lavage fluid of patient at risk for the adult respiratory distress syndrome. **Minerva Anestesiol.,** v. 60, n. 9, p. 419-426, Sep 1994.

APLIN, A. E. et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.,** v. 50, n. 2, p. 197-263, Jun 1998.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature,** v. 392, n. 6676, p. 565-568, Apr 1998.

BAGGIOLINI, M.; LOETSCHER, P. Chemokines in inflammation and immunity. **Immunol. Today,** v. 21, n. 9, p. 418-420, Sep 2000.

BAILEY, J. M. New mechanisms for effects of anti-inflammatory glucocorticoids. **Biofactors,** v. 3, n. 2, p. 197-102, Jun 1991.

BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ,** v. 301, n. 6761, p. 1111, Nov 17 1990.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de janeiro, 2002.

BARKER, D. J. The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. The Marc Daniels Lecture 1990. **J. R. Coll. Physicians. Lond.,** v. 25, n. 2, p. 129-133, Apr 1991.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clin. Sci. (Lond.),** v. 94, n. 6, p. 557-572, Jun 1998.

BECKER, J. L.; GRASSO, R. J.; DAVIS, J. S. Dexamethasone action inhibits the release of arachidonic acid from phosphatidylcholine during the suppression of yeast phagocytosis in macrophage cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 153, n. 2, p. 583-590, Jun 1988.

BELKACEMI, L. et al. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. **Reprod. Biol. Endocrinol.,** v. 9, p. 105, Aug 2011.

BERTINI, R.; BIANCHI, M.; GHEZZI, P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.,** v. 167, n. 5, p. 1708-1712, May 1988.

BOERSMA, B.; WIT, J. M. Catch-up growth. **Endocr. Rev.,** v. 18, n. 5, p. 646-661, Oct 1997.

BRAWLEY, L. et al. Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy. **J. Physiol.,** v. 554, n. Pt 2, p. 497-504, Jan 2004.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **J. Endocrinol.,** v. 175, n. 1, p. 99-112, Oct 2002.

BURGER, D.; DAYER, J. M. Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. **Neurology,** v. 45, n. 6 Suppl 6, p. S39-43, Jun 1995.

CAMPOLONGO, P. et al. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 106, n. 12, p. 4888-4893, Mar 2009.

CASSON, P. R. et al. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. **Hum. Reprod.,** v. 15, n. 10, p. 2129-2132, Oct 2000.

CAVALCANTI, D. M. et al. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. **Mol. Cell. Endocrinol.,** v. 249, n. 1-2, p. 32-39, Apr 2006.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am. J. Clin. Nutr.,** v. 66, n. 2, p. 460S-463S, Aug 1997.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **Eur. J. Clin. Nutr.,** v. 56 Suppl 3, p. S73-76, Aug 2002.

CHUANG, K. H. et al. Attenuation of LPS-induced lung inflammation by glucosamine in rats. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.,** v. 49, n. 6, p. 1110-1119, Dec 2013.

CORREIA-BRANCO, A.; KEATING, E.; MARTEL, F. Maternal undernutrition and fetal developmental programming of obesity: the glucocorticoid connection. **Reprod. Sci.,** v. 22, n. 2, p. 138-145, Feb 2015.

CRONSTEIN, B. N. et al. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 89, n. 21, p. 9991-9995, Nov 1992.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J. Allergy Clin. Immunol.,** v. 115, n. 6, p. 1119-1128; quiz 1129, Jun 2005.

DA, J.; CHEN, L.; HEDENSTIERNA, G. Nitric oxide up-regulates the glucocorticoid receptor and blunts the inflammatory reaction in porcine endotoxin sepsis. **Crit. Care Med.,** v. 35, n. 1, p. 26-32, Jan 2007.

DAHRI, S. et al. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes,** v. 40 Suppl 2, p. 115-120, Dec 1991.

DE GUIA, R. M.; ROSE, A. J.; HERZIG, S. Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. **Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.,** v. 19, n. 2, p. 117-128, Aug 2014.

DE KLEER, I. et al. Ontogeny of myeloid cells. **Front. Immunol.,** v. 5, p. 423, 2014.

EDWARDS, C. R. et al. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? **Lancet,** v. 341, n. 8841, p. 355-357, Feb 1993.

