SARA RODRIGUES GARBIN

ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA INFLAMAÇÃO LOCAL, SISTÊMICA E PULMONAR CAUSADA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OBESAS

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

São Paulo
2017

SARA RODRIGUES GARBIN

ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA INFLAMAÇÃO LOCAL, SISTÊMICA E PULMONAR CAUSADA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OBESAS

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

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)

Rodrigues Garbin, Sara
Estudo da interação dos hormônios sexuais femininos na inflamação local, sistêmica e pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos fêmeas obesas. / Sara Rodrigues Garbin; orientador Wothan Tavares de Lima. -- São Paulo, 2017.
106 p.

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

1. Obesidade. 2. Ovariectomia. 3. Hormônios Sexuais Femininos. 4. Inflamação Pulmonar. 5. Isquemia e Reperfusão Intestinal. I. Tavares de Lima, Wothan, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sara Rodrigues Garbin

Titulo da Dissertação/Tese: Estudo da interação dos hormônios sexuais femininos na inflamação local, sistêmica e pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos fêmeas obesas.

Orientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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: .....

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.076/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 040/2011/CEUA, datado de 24/03/2011, renovado até 24/03/2017, e por solicitação do Prof. Dr. **Wothan Tavares de Lima,** responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Sara Rodrigues Garbin** ao Projeto de Pesquisa "*Obesidade e hormônios sexuais femininos na lesão pulmonar aguda em modelo murinho de isquemia e reperfusão intestinal*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da CEUA-ICB/USP

A minha família pelo apoio, compreensão e incentivo durante esta trajetória e por sempre estarem ao meu lado. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais José e Vera, que são o meu porto seguro. Agradeço por todo amor, dedicação, incentivo e por me amparar nos momentos mais difíceis.

Ao Wothan, um excelente orientador. Agradeço por todo ensinamento, pelas conversas, incentivos e por contribuir com a minha formação.

Aos meus familiares e amigos pelos momentos de conversa e distração.

A Evelyn, uma grande parceira e amiga que me ajudou muito nesta jornada. Não tenho palavras para agradecer por tudo que fez por mim. Foram muitos dias madrugando na USP e saindo tarde. Sempre esteve comigo para me ensinar e ajudar. Agradeço por todo companheirismo e amizade. Que Deus te abençoe em dobro. Tenho um enorme carinho por você!

A Fernanda, Maria Beatriz e o André, pela amizade, risadas, apoio e incentivo.

A Helory e Cida, por todo auxilio, solicitude e amizade.

A Ana Cristina e Professor Ricardo, pelo apoio e ensinamentos.

A Yanira, por toda ajuda, pelas conversas e orientações.

Ao Departamento de Farmacologia por todo suporte.

Foi um período de estudo desafiador, de muito aprendizado e gratificante que levarei por toda minha vida. Agradeço imensamente por fazer parte da equipe do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Instituto de Ciências Biomédicas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES e a FAPESP (2012/50550-4) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Rodrigues-Garbin, S. **Estudo da interação dos hormônios sexuais femininos na inflamação local, sistêmica e pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos fêmeas obesas.** 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A obesidade determina inflamação sistêmica crônica de baixo grau caracterizada pela geração de mediadores pró-inflamatórios a partir do tecido adiposo. A isquemia e reperfusão (IR) intestinal induz inflamação local, sistêmica e pulmonar na qual os hormônios sexuais femininos (HSF), notadamente o estradiol, exerce importante efeito modulador. Neste estudo investigamos a interação da obesidade com os HSF sobre as repercussões da IR intestinal. Para tanto, camundongos fêmeas C57Bl/6 submetidos ou não à remoção dos ovários (OVx) e mantidos com dieta hiperlipídica (9 semanas) para indução da obesidade. Como controle, foram usados animais obesos mantidos com os ovários intactos (Não OVx). Os animais obesos foram submetidos à IR intestinal (45 min, obstrução da artéria mesentérica superior) seguida de 2 h de reperfusão intestinal. Os nossos dados indicaram que somente a OVx em comparação a animais Não OVx, ambos obesos, aumentou a permeabilidade vascular e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino e no pulmão, além de aumentar o infiltrado de células no pulmão. Observou-se aumento de linfócitos, granulócitos e plaquetas circulantes. Também verificamos elevados níveis séricos de leptina, interleucina (IL) IL-17A, KC e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Ainda foi observada redução sérica de IL-6 e resistina. Além disso houve elevação da concentração sérica de fosfatase alcalina, mas não de lactato desidrogenase (LDH). No pulmão detectamos aumento de nitrito e expressão de iNOS. No tecido pulmonar houve aumento de IL-5 e IL-10 e, redução de leptina, IL-17A, KC e IL-6. No tecido adiposo elevou a concentração de KC, MIP-2, IL-6, leptina e resistina. Após os animais serem submetidos à IR intestinal os parâmetros analisados nos animais OVx exacerbaram-se em relação aos animais Não OVx. Ainda relatamos aumento de produção de células da medula óssea, redução do complexo $CD45^+/CD41^+$ e aumento do complexo $CD11b^+/CD162^+$. Observamos aumento de nitrito e expressão de iNOS no pulmão mas redução da expressão de eNOS. A IR intestinal nos animais OVx aumentou os níveis séricos de leptina, IL-17A, KC e reduziu o de resistina. Também houve elevação de geração no pulmão de VEGF e IL-1β enquanto o tecido adiposo elevou KC, MIP-2, IL-6, leptina e resistina.

Tomados em conjunto, nossos dados gerados sugerem que a redução prolongada dos HSF causada pela OVx associada à obesidade induz a um certo grau de inflamação intestinal, sistêmica e pulmonar e que a IR intestinal pode acentuar a inflamação sendo o pulmão possivelmente mais sensível.

Palavras chave: Obesidade. Ovariectomia. Hormônios Sexuais Femininos. Inflamação Pulmonar. Isquemia e Reperfusão Intestinal.

ABSTRACT

Rodrigues-Garbin, S. **The role of female sexual hormones on local, systemic and pulmonary inflammation caused by intestinal ischemia and reperfusion in obese female mice.** 2017. MS thesis (Pharmacology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Obesity determines a low-grade chronic systemic inflammation characterized by generation of pro-inflammatory mediators from adipose tissue. Intestinal ischemia and reperfusion (IR) induce local, systemic and pulmonary inflammation in which female sex hormones (FSH), notably estradiol, exert an important modulating effect. In this study we investigated the interaction of obesity with FSH on the repercussions of intestinal IR. For this, female C57Bl/6 mice submitted or not to ovarian removal (OVx) were maintained (9 weeks) on a hyperlipidic diet for induction of obesity. As controls, obese animals were kept with intact ovaries (Non-OVx). Obese animals were submitted to intestinal IR (45 min, superior mesenteric artery obstruction, followed by 2 h of intestinal reperfusion). Our data indicated that only OVx in comparison to Non-OVx animals, both obese, increased vascular permeability and myeloperoxidase (MPO) activity in the intestine and lung, in addition to increasing the cell infiltrate in the lung. An increase in circulating lymphocytes, granulocytes and platelets was observed. We also found elevated serum levels of leptin, interleukin (IL) IL-17A, KC and vascular endothelial growth factor (VEGF), along with serum reduction of IL-6 and resistin. There was an increase in serum alkaline phosphatase concentration, but not in lactate dehydrogenase (LDH). In the lung we detected augmented levels of nitrites and of iNOS expression. In the lung tissue there was an increase of IL-5 and IL-10 and a reduction of leptin, IL-17A, KC and IL-6. In the adipose tissue increased the concentration of KC, MIP-2, IL-6, leptin and resistin. After the animals were submitted to intestinal IR the parameters analyzed in OVx animals were exacerbated regarding the Non-OVx animals. We also noticed an increase in the production of bone marrow cells, a reduction of the $CD45^+/CD41^+$ complex and an increase in the $CD11b^+/CD162^+$ complex. We observed increased nitrite and iNOS expression in the lung but decreased expression of eNOS. Intestinal IR in OVx animals increased the serum levels of leptin, IL-17A, KC and reduced of those of resistin. There was also an elevation of lung generation of VEGF and IL-1β while in the adipose tissue the contents of KC, MIP-2, IL-6, leptin, and resistin were elevated.