ERGAZ, Z.; AVGIL, M.; ORNOY, A. Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? **Reprod. Toxicol.,** v. 20, n. 3, p. 301-322, Sep-Oct 2005.

EVANS, G. F.; ZUCKERMAN, S. H. Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. **Eur. J. Immunol.,** v. 21, n. 9, p. 1973-1979, Sep 1991.

FARSKY, S. P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. **J. Leukoc. Biol.,** v. 57, n. 3, p. 379-386, Mar 1995.

FISHER, R. E.; STEELE, M.; KARROW, N. A. Fetal programming of the neuroendocrine-immune system and metabolic disease. **J. Pregnancy,** v. 2012, p. 792934, 2012.

FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci.,** v. 15, n. 3, p. 71-76, Mar 1994.

FRANCO, Mdo. C. et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc. Res.**, v. 56, n. 1, p. 145-163, Oct 2002.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol. 2000,** v. 63, n. 1, p. 149-164, Oct 2013.

GARREL, D. R. Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: nutritional modulation and clinical implications. **Horm. Res.,** v. 45, n. 3-5, p. 245-251, 1996.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. **Semin. Fetal Neonatal Med.,** v. 9, n. 5, p. 419-425, Oct 2004.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **Am. J. Hum. Biol.,** v. 19, n. 1, p. 1-19, Jan-Feb 2007.

GOLDSTEIN, D. S.; EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 305, n. 3, p. 800-811, Jun 2003.

GONZALEZ-AMARO, R.; SANCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Crit. Rev. Immunol.,** v. 19, n. 5-6, p. 389-429, 1999.

GRAD, I.; PICARD, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. **Mol. Cell. Endocrinol.,** v. 275, n. 1-2, p. 2-12, Sep 2007.

GUO, Z. et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin. **Mediators Inflamm.,** v. 2012, p. 540794, 2012.

HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ,** v. 303, n. 6809, p. 1019-1022, Oct 1991.

HOFMAN, P. L. et al. Premature birth and later insulin resistance. **N. Engl. J. Med.,** v. 351, n. 21, p. 2179-2186, Nov 2004.

HOUCK, J. C. Inflammation: a quarter century of progress. **J. Invest. Dermatol.,** v. 67, n. 1, p. 124-128, Jul 1976.

HUDSON, L. D. et al. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.,** v. 151, n. 2 Pt 1, p. 293-301, Feb 1995.

HUXLEY, R. et al. Is birth weight a risk factor for ischemic heart disease in later life? **Am. J. Clin. Nutr.,** v. 85, n. 5, p. 1244-1250, May 2007.

INCERPI, E. K et al. Inhibition of endogenous glucocorticoid synthesis aggravates lung injury triggered by septic shock in rats**. Int. J. Exp. Path.**, v. 96, n. 3, p. 133-139, Jun 2015.

JACKSON, A. A. et al. Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. **Clin. Sci. (Lond.),** v. 103, n. 6, p. 633-639, Dec 2002.

JACOBI, J. Corticosteroid replacement in critically ill patients. **Crit. Care Clin.,** v. 22, n. 2, p. 245-253, Apr 2006.

JAKUBOWSKI, A. et al. S-nitroso human serum albumin given after LPS challenge reduces acute lung injury and prolongs survival in a rat model of endotoxemia. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.,** v. 379, n. 3, p. 281-290, Mar 2009.

JAMES, W. P.; HAY, A. M. Albumin metabolism: effect of the nutritional state and the dietary protein intake. **J. Clin. Invest.**, v. 47, n. 9, p. 1958-1972, Sep 1968.

JANSSON, A. H.; ERIKSSON, C.; WANG, X. Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. **Vascul. Pharmacol.,** v. 43, n. 2, p. 101-111, Aug 2005.

JANSSON, T.; POWELL, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clin. Sci. (Lond.),** v. 113, n. 1, p. 1-13, Jul 2007.

JAQUET, D. et al. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 85, n. 4, p. 1401-1406, Apr 2000.

JOHN, C. D.; BUCKINGHAM, J. C. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Curr. Opin. Pharmacol.,** v. 3, n. 1, p. 78-84, Feb 2003.

JOHNSON, E. R.; MATTHAY, M. A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.,** v. 23, n. 4, p. 243-252, Aug 2010.

JORDAN, M. et al. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. **J. Immunol.,** v. 154, n. 8, p. 4081-4090, Apr 1995.

KAGAN, J. C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nat. Immunol.,** v. 9, n. 4, p. 361-368, Apr 2008.

KAM, J. C. et al. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. **J. Immunol.,** v. 151, n. 7, p. 3460-3466, Oct 1993.

KARROW, N. A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. **Brain Behav. Immun.,** v. 20, n. 2, p. 144-158, Mar 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.,** v. 11, n. 5, p. 373-384, May 2010.

KEMPNA, P.; FLUCK, C. E. Adrenal gland development and defects. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 22, n. 1, p. 77-93, Feb 2008.

KHORRAM, O. et al. Excess maternal glucocorticoids in response to in utero undernutrition inhibit offspring angiogenesis. **Reprod. Sci.,** v. 21, n. 5, p. 601-611, May 2014.

KONRAD, F. M.; REUTERSHAN, J. CXCR2 in acute lung injury. **Mediators Inflamm.,** v. 2012, p. 740987, 2012.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. Toll like receptors in diseases of the lung. **Int . Immunopharmacol.,** v. 11, n. 10, p. 1399-1406, Oct 2011.

KUEHL, F. A., JR.; EGAN, R. W. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. **Science,** v. 210, n. 4473, p. 978-984, Nov 1980.

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure:function relationship. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.,** v. 94, n. 5, p. 383-394, Apr 2005.

KYLE, U. G.; PICHARD, C. The Dutch Famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care,** v. 9, n. 4, p. 388-394, Jul 2006.

LANDGRAF, M. A. **Estudo da migração leucocitária em ratos desnutridos intrauterinamente.** 2005. 146f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LANDGRAF, M. A. et al. Influence of age on the development of immunological lung response in intrauterine undernourishment. **Nutrition,** v. 24, n. 3, p. 262-269, Mar 2008.

LANDGRAF, M. A. et al. Intrauterine undernourishment alters TH1/TH2 cytokine balance and attenuates lung allergic inflammation in wistar rats. **Cell. Physiol. Biochem.,** v. 30, n. 3, p. 552-562, 2012.

LANDGRAF, M. A. et al. Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. **J. Nutr.,** v. 135, n. 6, p. 1480-1485, Jun 2005.

LANGLEY, S. C.; BROWNE, R. F.; JACKSON, A. A. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. **Comp. Biochem. Physiol. Physiol.,** v. 109, n. 2, p. 223-229, Oct 1994.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol. ,** v. 2, n. 10, p. 787-795, Oct 2002.

LE BEL, M.; BRUNET, A.; GOSSELIN, J. Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. **J. Innate Immun.,** v. 6, n. 2, p. 159-168, 2014.

LE CONTEL, C. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production by cyclosporin A in mice primed with muramyl dipeptide. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 11, n. 4, p. 297-305, Jul 1995.

LEECH, M. et al. Endogenous glucocorticoids modulate experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 119, n. 1, p. 161-168, Jan 2000.

LEONE, S. et al. Molecular structure of endotoxins from Gram-negative marine bacteria: an update. **Mar. Drugs,** v. 5, n. 3, p. 85-112, Sep 2007.

LESAGE, J. et al. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology,** v. 142, n. 5, p. 1692-1702, May 2001.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 7, n. 9, p. 678-689, Sep 2007.

LIAO, J. et al. Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. **Am. J. Physiol.,** v. 268, n. 3 Pt 2, p. R699-706, Mar 1995.

LILLYCROP, K. A. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **J. Nutr.,** v. 135, n. 6, p. 1382-1386, Jun 2005.

LIM, H. Y. et al. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology,** v. 122, n. 1, p. 47-53, Sep 2007.

LIN, H. Y.; MULLER, Y. A.; HAMMOND, G. L. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. **Mol. Cell. Endocrinol.,** v. 316, n. 1, p. 3-12, Mar 2010.

LISTON, C.; GAN, W. B. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 108, n. 38, p. 16074-16079, Sep 2011.

LUCAS, A. et al. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. **Br. J. Nutr.,** v. 76, n. 4, p. 605-612, Oct 1996.

MALCHER-LOPES, R.; BUZZI, M. Glucocorticoid-regulated crosstalk between arachidonic acid and endocannabinoid biochemical pathways coordinates cognitive-, neuroimmune-, and energy homeostasis-related adaptations to stress. **Vitam Horm,** v. 81, p. 263-313, 2009.