Taken together, our data suggest that the prolonged reduction of FSH caused by OVx in association with obesity induces to a certain degree of intestinal, systemic and pulmonary inflammation and that the intestinal IR can increase inflammation and the lung is possibly more sensitive.

Keywords: Obesity. Ovariectomy. Female Sex Hormones. Lung Inflammation. Intestinal Ischemia/Reperfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A relação peso/altura do indivíduo conforme o IMC.....21

Figura 2 - Delineamento experimental de estudo 33

Figura 3 - Efeito da remoção dos ovários sobre a massa uterina.....43

Figura 4 - Dosagem de estradiol no soro.....44

Figura 5 - Consumo semanal por animal de ração convencional ou hiperlipídica expresso em gramas e em Kcal.....44

Figura 6 - Variação da massa corporal em camundongos fêmeas Não OVx e OVx.. 45

Figura 7 - Variação da quantidade de tecido adiposo gonadal em camundongos fêmeas Não OVx e OVx 46

Figura 8 - Determinação da curva glicêmica de camundongos submetidos à dieta convencional (Controle) ou hiperlipídica (Não OVx e OVx)..... 46

Figura 9 - Valores séricos de colesterol e triglicérides de camundongos fêmeas Não OVx e OVx.. 47

Figura 10 - Quantificação do extravasamento do corante azul de Evans (AE) no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 48

Figura 11 - Relação peso úmido/seco no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 48

Figura 12 - Atividade de mieloperoxidase no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 49

Figura 13 - Efeito da contagem diferencial dos leucócitos presentes no sangue periférico de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 51

Figura 14 - Efeito da contagem de plaquetas e hemoglobinas presentes no sangue periférico de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 52

Figura 15 - Número de células presentes na medula óssea de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 53

Figura 16 - Quimiotaxia de leucócitos.....53

Figura 17 - Formação do complexo plaquetas e leucócitos em amostras de sangue de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 54

Figura 18 - Concentração sérica de MIP-2, leptina, IL-6, IL-10, IL-17A, KC, VEGF e Resistina.....56

Figura 19 - Concentração de fosfatase alcalina e LDH no soro 57

Figura 20 - Quantificação do extravasamento do corante azul de Evans (AE) no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 58

Figura 21 - Relação peso úmido/seco no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 58

Figura 22 - Atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 59

Figura 23 - Análise de imunohistoquímica da enzima mieloperoxidase no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx) 60

Figura 24 - Concentração de TNF-α, VEGF, MIP-2, Leptina, IL-17A e IL-1β em sobrenadante de explante de pulmão 61

Figura 25 - Concentração de KC, Resistina, IL-6, IL-10, IL-4 e IL5 em sobrenadante de explante de pulmão 62

Figura 26 - Determinação de NO_2^- em explante de pulmão.....63

Figura 27 - Determinação de iNOS e eNOS pela técnica de imunohistoquímica de tecido pulmonar.....64

Figura 28 - Análise histológica de infiltrado de células e hemorragia no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). 65

Figura 29 - Concentração de KC, MIP-2, VEGF, IL-6, IL-10, IL-17A, Leptina e Resistina em sobrenadante de explante de tecido adiposo 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração em quilogramas da composição da dieta convencional fornecida pela empresa Nuvilab® CR-1 e porcentagem das fontes de calorias por quilograma.....34

Tabela 2 - Composição de vitaminas, minerais e aminoácidos na dieta convencional fornecida pela empresa Nuvilab® CR-1 35

Tabela 3 - Composição da dieta hiperlipídica e suas fontes de calorias fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências 35

Tabela 4 - Número total de leucócitos circulantes (mm^3) em animais mantidos sob dieta hiperlipídica antes e após a indução da IR intestinal 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE Azul de Evans

AMS Artéria mesentérica superior

ATP Trifosfato de adenosina

AUC Área sob a curva

AVC Acidente vascular cerebral

BSA Bovine Serum Albumin

CINC/KC Citocinas quimioatraentes para neutrófilos

CXCL1/KC Quimiocina CXCL1/KC

DC Dieta convencional

DH Dieta hiperlipídica

DMEM *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*

EDTA Etilenodiamino tetra-acético

eNOS Óxido nítrico sintase endotelial

HSF Hormônios sexuais femininos

HTAB Brometo de hexadecil-tri-metil-amônio

ICAM-1 Molécula de adesão intracelular tipo 1

ICAM-2 Molécula de adesão intracelular tipo 2

IFN-γ Interferon-γ

IL Interleucina

IL-1 Interleucina-1

IL-1β Interleucina-1β

IL-1RA Antagonista do receptor de interleucina-1

IL-1R2 Receptor tipo 2 de interleucina-1

IL-2 Interleucina-2

IL-4 Interleucina-4

IL-5 Interleucina-5

IL-6 Interleucina-6

IL-8 Interleucina-8

IL-10 Interleucina-10

IL-17 Interleucina-17

IL-17A Interleucina-17A

ICAM-1 Molécula de adesão intercelular-1

ICAM-2 Molécula de adesão intercelular-2

IM Administração via intramuscular

IMC Índice de massa corporal

iNOS Óxido nítrico sintase induzida

IP Administração via intraperitoneal

IR Isquemia e reperfusão

IV Administração via intravenosa

KC Quimiocina KC

LDH Lactato desidrogenase

LPS Lipopolisacarídeo

LV Lavado vaginal

LTB-4 Leucotrieno-4

MCP-1 Proteína quimiotática de monócitos-1

MIP-1α Proteína inflamatória de macrófagos-1α

MIP-2 Proteína inflamatória de macrófagos-2

MPO Mieloperoxidase

Não OVx Não ovariectomizado

NF-κB Fator nuclear kappa B

NO Óxido nítrico

NO_2^- Nitrito

NOS Óxido nítrico sintase

OVx Ovariectomizado

OMS Organização Mundial da Saúde

PBS Salina tamponada fosfatada

PECAM-1 Molécula de adesão endotelial plaquetária

TNF Fator de necrose tumoral

TNF-α Fator de necrose tumoral-α

TLR4 Receptor *Toll like* tipo 4

VCAM Molécula de adesão vascular

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

VO Administração via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 Obesidade e Inflamação 20
1.2 Isquemia e Reperfusão Intestinal e Inflamação Pulmonar 24
1.3 Hormônios Sexuais Femininos (HSF) 27
2 HIPÓTESE 30
3 OBJETIVOS 31
3.1 Objetivos Específicos 31
4 MATERIAIS E MÉTODOS 32
4.1 Preparação dos Animais 32
4.1.1 Animais 32
4.1.2 Grupos experimentais 32
4.1.3 Delineamento experimental 32
4.2 Validação da Ovariectomia 33
4.2.1 Ovariectomia (OVx) 33
4.2.2 Avaliação e efetividade da ovariectomia 33
4.2.3 Quantificação dos níveis de estradiol 34
4.3 Caracterização do modelo de obesidade 34
4.3.1 Regime alimentar 34
4.3.1.1 Dieta convencional 34
4.3.1.2 Dieta hiperlipídica 35
4.3.2 Mensuração do tecido adiposo gonadal 36
4.3.3 Determinação da curva glicêmica 36
4.3.4 Quantificação dos níveis de colesterol e triglicérides no soro 36
4.4 Indução da IR intestinal 36
4.5 Estudo da permeabilidade vascular 37
4.6 Determinação da relação peso úmido/peso seco 37
4.7 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase 37
4.8 Quantificação do número de leucócitos circulantes, plaquetas e hemoglobina 38
4.9 Determinação do número total de células na medula óssea 38
4.10 Ensaio de migração espontânea de leucócitos 38
4.11 Ensaio de formação de complexos leucócitos/plaquetas 39