MALKOSKI, S. P.; DORIN, R. I. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. **Mol. Endocrinol.,** v. 13, n. 10, p. 1629-1644, Oct 1999.

MARON-GUTIERREZ, T. et al. Insult-dependent effect of bone marrow cell therapy on inflammatory response in a murine model of extrapulmonary acute respiratory distress syndrome. **Stem Cell Res. Ther.,** v. 4, n. 5, p. 123, Oct 2013.

MASCLANS, J. R. et al. Possible prognostic value of leukotriene B(4) in acute respiratory distress syndrome. **Respir. Care,** v. 52, n. 12, p. 1695-1700, Dec 2007.

MATUTE-BELLO, G. et al. 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, n. 5, p. 725-738, May 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature,** v. 454, n. 7203, p. 428-435, Jul 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell,** v. 140, n. 6, p. 771-776, Mar 2010.

MEI, S. H. et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. **PLoS Med.,** v. 4, n. 9, p. e269, Sep 2007.

MELTZER, J. C. et al. Contribution of the adrenal glands and splenic nerve to LPS-induced splenic cytokine production in the rat. **Brain Behav. Immun.,** v. 17, n. 6, p. 482-497, Dec 2003.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocr. Rev.,** v. 32, n. 1, p. 81-151, Feb 2011.

MILLS, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 11, n. 12, p. 807-822, Nov 2011.

MITCHELL, J. A. et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.,** v. 113, n. 3, p. 1008-1014, Nov 1994.

MOORE, S. E. et al. Early immunological development and mortality from infectious disease in later life. **Proc. Nutr. Soc.,** v. 65, n. 3, p. 311-318, Aug 2006.

MORROW, L. E. et al. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. **Am. J. Physiol.,** v. 264, n. 5 Pt 2, p. R1010-1016, May 1993.

MULROW, P. J.; FRANCO-SAENZ, R. The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. **J. Hypertens.,** v. 14, n. 2, p. 173-176, Feb 1996.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 301, n. 5, p. R1207-1228, Nov 2011.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell,** v. 140, n. 6, p. 871-882, Mar 2010.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? **Am. J. Hum. Genet.,** v. 14, p. 353-362, Dec 1962.

NELSON, P. J. et al. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. **J. Immunol.,** v. 151, n. 5, p. 2601-2612, Sep 1993.

NORTHROP, J. P.; ULLMAN, K. S.; CRABTREE, G. R. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. **J. Biol. Chem.,** v. 268, n. 4, p. 2917-2923, Feb 1993.

OHLS, R. K. et al. Neutrophil pool sizes and granulocyte colony-stimulating factor production in human mid-trimester fetuses. **Pediatr. Res.,** v. 37, n. 6, p. 806-811, Jun 1995.

OPITZ, B. et al. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.,** v. 181, n. 12, p. 1294-1309, Jun 2010.

ORENTREICH, N. et al. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 59, n. 3, p. 551-555, Sep 1984.

PARKER, J. C.; TOWNSLEY, M. I. Evaluation of lung injury in rats and mice. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.,** v. 286, n. 2, p. L231-246, Feb 2004.

PEMBERTON, P. A. et al. Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. **Nature,** v. 336, n. 6196, p. 257-258, Nov 1988.

PEPE, P. E. et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. **Am. J. Surg.,** v. 144, n. 1, p. 124-130, Jul 1982.

PEROGAMVROS, I.; RAY, D. W.; TRAINER, P. J. Regulation of cortisol bioavailability--effects on hormone measurement and action. **Nat. Rev. Endocrinol.,** v. 8, n. 12, p. 717-727, Dec 2012.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. **Microcirculation,** v. 7, n. 3, p. 147-61, Jun 2000.

PERRETTI, M. et al. Serum corticosterone, interleukin-1 and tumour necrosis factor in rat experimental endotoxaemia: comparison between Lewis and Wistar strains. **Br. J. Pharmacol.,** v. 110, n. 2, p. 868-874, Oct 1993.

PERUZZO, D. C. et al. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. **Cytokine,** v. 52, n. 3, p. 184-189, Dec 2010.

PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J. Immunol.,** v. 180, n. 10, p. 6439-6446, May 2008.