4.12 Determinação dos níveis circulantes de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (LDH) 39
4.13 Cultura de fragmentos de pulmão e tecido adiposo (explante) 39
4.14 Quantificação dos níveis de nitrito (NO_2^-) 40
4.15 Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios no soro e sobrenadante de explante no pulmão e tecido adiposo (IL-1β, IL-4, IL5, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-α, VEGF, MIP-2, Leptina e Resistina) 40
4.16 Análise histopatológica 40
4.17 Ensaio imunohistoquímico para avaliação da expressão de MPO e NOS (induzida e endotelial) no tecido pulmonar 41
4.18 Análises estatísticas 41
5 RESULTADOS 43
5.1 Validação da Ovariectomia 43
5.1.1 Lavado Vaginal para determinação do ciclo estral 43
5.1.2 Peso do útero em animais com e sem ovário 43
5.1.3 Dosagem de estradiol no soro 44
5.2 Caracterização do modelo de obesidade 44
5.2.1 Efeito da dieta hiperlipídica sobre o peso dos animais 44
5.2.2 Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis circulantes de colesterol e triglicérides 47
5.3 Efeitos locais da IR intestinal 47
5.3.1 Extravasamento do corante azul de Evans no intestino 48
5.3.2 Relação peso úmido/seco no intestino 48
5.3.3 Atividade da enzima mieloperoxidase no intestino 49
5.4 Efeitos Sistêmicos da IR Intestinal 49
5.4.1 Quantificação de leucócitos circulantes 49
5.4.2 Contagem de células na medula óssea 52
5.4.3 Atividade funcional de células da medula 53
5.4.4 Formação de complexos plaquetas e leucócitos 53
5.4.5 Concentração de mediadores inflamatórios no soro 55
5.4.6 Níveis circulantes de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (LDH) 56
5.5 Inflamação Pulmonar Causada pela IR Intestinal 57
5.5.1 Extravasamento do corante azul de Evans no pulmão 57
5.5.2 Relação peso úmido/seco no pulmão 58

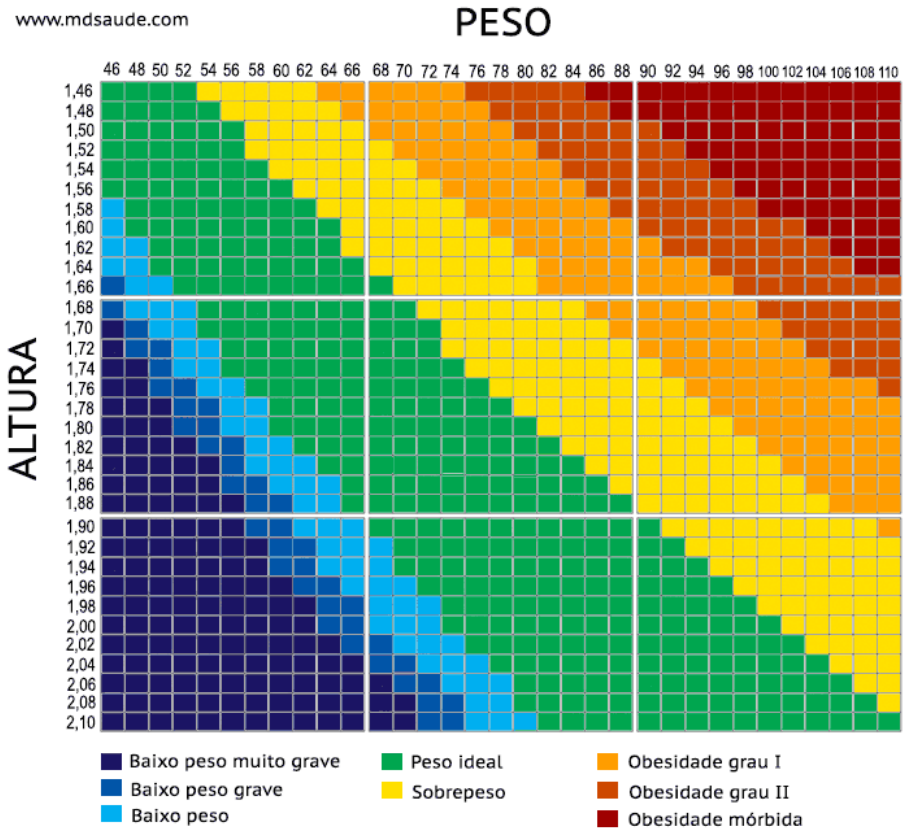
5.5.3 Quantificação de MPO no pulmão *59*
5.5.4 Mediadores inflamatórios em sobrenadante de explante pulmonar após a IR intestinal *60*
5.5.5 Avaliação da presença de NO no tecido pulmonar *62*
5.5.6 Avaliação histopatológica de infiltrado de células e hemorragia no pulmão de animais obesos após a IR intestinal *64*
5.6 Inflamação no Tecido Adiposo 65
5.6.1 Concentração de mediadores inflamatórios em sobrenadante de explante no tecido adiposo de animais obesos *65*
6 DISCUSSÃO 69
7 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Inflamação

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada por acúmulo anormal ou excessivo de gordura em consequência à uma disfunção crônica do balanço energético apresentando grande risco à saúde (VIGITEL, 2012). O aumento excessivo de gordura corpórea é um dos mais importantes problemas de saúde pública e se tornou uma epidemia global. Há registros de que 12% da população mundial é obesa, ou seja, meio bilhão de pessoas segundo dados da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2012). Fatores genéticos, ambientais e o estilo de vida como: comportamento social, mudanças no hábito alimentar e o sedentarismo, desempenham um papel importante no desenvolvimento da obesidade (CARVALHO-FILHO et al., 2011). Desta forma, podemos associa-la ao desencadeamento de várias patologias, como resistência a insulina, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias e osteoartrite (ABALLAY et al., 2013; ALAM; NG; LARBI, 2012; KOPELMAN, 2000)

Para se caracterizar um indivíduo obeso, a OMS estabelece que a relação peso/altura de um indivíduo adulto, representa o índice aproximado de classificação de sobrepeso ou obesidade. Sendo assim, o Índice de Massa Corporal (IMC) como a relação entre o peso dividido pelo quadrado da altura (kg/m²). Na figura 1 observa-se a relação entre altura e peso do indivíduo caracterizando-o conforme seu IMC. Um estudo proposto por Ng et al. (2014) relatou que no período de 1980 a 2013 o número de indivíduos com sobrepeso e obesos aumentou de 857 milhões em 1980 para 1 bilhão em 2013. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou que no ano de 2014 mais de 1,9 bilhões de pessoas estavam com sobrepeso e destas, 600 milhões eram obesos (WHO, 2015).



Fonte: http://www.mdsaude.com/2014/10/imc-indice-de-massa-corporal.html
Figura 1 - A relação peso/altura do indivíduo conforme o IMC.

Estudos conduzidos no Brasil pelo Ministério da Saúde revelaram aumento de 23% na frequência de excesso de peso no período 2006 a 2014. Sendo que 2006 a população apresentava 43% de sobrepeso e 11,9% de obesos e no período de 2014 estavam com 53% de sobrepeso e 17,9% de obesos. Ainda observa-se uma tendência de excesso de peso mais acentuada para mulheres (Homens: 2006 = 48%; 2014 = 57%; Mulheres: 2006 = 39%; 2014= 49%) no período analisado (VIGITEL, 2014). Embora essa porcentagem seja maior nos homens, no período analisado de 2006 a 2014 apresentou aumento de 1% nas mulheres.

Segundo Hotamisligil, (2006), a obesidade induz um estado inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo. Sendo assim, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino com funções adicionais às de armazenamento de lipídios (GUILHERME et al., 2008). Entre os inúmeros mediadores (citocinas e hormônios) produzidos pelo tecido adiposo podemos citar o fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucinas (IL-6 e IL-1β), leptina e adiponectina (PRADO et al., 2009).