PETTIPHER, E. R. et al. Regulation of tumour necrosis factor production by adrenal hormones in vivo: insights into the antiinflammatory activity of rolipram. **Br. J. Pharmacol.,** v. 117, n. 7, p. 1530-1534, Apr 1996.

PRADER, A.; TANNER, J. M.; VON, H. G. Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man. **J. Pediatr.,** v. 62, p. 646-659, May 1963.

PUGEAT, M. et al. Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. **Clin. Chem.,** v. 35, n. 8, p. 1675-9, Aug 1989.

RAE, M. T. et al. Antiinflammatory steroid action in human ovarian surface epithelial cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 89, n. 9, p. 4538-4544, Sep 2004.

RATHER, L. J. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bull. N. Y. Acad. Med.,** v. 47, n. 3, p. 303-322, Mar 1971.

REHAN, V. K. et al. Metyrapone blocks maternal food restriction-induced changes in female rat offspring lung development. **Reprod. Sci.,** v. 21, n. 4, p. 517-525, Apr 2014.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **N. Engl. J. Med.,** v. 353, n. 16, p. 1711-1723, Oct 2005.

RIETSCHEL, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.,** v. 8, n. 2, p. 217-225, Feb 1994.

ROGATSKY, I.; IVASHKIV, L. B. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. **Tissue Antigens,** v. 68, n. 1, p. 1-12, Jul 2006.

ROOZENDAAL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J. L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. **Psychoneuroendocrinology,** v. 21, n. 8, p. 681-693, Nov 1996.

ROVAI, L. E.; HERSCHMAN, H. R.; SMITH, J. B. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **J. Leukoc. Biol.,** v. 64, n. 4, p. 494-502, Oct 1998.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am. J. Pathol.,** v. 86, n. 1, p. 183-276, Jan 1977.

SAINIO, E. L.; LEHTOLA, T.; ROININEN, P. Radioimmunoassay of total and free corticosterone in rat plasma: measurement of the effect of different doses of corticosterone. **Steroids,** v. 51, n. 5-6, p. 609-622, May-Jun 1988.

SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nat. Neurosci.,** v. 15, n. 8, p. 1088-1095, Jul 2012.

SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science,** v. 273, n. 5276, p. 749-750, Aug 1996.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol. Ther.,** v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002.

SCHULZ, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science,** v. 336, n. 6077, p. 86-90, Apr 2012.

SECKL, J. R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. **Eur. J. Endocrinol.,** v. 151 Suppl 3, p. U49-62, Nov 2004.

SHER, E. R. et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. **J. Clin. Invest.,** v. 93, n. 1, p. 33-39, Jan 1994.

SIITERI, P. K. et al. The serum transport of steroid hormones. **Recent Prog. Horm. Res.,** v. 38, p. 457-510, 1982.

SIMPSON, S. A.; TAIT, J. F.; BUSH, I. E. Secretion of a salt-retaining hormone by the mammalian adrenal cortex. **Lancet,** v. 2, n. 6727, p. 226-228, Aug 1952.

SOHI, G. et al. Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7alpha-hydroxylase promoter. **Mol. Endocrinol.,** v. 25, n. 5, p. 785-798, May 2011.

STRIZ, I. et al. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clin. Sci. (Lond.),** v. 126, n. 9, p. 593-612, May 2014.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J. Biol. Chem.,** v. 282, n. 16, p. 11613-11617, Apr 2007.

TANIMURA, N. et al. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 368, n. 1, p. 94-99, Mar 2008.

TANK, A. W.; LEE WONG, D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Compr. Physiol.,** v. 5, n. 1, p. 1-15, Jan 2015.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 16, n. 3, p. 379-414, Jul 2003.

VAN FURTH, R. The mononuclear phagocyte system. **Verh. Dtsch. Ges. Pathol.,** v. 64, p. 1-11, 1980.

VERHEGGEN, M. M. et al. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF-alpha and LPS. **Eur. Respir. J.,** v. 9, n. 10, p. 2036-2043, Oct 1996.

VIEAU, D. et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology,** v. 32 Suppl 1, p. S16-20, Aug 2007.

VISHWANATH, B. S. et al. Glucocorticoid deficiency increases phospholipase A2 activity in rats. **J. Clin. Invest.,** v. 92, n. 4, p. 1974-1980, Oct 1993.

VO, T.; HARDY, D. B. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. **J. Cell Commun. Signal.,** v. 6, n. 3, p. 139-153, Aug 2012.