O TNF-α é sintetizado pelos adipócitos assim como por macrófagos, sua função está relacionada à resistência a insulina e a incapacidade da mesma de regular o metabolismo de nutrientes (XU et al., 2003). Além disso, num processo inflamatório como, por exemplo, uma isquemia há aumento na produção de TNF-α e IL-1β pelas células endoteliais. Estas células quando ativadas expressam moléculas de adesão auxiliando a migração dos leucócitos (DO et al., 1999). Outro efeito importante do TNF-α é regular a geração de citocinas como a IL-6 e IL-10. A IL-6 é sintetizada pelo tecido adiposo, fibroblastos, monócitos e células endoteliais (BASTARD et al., 2007). Esta, por sua vez, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e a produção de neutrófilos por seus progenitores na medula óssea (OLIVEIRA et al., 2011).

Por outro lado, a adiponectina é uma citocina anti-inflamatória sintetizada pelos tecidos adiposos, células do músculo esquelético, células endoteliais e pelo encéfalo. Assim, em indivíduos saudáveis a adiponectina está presente na circulação em altas concentrações enquanto em indivíduos obesos sua concentração é baixa. Aparentemente isto decorre por conta dos níveis de TNF-α e IL-6 estarem altos, pois estes inibem a transcrição de adiponectina (KURYSZKO; SŁAWUTA; SAPIKOWSKI, 2016; TILG; MOSCHEN, 2006). Outro estudo envolvendo humanos e roedores obesos, também mostrou que o aumento do tecido adiposo reduz os níveis de adiponectina no próprio tecido adiposo e também no soro (OUCHI et al., 1999). A redução desta citocina no plasma de humanos está relacionada com o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia e diabetes (FUNAHASHI et al., 2004).

A IL-10 também possui ação anti-inflamatória, esta citocina é sintetizada por macrófagos e linfócitos, uma das suas funções é inibir a síntese de citocinas pro-inflamatórias. Na obesidade, apresenta-se em baixa concentração enquanto a diminuição do peso pode elevar os níveis de adiponectina e IL-10 e reduzir os níveis de TNF-α e IL-6 (ARSLAN; ERDUR; AYDIN, 2010). Foi demonstrado em humanos que a adiponectina induz a expressão de IL-10 em macrófagos na inflamação e síndrome metabólica (NISHIDA et al., 2007).

A leptina é um hormônio sintetizado pelo tecido adiposo e está envolvida no controle da ingestão de alimentos e gasto energético por meio de sinalização no sistema nervoso central, especialmente no hipotálamo (AHIMA et al., 1996; ARAÚJO et al., 2011; CHAN et al., 2003). Sua ação imunomoduladora consiste na indução da

síntese de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-α, IL-6, e fator de crescimento do tipo 1. O inverso igualmente ocorre, isto é, o TNF-α e a IL-1β podem induzir aumento da concentração circulante de leptina (OUCHI et al., 2011). Ainda, a leptina estimula a geração de citocinas com perfil Th_1, como a IL-2 e interferon tipo γ (INF-γ), e inibe aquelas conhecidas como sendo de perfil Th_2, como a IL-4 (LORD et al., 1998). É interessante notar que adipócitos de mulheres secretam mais leptina do que adipócitos de homens (ELMQUIST; SCHERER, 2012). Isto pode estar relacionado ao IMC, pois as mulheres tendem a ter maior porcentagem de gordura em relação aos homens (KENNEDY et al., 1997).

Estudos conduzidos por Ainslie et al. (2000); Surwit et al. (1995) demonstraram que uma dieta rica em gordura diminui os níveis de leptina no plasma de animais e como consequência, reduz a saciedade e leva a ingestão excessiva de alimentos. Lomba et al. (2010) mostraram que animais submetidos por 69 dias com dieta hiperlipídica apresentaram aumento do peso corporal, adiposidade e tolerância à glicose diminuída.

Zúñiga et al. (2010) indicaram que a IL-17, também conhecida como IL-17A, uma citocina sintetizada principalmente por célula T CD4+, reduz a formação e o acúmulo de tecido adiposo e também controla o metabolismo da glicose. De fato, camundongos obesos, deficientes de IL-17 aumentam a quantidade de massa de tecido adiposo. Ainda, a deficiência de IL-17 pode causar hiperglicemia em jejum. É interessante notar que há uma relação entre a deficiência da IL-17 com o acúmulo de tecido adiposo, entretanto esta deficiência reduz a inflamação sistêmica.

Como mencionado, a obesidade determina um estado inflamatório crônico de baixo grau. Neste contexto, Ferrante, (2007) descreveu que indivíduos obesos apresentam elevado índice basal de mediadores inflamatórios no tecido adiposo e por decorrência têm maior propensão a um prognóstico desfavorável quando acometidos por trauma ou sepse. A inflamação observada na obesidade também pode predispor pacientes à lesão pulmonar aguda na vigência de sepse (MCCALLISTER; ADKINS; O'BRIEN, 2009). A obesidade também pode levar a complicações na complacência pulmonar, alterações nas trocas gasosas e no comprimento torácico-abdominal, sendo assim pode desencadear insuficiência respiratória e lesão pulmonar aguda (NAIMARK; CHERNIACK, 1960).

Tomados em conjunto os dados indicam que a obesidade se associa ao desenvolvimento de doenças metabólicas e inflamação sistêmica sendo, portanto de

interesse estudos que investiguem a interação da obesidade com eventos indutores de inflamação sistêmica tais como observado na isquemia e reperfusão intestinal.

Na IR intestinal o primeiro órgão afetado é o intestino delgado que sofre a isquemia da artéria mesentérica superior (AMS). Este segmento intestinal é responsável pela maior parte da digestão de nutrientes bem como sua absorção. Nesse sentido, existem evidências experimentais de que há relação entre a obesidade e o desenvolvimento de inflamação intestinal. Vale lembrar que a dieta hiperlipídica altera a microbiota e a barreira epitelial podendo originar a inflamação (DE LA SERRE et al., 2010). É interessante notar que crianças obesas desenvolvem inflamação intestinal com quebra da barreira da mucosa intestinal, induzindo migração de leucócitos para o lúmen intestinal e geração de óxido nítrico (SPAGNUOLO et al., 2010).

Num estudo experimental, animais mantidos sob dieta hiperlipídica foi notada alterações na microbiota com aumento da concentração circulante de LPS (Lipopolissacarídeo: toxina derivada da membrana externa de bactérias Gram-negativas) com consequente, inflamação intestinal. Após esses animais serem submetidos ao tratamento com antibiótico o quadro se reverteu e houve diminuição das bactérias e dos níveis de LPS circulantes (CARVALHO et al., 2012). Vale ressaltar, que o LPS atua pela via do receptor toll-like 4 (TLR-4), um subtipo de proteína transmenbrânica dos receptores toll-like, iniciando eventos inflamatórios, bem como induz geração de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF-α. Portanto, o LPS desencadeia uma inflamação intestinal encontrada no estudo mencionado (DE LA SERRE et al., 2010).

1.2 Isquemia e Reperfusão Intestinal e Inflamação Pulmonar

A isquemia é caracterizada pela interrupção total ou parcial do fluxo sanguíneo levando a alterações do metabolismo, já a reperfusão é a restauração deste fluxo (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Durante a fase de isquemia ocorre a diminuição do oxigênio impedindo a produção de ATP (trifosfato de adenosina) e de nutrientes. A falta de ATP implica em acúmulo de sódio e cálcio intracelular gerando efeitos deletérios para a célula, como alterações da permeabilidade vascular (edema), liberação de metabólitos, produção de radicais livres, entre outros que contribuirão para morte celular (OKUDA et al., 1992; RIO et al., 2000; WAXMAN, 1996). Em decorrência da isquemia macrófagos, células endoteliais e diversos

mediadores induzem a geração de espécies reativas de oxigênio, ativam o fator nuclear kappa B (NF-κB) e óxido nítrico sintases (NOS) (BECKERS et al., 2017).