VUGUIN, P. M. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. **Horm. Res.,** v. 68, n. 3, p. 113-123, 2007.

WANG, L. et al. Disruption of cytochrome P4501A2 in mice leads to increased susceptibility to hyperoxic lung injury. **Free Radic. Biol. Med.,** v. 82, p. 147-159, May 2015.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.,** v. 342, n. 18, p. 1334-1349, May 2000.

WILKINSON, P. C. Surface and cell membrane activities of leukocyte chemotactic factors. **Nature,** v. 251, n. 5470, p. 58-60, Sep 1974.

WILKINSON, P. C.; MCKAY, I. C. Recognition in leucocyte chemotaxis. Studies with structurally modified proteins. **Antibiot. Chemother. (1971),** v. 19, p. 421-441, 1974.

WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature,** v. 246, n. 5430, p. 215-217, Nov 1973.

WU, D. X. et al. Lung lesions in experimental hydrostatic pulmonary edema: an electron microscopic and morphometric study. **Exp. Lung Res.,** v. 21, n. 5, p. 711-730, Sep-Oct 1995.

XU, Y. et al. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice. **PLoS One,** v. 9, n. 9, p. e108914, 2014.

YANG, R. et al. Suppression of NF-kappaB pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 674, n. 2-3, p. 391-396, Jan 2012.

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

ZHANG, Y. C. et al. Glucocorticoid receptor expression on acute lung injury induced by endotoxin in rats. **World J. Emerg. Med.,** v. 1, n. 1, p. 65-69, 2010.

APÊNDICE - Dados das diferentes reposições de CORT

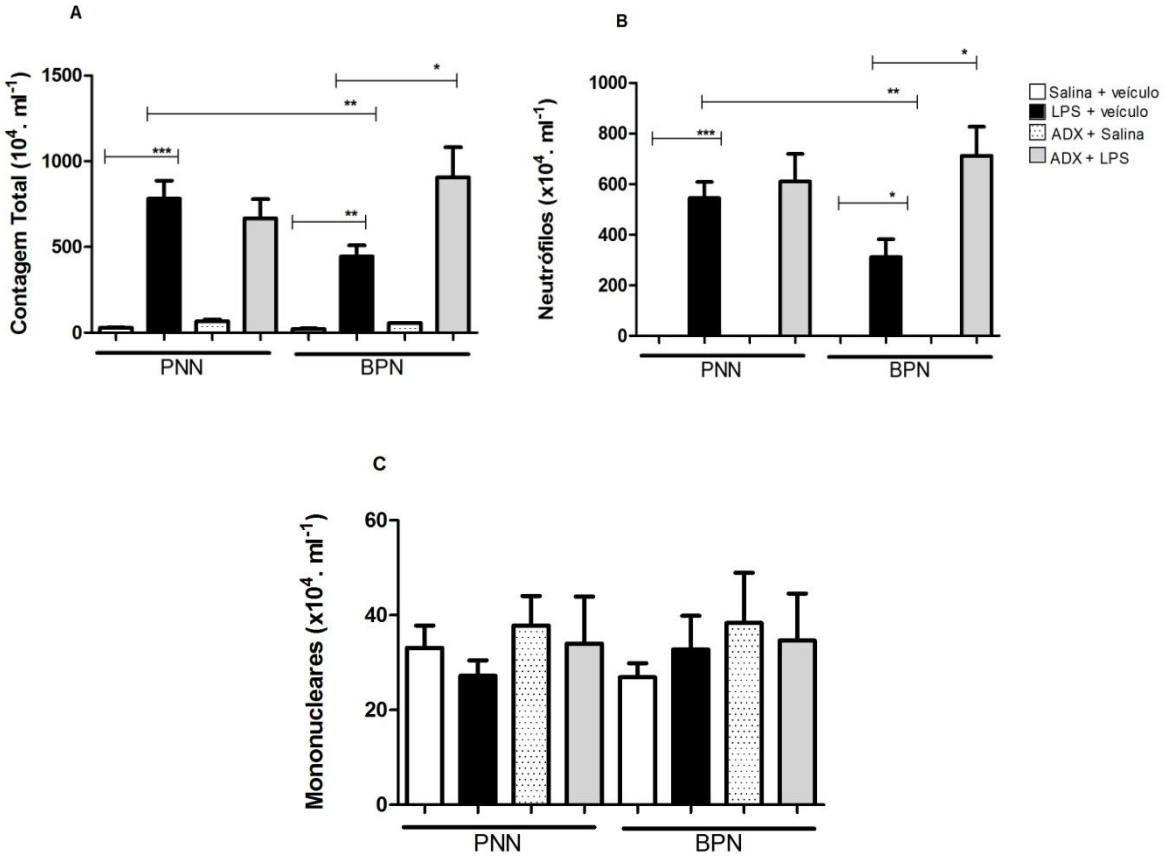


Figura 1 - Contagem de células no BAL de aniamais adrenalectomizados que receberam reposição de 5 mg/kg de CORT. O BAL foi coletado, centrifugado, e resuspenso em 1 ml de PBS. Uma solução de cristal violeta foi adicionado a 9 volumes da suspensão celular, que foi colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de céluas (A). De 50 a 100 µl da suspensão celular foi levada a uma citocentrífuga, e as lâminas foram coradas com HE para a contagem diferencial de células, realizadas por meio de um microscópio optico (B) e (C). Os animais adrenalectomizados receberam reposição de 5 mg/kg de CORT durante 7 dias. Os resultados estão representados pela média ± EPM do número de células, n= 4-6 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001.

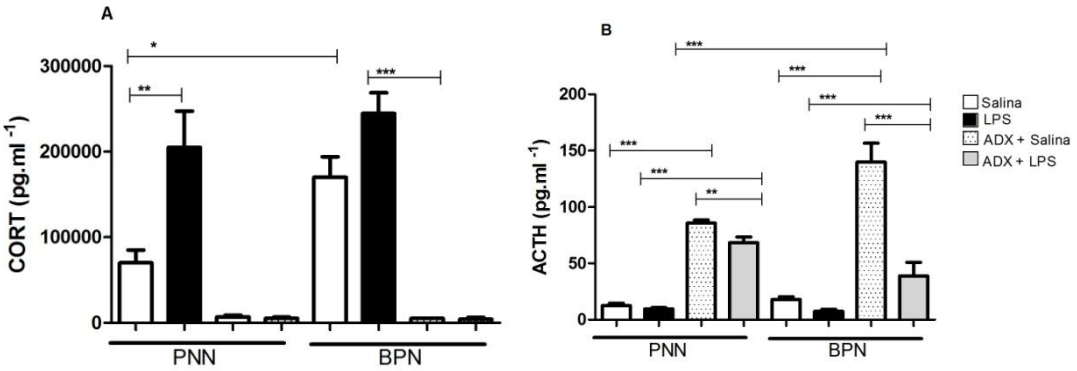


Figura 2 - Análise dos hormônios de animais adrenalectomizados que receberam reposição de 5 mg/kg . O soro foi utilizado para quantificação dos hormônios, de maneira que, conforme recomendações do fabricante, 25 µl do soro foi incubado em uma placa de 96 cavidades de um kit multiplex, juntamente a *beads* magnéticas e anticorpos específicos para detecção de corticosterona (A) e ACTH (B). Os animais adrenalectomizados receberam reposição de 5 mg/kg de CORT durante 7 dias. Os resultados estão representados pela média ± EPM da concentração do hormônio, n= 3-4 cada grupo, *****P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