Desta forma o processo de reperfusão da área isquêmica é importante para que seja restabelecida a homeostasia. Contudo a reperfusão parece ser evento crítico para o organismo, pois é nesta fase que mediadores infamatórios produzidos pela isquemia disseminam para a circulação causando danos adicionais aos tecidos (DO et al., 1999). Durante o período de reperfusão ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (REILLY; SCHILLER; BULKLEY, 1991; ZIMMERMAN; GRANGER, 1994), ativação de leucócitos e moléculas de adesão as quais auxiliam no transporte e migração de células para o local de inflamação. Assim moléculas de adesão intercelular tipo 1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2), endotelial plaquetária tipo 1 (PECAM-1) e celular vascular (VCAM) exercem importante papel nos eventos isquêmicos seguidos da reperfusão (DO et al., 1999; EVORA et al., 1996; MCCORD; MCCORD, 1985). Os produtos tóxicos gerados após a IR intestinal causam lesões no tecido e microvasculatura intestinal e, nos vasos mesentéricos (GORDEEVA et al., 2017). É descrito na literatura que 3 h de isquemia intestinal seguidas de 1 h de reperfusão desencadeia maior lesão na mucosa do intestino do que somente 4 h de isquemia intestinal (PARKS; GRANGER, 1986).

A IR intestinal é um fenômeno de ocorrências clínicas como naquelas que exigem oclusão da artéria mesentérica, transplante de intestino, cirurgias vasculares e trauma seguido por choque hemorrágico (CHEN et al., 2003). Há relatos que tais eventos provoquem lesão da barreira intestinal (LU et al., 2017) permitindo assim, translocação das bactérias presentes no intestino para o sistema circulatório resultando em inflamação sistêmica (FINK; DELUDE, 2005). A incidência de mortalidade por eventos isquêmicos é alta apresentando uma taxa de 60-80% dos casos (VOLLMAR; MENGER, 2011).

É importante salientar que estudos clínicos e experimentais relatam que danos causados pela IR intestinal levam a alterações no pulmão (AN et al., 2007). Estes dados portanto, demonstram que uma das consequências da IR intestinal é o desencadeamento de inflamação pulmonar aguda a qual pode evoluir, em casos mais graves para a síndrome do desconforto respiratório agudo, inflamação sistêmica e falência múltipla de órgãos e sistemas (BARON et al., 1994; HSIEH et al., 2011; JAMES et al., 2010).

Neste contexto, observa-se aumento da permeabilidade vascular pulmonar e intestinal, infiltração de neutrófilos no pulmão, elevação da concentração de TNF-α, IL-1β, IL-6 circulantes, óxido nítrico, leucotrieno B4 (LTB_4) entre outros mediadores. Além disso, modifica a expressão PECAM-1 (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2012; HE et al., 2012; MORAES et al., 2008; VOLLMAR; MENGER, 2011). A ativação de neutrófilos, plaquetas, aumento da permeabilidade vascular e expressão de ICAM-1 no pulmão após a IR intestinal também já foram elucidados (GRACE, 1994; KUZU et al., 2002).

Outros estudos discutiram a participação do óxido nítrico no aumento de permeabilidade vascular (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009; CAVRIANI et al., 2004) e recrutamento de neutrófilos no tecido pulmonar após a IR intestinal (CAVRIANI et al., 2004). O óxido nítrico é sintetizado pela L-arginina por meio da ação da NOS que é expresso pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e por duas enzimas óxido nítrico sintase constitutivas (cNOS) e em condições normais o NO desempenha papel importante na homeostasia vascular (BECKERS et al., 2017). Não obstante, o excesso de NO leva a consequências patológicas (CUZZOCREA et al., 2002). O aumento do NO é expresso também pelo aumento da iNOS sendo relacionados a IR e lesão pulmonar induzida por LPS (GRACE, 1994; NUMATA et al., 1998). De acordo com Virlos et al. (2003) a IR intestinal exacerbou no pulmão a expressão de iNOS e atenuou a expressão do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A eNOS é uma enzima constitutiva, expressa em condições normais no endotélio vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Também foi demonstrado por Li et al. (2011) em modelo de IR intestinal que a inibição da via Rho quinase eleva no pulmão a expressão de eNOS e reduz a concentração sérica de TNF-α e IL-6 e da enzima MPO, enzima que expressa a presença de neutrófilos, no tecido pulmonar. Outra NOS constitutiva é a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) que não será discutida neste trabalho. Complementando ainda com os dados de Cavriani et al. (2004) as enzimas responsáveis pela produção de NO desempenham diferentes funções e a inibição delas aumenta a lesão pulmonar ocasionado pela IR intestinal desencadeando ativação de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular. De acordo com os autores citados o NO parece exercer um papel importante no modelo mencionado.

As plaquetas também contribuem para lesão causada pela IR intestinal. De acordo com Lapchak et al. (2012) a depleção de plaquetas diminui a lesão intestinal

e pulmonar causada pela IR intestinal. Plaquetas ativadas podem gerar espécies reativas de oxigênio, interagir com os leucócitos e induzir a expressão de citocinas como a IL-1β (COOPER et al., 2003). Segundo Page; Pitchford, (2013) a formação do complexo neutrófilos e plaquetas auxiliam para o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, pois as plaquetas aumentam a adesão de neutrófilos ao endotélio. Neste estudo investigamos a formação de dois complexos: CD45+/CD41+ e CD11b+/CD162+ (PSGL-1). O marcador CD45+ é expresso em todos os leucócitos, além disso, apresentam maior intensidade nos linfócitos (ALTIN; SLOAN, 1997). O marcador CD41+ é expresso em plaquetas, megacariócitos e células endoteliais, participando da agregação plaquetária (GRANJA et al., 2015). O marcador CD11b+ é expresso em leucócitos, células dendríticas e células natural killer. Regulam a adesão de leucócitos e migração na resposta inflamatória (ROMBOUTS et al., 2016). O marcador CD162 é uma proteína conhecida como ligante de P-selectina (PSGL-1), desempenha um papel importante na adesão e migração de leucócitos (SOO et al., 2009).

Evidências mostram que a inibição da via de sinalização do receptor TLR-4 atenua a lesão intestinal e pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal. Este estudo relatou que camundongos deficientes do receptor TLR-4 apresentaram redução de mediadores no intestino como TNF-α, IL-6, IL-1β e NF-κB e no pulmão como NO, iNOS, MCP-1, MIP-2 e NF-κB (ZHU et al., 2017). Além disso, também foi demonstrado que a inibição TLR-4 reduz a lesão de IR no fígado, rim e intestino (CHEN et al., 2008; SHIGEOKA et al., 2007; ZHAI et al., 2004). A expressão elevada do receptor TLR-4 e do NF-κB estão relacionados com eventos que medeiam a IR intestinal indicando também infiltração de neutrófilos e linfócitos e aumento de MIP-2, MCP-1, entre outras quimiocinas analisadas no intestino após a IR intestinal (WATSON et al., 2008).

Considerando o exposto é razoável avaliar que estudos sobre a IR intestinal são de interesse para compreensão dos mecanismos subjacentes à lesão intestinal e pulmonar e para o desenvolvimento de terapias a fim de reduzir o índice de mortalidade.

1.3 Hormônios Sexuais Femininos (HSF)

Os hormônios sexuais tem importante influência na regulação do metabolismo de adipócitos (LIZCANO; GUZMÁN, 2014). A redução dos seus níveis circulantes

acarreta em distúrbios endócrinos e funcionais (STUDD, 1989), assim como disfunção sexual, alterações nos níveis de lipoproteínas, aumento no risco de osteoporose, doenças cardiovasculares e diabete mellitus tipo 2 (CARR, 2003; MAUVAIS-JARVIS, 2011; VASCONCELLUS et al., 2004). Estudos avaliam o papel da diminuição do estrogênio circulante como evento modulador do desenvolvimento da obesidade (CLEGG, 2012). Num estudo conduzido por Flegal et al. (2010) observa-se que americanas após atingirem os 40 anos aumentaram o risco de desenvolver obesidade sendo esta, fortemente relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De fato, dados mostram que esse aumento chega a 65% em mulheres entre 40 e 59 anos de idade e 73,8% naquelas acima de 60 anos. Evidências clínicas e experimentais mostram que a redução do estrogênio contribui para resistência à insulina. Ainda, no contexto da modulação do metabolismo, existem dados que o estrogênio contribui para a manutenção do balanço energético e metabolismo de glicose (KIM; CHO; KIM, 2014).

Estudos demonstram que a modulação da resposta imune (Th1 e Th2) está relacionada ao ciclo menstrual, onde o perfil Th1 da resposta tende a ser dominante durante a menstruação e na fase lútea do ciclo sexual. Em contraste, na fase folicular o perfil Th2 se sobrepõe ao Th1. Esta modulação pode estar associada a doenças como esclerose múltipla e artrite reumatoide. Assim parece que os HSF, ao exercerem atividade moduladora do sistema imune, podem igualmente interferir com o curso da resposta inflamatória. (FISH, 2008). Ainda, distúrbios cardiovasculares são mais graves em mulheres na pós-menopausa (STANGL; BAUMANN; STANGL, 2002). Evidências clínicas revelam que mulheres hormonalmente ativas apresentam menor incidência de pneumonia, sepse e falência de múltiplos órgãos em relação aos homens (DEITCH et al., 2007; MEES et al., 2008; SPERRY et al., 2008). Estudos experimentais também mostraram a importância dos HSF na inflamação alérgica pulmonar (DE OLIVEIRA et al., 2007; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al., 2011; TAM et al., 2011).

Estudos também mostram a participação dos HSF na modulação das repercussões pulmonares causadas pelo trauma seguido de choque hemorrágico (ANGELE; FRANTZ; CHAUDRY, 2006; HILDEBRAND et al., 2006; MELDRUM, 2006; MOEINPOUR et al., 2007). Dentre estes estudos, devemos destacar o trabalho de Frink et al. (2006) que mostrou que mulheres com trauma intestinal

geram menores concentrações séricas de citocinas inflamatórias, em relação aos homens e que isto reduz o risco de desenvolvimento de falência múltipla de órgãos.

Estudos realizados em nosso laboratório indicaram que fêmeas OVx apresentam piora em seu estado inflamatório após serem submetidos a IR intestinal em comparação as fêmeas com os ovários intactos. Além disso, machos e fêmeas OVx ao serem submetidos ao tratamento com estradiol apresentam uma melhora no perfil inflamatório mostrando assim, a importância deste esteroide (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2013, 2014; FANTOZZI et al., 2017; RICARDO-DA-SILVA et al., 2017). É interessante ressaltar que, dados não publicados obtidos anteriormente em nosso laboratório, observamos em modelo de IR intestinal que camundongos fêmeas com ovários intactos mantidas sob dieta hiperlipídica não apresentam quadro inflamatório pulmonar após 2 h de reperfusão intestinal. Todavia, após 24 h de reperfusão intestinal observa-se inflamação pulmonar, com aumento de edema e recrutamento de neutrófilos, o que sugere uma resposta de inflamação mais tardia nos animais obesos.

À luz dessas evidências é de interesse investigar o papel da obesidade que causa inflamação de baixo grau e que os hormônios sexuais femininos parecem modular a inflamação causada pela IR intestinal e, portanto estudos que associem a obesidade com os HSF no trauma isquêmico intestinal se revestem de importância adicional.

2 HIPÓTESE

Os hormônios sexuais femininos e a obesidade interagem e modulam as repercussões inflamatórias locais, sistêmicas e pulmonares causadas pela IR intestinal.

3 OBJETIVOS

Avaliar a influência da remoção dos ovários sobre a inflamação local, sistêmica e pulmonar decorrente da IR intestinal em camundongos fêmeas mantidas sob dieta hiperlipídica.

3.1 Objetivos Específicos

- Validar o sucesso da remoção dos ovários (ovariectomia).
- Investigar o efeito da ovariectomia sobre o peso dos animais.
- Caracterizar o modelo de obesidade.
- Investigar a repercussão local, sistêmica e pulmonar após a IR intestinal em camundongos fêmeas obesas com ovários intactos ou removidos. Para tanto foram quantificadas:

Localmente:

- O recrutamento de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular no intestino.

Sistemicamente:

- Os leucócitos circulantes, os presentes na medula óssea e a sua migração espontânea.
- As plaquetas e hemoglobina.
- A concentração de mediadores inflamatórios circulantes bem como em sobrenadante de tecido adiposo.
- A concentração de fosfatase alcalina e LDH.
- A formação dos complexos leucócitos-plaquetas.

Pulmão:

- O recrutamento de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular.
- A concentração de mediadores inflamatórios em sobrenadante de tecido pulmonar.
- Os níveis de nitritos (NO^{-}_{2}) em sobrenadante de tecido pulmonar.
- O infiltrado de células e hemorragia pela análise histopatológica.
- O ensaio imunohistoquímico da enzima MPO, do óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos Animais

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 fêmeas adultas com 21 dias e o peso de aproximadamente 20 g, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia do ICB/USP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, em condições padrão de alimento e água *ad libitum*. O estudo foi iniciado após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. CEUA/ICB: 076/2015.

4.1.2 Grupos experimentais

Os animais foram subdivididos em 5 grupos com as seguintes características:

Controle: Camundongos fêmeas não manipuladas mantidas sob dieta convencional* (DC);

Controle Não OVx: Camundongos fêmeas não manipuladas mantidas sob dieta hiperlipídica (DH);

Controle OVx: Camundongos fêmeas OVx mantidas sob DH;

IR Não OVx: Camundongos fêmeas mantidas sob DH submetidas à IR intestinal;

IR OVx: Camundongos fêmeas OVx mantidas sob DH submetidas à IR intestinal.

*****Estes animais foram utilizados apenas como referência nos experimentos de caracterização da obesidade.

4.1.3 Delineamento experimental

Adquirimos os animais com 21 dias de vida e os mantivemos durante 1 semana no biotério para ambientação. A seguir realizamos a remoção dos ovários (grupo OVx) e a dieta hiperlipídica iniciada. Os animais foram mantidos nessa dieta durante 9 semanas quando então foram submetidos a IR intestinal ou a eutanásia (grupos IR intestinal e Controle respectivamente). Induzimos a isquemia obstruindo a artéria mesentérica superior (AMS) com um “clamp” durante 45 min, após esse período, o “clamp” foi removido e assim iniciou o processo reperfusão com duração de 2 h, por fim, ocorreu a eutanásia para a coleta dos tecidos.

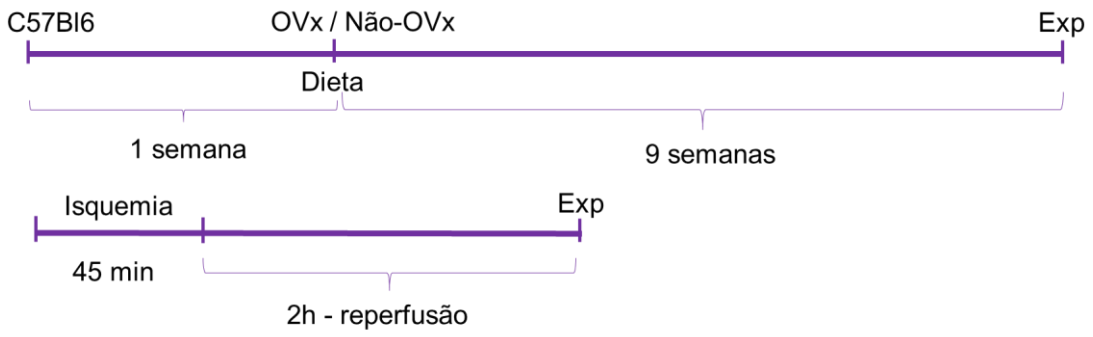


Figura 2 - Delineamento experimental de estudo.

4.2 Validação da Ovariectomia

4.2.1 Ovariectomia (OVx)

Os animais foram mantidos anestesiados com isoflurano (5% de isoflurano em 50% de oxigênio). A seguir, após tricotomia e assepsia da parede abdominal com álcool iodado (3%), foi realizada a laparotomia mediana. Após a identificação dos ovários foi realizada a ligadura de seus pedúnculos e em seguida a ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi fechada em dois planos com sutura contínua na musculatura e sutura ponto a ponto na pele realizado com fio de nylon 4.0. Após a cirurgia foi administrado dose única de tramadol (Pfizer, 5 mg/kg, IP) para a analgesia e pentabiótico (Fort Dodge, 540 mg/kg, IM). Durante 3 dias os animais receberam paracetamol na água de beber (53 mg/ml, VO, *ad libitum*).