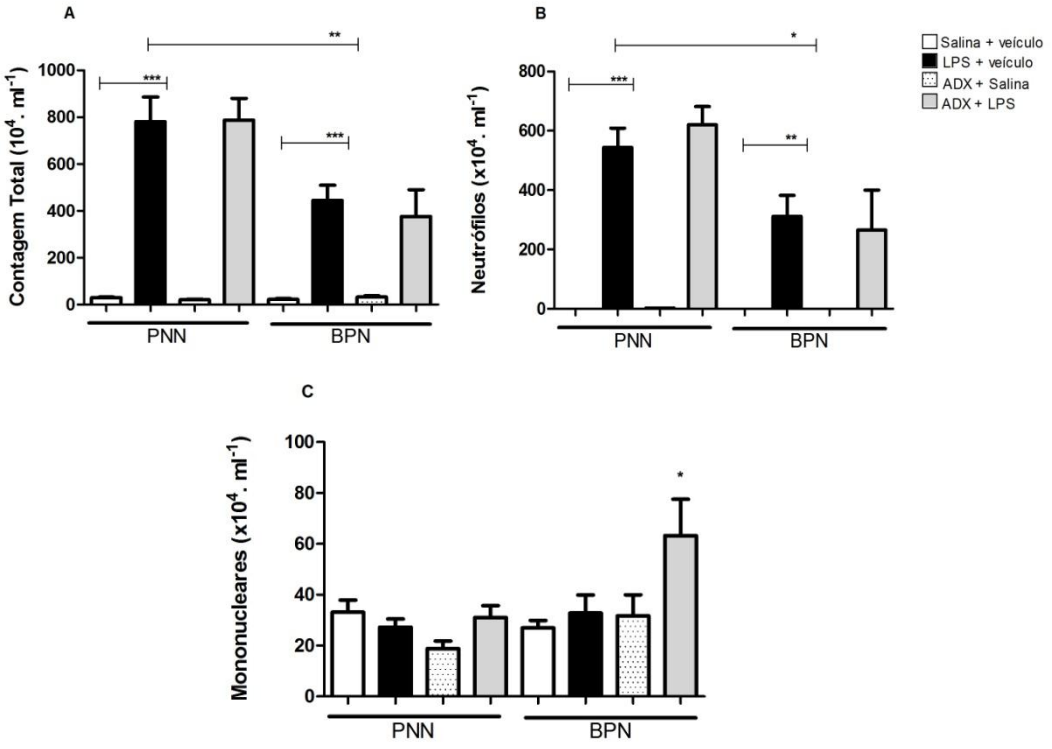


Figura 3 - Contagem de células no BAL de aniamais adrenalectomizados que receberam reposição de 7 mg/kg de CORT. O BAL foi coletado, centrifugado, e resuspenso em 1 mL de PBS. Uma solução de cristal violeta foi adicionado a 9 volumes da suspensão celular, que foi colocada em uma câmara de Neubauer para contagem total de céluas (A). De 50 a 100 µl da suspensão celular foi levada a uma citocentrífuga, e as lâminas foram coradas com HE para a contagem diferencial de células, realizadas por meio de um microscópio optico (B) e (C). Os animais adrenalectomizados receberam reposição de 7 mg/kg de CORT durante 7 dias. Os resultados estão representados pela média ± EPM do número de células, n= 4-6 cada grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

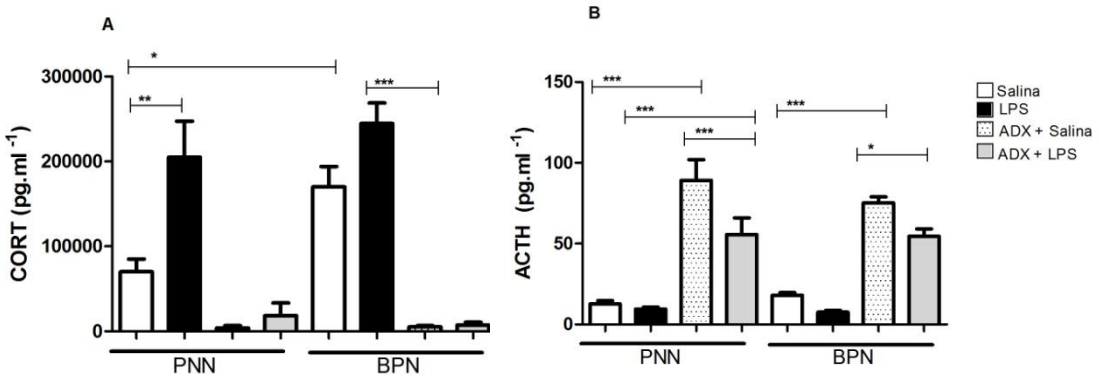


Figura 4 - Análise dos hormônios de animais adrenalectomizados que receberam reposição de 7 mg/kg . O soro foi utilizado para quantificação dos hormônios, de maneira que, conforme recomendações do fabricante, 25 µl do soro foi incubado em uma placa de 96 cavidades de um kit multiplex, juntamente a *beads* magnéticas e anticorpos específicos para detecção de corticosterona (A) e ACTH (B). Os animais adrenalectomizados receberam reposição de 5 mg/kg de CORT durante 7 dias. Os resultados estão representados pela média ± EPM da concentração do hormônio, n= 3-4 cada grupo, *****P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.