4.2.2 Avaliação e efetividade da ovariectomia

Após 9 semanas da remoção dos ovários e ao final da IR intestinal, o sucesso da ovariectomia foi avaliado pela detecção da redução do peso do útero e pela análise do padrão morfológico das células presentes no lavado vaginal (LV). Para tanto, com o auxílio de um conta-gotas, alíquotas de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram introduzidas na vagina dos animais e o LV realizado. Amostras do LV foram colocadas sobre lâmina de vidro e a seguir diluídas em 5 µl de corante cristal violeta (5%), e então observadas por microscopia óptica comum. A ovariectomia foi considerada efetiva quando o lavado vaginal revelou um padrão morfológico de células compatível com a fase de diestro, o qual se caracteriza pela presença predominante de neutrófilos e muco. Apenas fêmeas ovariectomizadas em fase diestro e com redução da massa uterina foram incluídas no estudo.

4.2.3 Quantificação dos níveis de estradiol

Os níveis de estradiol no soro dos animais foram avaliados usando kit comercial Estradiol Elisa Kit (Cayman Chemical Company - EUA). Após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas pela aorta abdominal com seringas plásticas. A seguir as amostras foram centrifugadas (14000 rpm/10 min). O soro obtido foi armazenado em freezer. A determinação dos valores de estradiol foi realizada por espectrofotometria (420 nm) seguindo as instruções do fabricante.

4.3 Caracterização do modelo de obesidade

4.3.1 Regime alimentar

Os animais receberam dieta convencional (Controle) ou dieta hiperlipídica por 9 semanas.

4.3.1.1 Dieta convencional

A dieta convencional foi obtida pela empresa Nuvilab® CR-1, localizada no Paraná, com a seguinte composição: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Tabela 1 - Concentração em quilogramas da composição da dieta convencional fornecida pela empresa Nuvilab® CR-1 e porcentagem das fontes de calorias por quilograma.

Concentração Kg do produto	
Úmidade (máx)	12,50%
Proteína do produto (mín)	22%
Produto etéreo (mín)	4,50%
Matéria mineral (máx)	10%
Matéria fibrosa (máx)	8%
Cálcio (max)	1,40%
Fósforo (mín)	0,80%
Fonte de calorias	**% de Kcal/kg**
Fonte de carboidratos	56%
Fonte de proteínas	19%
Fonte de lipídios	3,50%

Tabela 2 - Composição de vitaminas, minerais e aminoácidos na dieta convencional fornecida pela empresa Nuvilab® CR-1.

Vitaminas		**Minerais**		**Aminoácidos**	
Vitamina A	13.000 UI/kg	Sódio	2.700 mg/kg	Lisina	12 g/kg
Vitamina D3	2.000 UI/kg	Manganês	60 mg/kg	Metionina	4.000 mg/kg
Vitamina E	34 UI/kg	Zinco	60 mg/kg	**Aditivos**	
Vitamina K3	3 mg/kg	Cobre	10 mg/kg	Antioxidante	100 mg/kg
Vitamina B1	5 mg/kg	Iodo	2 mg/kg		
Vitamina B2	6 mg/kg	Selênio	0,05 mg/kg		
Vitamina B6	7 mg/kg	Cobalto	1,5 mg/kg		
Vitamina B12	22 mcg/kg	Flúor	80 mg/kg		
Niacina	60 mg/kg	Ferro	50 mg/kg		
Pantotenato de cálcio	20 mg/kg				
Ácido fólico	1 mg/kg				
Biotina	0,05 mg/kg				
Colina	1,900 mg/kg				

4.3.1.2 Dieta hiperlipídica

A dieta hiperlipídica foi obtida pela empresa Pragsoluções Biociências, localizada em Jaú - SP.

Tabela 3 - Composição da dieta hiperlipídica e suas fontes de calorias fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências.

Produtos	**Kcal/kg**	**% de Kcal**
Amido de milho	598	11,18%
Caseína	800	14,95%
Amido dextrinizado	440	8,22%
Sacarose	440	7,48%
Banha	2700	50,47%
Óleo de soja	360	6,73%
Celulose microcristalina	0	0,00%
L Cistina	12	0,22%
Bitartarato de colina	0	0,00%
BHT	0	0,00%
Mix mineral Ain 93G	0	0,00%
Mix Vit	40	0,75%
Total	**5350**	**100,00%**
Fonte de carboidratos	-	27,63%
Fonte de proteínas	-	15,18%
Fonte de lipídios	-	57,20%

Durante o período das dietas, os animais foram pesados e o consumo de ração calculado semanalmente.

4.3.2 Mensuração do tecido adiposo gonadal

Após os animais serem submetidos à laparotomia, a gordura gonadal foi individualizada, em seguida foi feita a ressecção e pesada.

4.3.3 Determinação da curva glicêmica

Decorridas 9 semanas da ingesta com dieta hiperlipídica, os animais foram submetidos a jejum de 6 h. A curva glicêmica foi construída a partir da quantificação dos níveis de glicose em amostras de sangue coletadas pela cauda. Para tanto os animais foram submetidos a uma pequena incisão na base da cauda sob anestesia geral. Os valores de glicemia foram obtidos antes (tempo zero) e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose (20%, 2 g/kg) por via intraperitoneal segundo (EALEY; ARCHER, 2009). A glicemia foi quantificada, utilizando-se o medidor automático de glicose (Accu-check® Active, Roche).

4.3.4 Quantificação dos níveis de colesterol e triglicérides no soro

Os níveis de colesterol e triglicérides no soro dos animais foram avaliados usando os kits comerciais: Colesterol Liquiform e Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnostica S.A. – BR). Para tanto, após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas pela aorta abdominal com seringas plásticas. A seguir as amostras foram centrifugadas (14000 rpm / 10 min). O soro obtido foi armazenado em freezer. A determinação dos valores de colesterol e triglicérides foi realizada por espectrofotometria (500 nm e 505 nm) respectivamente, seguindo as instruções do fabricante.

4.4 Indução da IR intestinal

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, IP) e xilazina (20 mg/kg, IP) e após a laparotomia mediana e desvicerização, a artéria mesentérica superior (AMS) foi localizada e a isquemia intestinal realizada com “clamps” cirúrgicos metálicos. Durante o período de manutenção da isquemia, o abdômen dos animais foi mantido coberto com plástico transparente para minimizar perdas de líquido e calor causadas pela incisão abdominal. Decorrido o tempo desejado de isquemia (45 min), o “clamp” foi retirado e a incisão mediana fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de nylon monofilamentar. Após 2 h de reperfusão intestinal os animais foram submetidos à eutanásia (SOARES et al., 2010).

4.5 Estudo da permeabilidade vascular

A avaliação da permeabilidade vascular foi feita por meio da técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE) extravasado no intestino (porção inicial do intestino delgado) e pulmão (CAVRIANI et al., 2004). O corante foi injetado por via intravenosa 20 min antes do fim das 2 h de reperfusão intestinal. Após a eutanásia o leito vascular pulmonar foi perfundido com PBS pela artéria pulmonar, para remoção do sangue intravascular. Fragmentos dos tecidos pulmonar e intestinal foram removidos, limpos e pesados. Um fragmento de cada tecido foi colocado em formamida (4 ml/g de peso tecidual, a temperatura ambiente por 24 h), enquanto a outra porção foi mantida em estufa de secagem (56 °C) por 24 h. A leitura foi feita por espectrofotometria (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda 620 nm e os valores de AE foram expressos em µg de AE extravasado.

4.6 Determinação da relação peso úmido/peso seco

Após a coleta de amostras de pulmão e intestino (porção inicial do intestino delgado) foram registrados o peso úmido dos tecidos e em seguida armazenado em estufa de secagem (56 ºC) por 24 h para obter o peso seco. A razão entre o peso úmido/seco das amostras foi utilizada como índice de edema.

4.7 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase

Após os animais serem submetidos a eutanásia, tiveram o leito vascular pulmonar perfundido com 5 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Amostras do tecido pulmonar e intestinal (porção inicial do intestino delgado) foram extraídas e em seguida pesadas e homogeneizadas em 30 ml/g de tampão fosfato pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB) e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em homogeinizador tecidual (Medic Tools®) durante 20 segundos. A seguir as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min a 4 ºC e o sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO. Os ensaios da atividade da enzima mieloperoxidase dos tecidos pulmonar e intestinal foram conduzidos adicionando-se, em duplicata, 10 µl da amostra em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão substrato, contendo tampão fosfato pH 6.0, peróxido de hidrogênio (0,1%) e ortodianisidina (1,25%). Decorridos 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de azida sódica (1%). A leitura da absorbância

foi feita em espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 450 nm e os valores de absorbância expressos em atividade de MPO por mg de tecido.

4.8 Quantificação do número de leucócitos circulantes, plaquetas e hemoglobina

Amostras de sangue (10 µl) foram coletadas da cauda dos animais antes da indução da isquemia, e após o término do período de reperfusão intestinal (2 h). Foi utilizada pipeta automática para coletar as amostras, estas foram homogeneizadas em diluente e submetidas à contagem automática total e diferencial em analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

4.9 Determinação do número total de células na medula óssea

Para obtenção das células da medula óssea, após a eutanásia os fêmures direito e esquerdo dos animais foram cirurgicamente removidos. Ambas as extremidades foram abertas e o canal medular foi perfundido com o auxílio de uma agulha (26G x½”) acoplada a uma seringa plástica com 5 ml de PBS a partir da extremidade distal. Depois de centrifugado durante 15 min a 1500 rpm, o botão celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS. A suspensão medular foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta automática e a seguir as células foram quantificadas em câmara de Neubauer utilizando microscopia óptica. Para tanto, 90 µl da amostra do lavado medular foram acrescidos de 10 µl de cristal violeta (0,2%). A seguir a amostra foi diluída 10 vezes em PBS.

4.10 Ensaio de migração espontânea de leucócitos

Após a eutanásia, os fêmures direito e esquerdo dos animais foram cirurgicamente removidos e reperfundido com 5 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, foi centrifugado por 5 min a 1200 rpm e o botão celular ressuspendido em 1 ml de DMEM. As células foram diluídas no Turk 1:10 e quantificadas em câmara de Neubauer. A placa de quimiotaxia foi bloqueada por 1 h pela incubação dos poços com 30 µl de DMEM contendo 1% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, EUA). Após esse período, o conteúdo de bloqueio foi descartado. Em seguida, foi adicionado 31 µl de DMEM nos poços, então foi adicionada a membrana e 20 µl de

cada amostra (1 x 10^6 leucócitos) por poço. A placa foi incubada por 90 min a 37 °C e por fim foi realizada a contagem em câmara de Neubauer das células que migraram na proporção 1:1 em cristal violeta.

4.11 Ensaio de formação de complexos leucócitos/plaquetas

Decorridas as 2 h de reperfusão intestinal, as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em seringas contendo citrato para evitar coagulação. A seguir, alíquotas de 50 µl de sangue foram misturadas com igual volume de formalina (4%) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente até total fixação da amostra. Após incubação, 2 µl de cada anticorpo foram adicionados às amostras e incubadas por 30 min (anti-CD45 PE, anti-CD41 FITC, anti-PSGL1 PE e anti-CD11b FITC, todos obtidos da BD-Biosicence, Reino Unido). Após o tempo de incubação, os eritrócitos presentes nas amostras foram lisados por meio da adição do tampão de lise (154 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0,1 mM EDTA) e mantidas a 4 ^oC durante a noite para posterior leitura no citometro BD Accuri C6 (BD Biosciences, EUA). Estes experimentos foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Jean Pierre Peron do Departamento de Imunologia do ICB/USP.

4.12 Determinação dos níveis circulantes de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (LDH)

Os níveis séricos de fosfatase alcalina e LDH foram avaliados usando kits comercial de Fosfatase Alcalina Liquiform e LDH da Liquiform (Labtest Diagnostica S.A. – BR). Para tanto, após a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas pela aorta abdominal com seringas plásticas. A seguir as amostras foram centrifugadas (14000 rpm / 10 min). O soro obtido foi armazenado em freezer. A determinação dos valores de fosfatase alcalina e LDH foram realizadas por espectrofotometria (500 nm e 505 nm) respectivamente, seguindo as instruções do fabricante.

4.13 Cultura de fragmentos de pulmão e tecido adiposo (explante)

Após eutanásia, os animais tiveram a circulação pulmonar perfundida com 5 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. Os pulmões e tecido adiposo gonadal foram retirados e fragmentos de tamanho homogêneo (5 x 5 mm) foram cultivados em placas de 24 poços, 4 fragmentos por poço, em 1 ml de

meio DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, Sigma-Aldrich, EUA), permanecendo incubados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por período de 24 h. Decorrido o tempo desejado de cultura, alíquotas de meio foram obtidas centrifugadas e mantidas congeladas em freezer -80 ºC.

4.14 Quantificação dos níveis de nitrito (NO_2^-)

As amostras de cultura de tecido pulmonar foram analisadas segundo as instruções do fabricante, usando o kit Griess Reagent System (Promega Corporation - EUA). Este kit é baseado na reação química que utiliza sulfonamida e *N*-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) em condições ácidas para quantificar a presença de nitrito.

4.15 Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios no soro e sobrenadante de explante no pulmão e tecido adiposo (IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-α, VEGF, MIP-2, Leptina e Resistina)

Amostras de soro e sobrenadante dos explantes foram utilizadas para determinação dos níveis das citocinas por meio de “kits” comerciais: Mouse Premixed Multi Anality Kit (R&D System - Magnetic Luminex Screening Assay®, EUA). Os ensaios foram conduzidos segundo as especificações do fabricante. Estes experimentos foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Cristóforo Scavone do Departamento de Farmacologia do ICB/USP.

4.16 Análise histopatológica

Fragmentos de pulmão dos animais foram removidos e fixados em formalina (10%). Os tecidos foram emblocados em parafina para obtenção de cortes com 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas em hematoxilina eosina para análise posterior em microscopia óptica comum (Zeiss Axioscope) para examinar hemorragia e infiltração celular. Para a análise de hemorragia, a contagem de hemácias foi realizada em microscópio óptico utilizando uma lente de retículo. Para a análise de infiltrado celular, os cortes foram avaliados em microscópio óptico acoplado à câmera digital e computador. As imagens obtidas foram fotografadas pelo software NIS Elements (Nikon®, Japão) e analisadas pelo software Image-Pro Plus, versão 4.5.0.29. Estas análises foram realizadas sob orientação da Dra. Carla Máximo Prado do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP/Santos.

4.17 Ensaio imunohistoquímico para avaliação da expressão de MPO e NOS (induzida e endotelial) no tecido pulmonar

Após a eutanásia a cavidade torácica dos animais foram abertas e o leito vascular perfundido com 10 ml de PBS. A seguir, os pulmões foram removidos e o lóbulo pulmonar esquerdo foi preenchido com 200 µl de TFM (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Alemanha), diluído 1:3 em água destilada. Em seguida, o lóbulo pulmonar esquerdo foi mergulhado em hexano acondicionado em gelo seco e processado para obtenção de cortes (8 µm) no criostato LEICA CM1850 (Leica Biosystems, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas e subsequentemente fixados em acetona por 10 min e mantidos à -20 ^{o}C. No dia do experimento, as lâminas foram mantidas em PBS por 5 min antes do início da imunohistoquímica. Para bloqueio foram usadas as seguintes soluções e tempos: 30 min na solução H_2O_2 3%, 10 min na solução BSA 1% + TWEEN20 0,5% e 30 min na solução BSA 1% + TWEEN20 0,05%. Seguido o período de bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 2 h na estufa à 37 ^{o}C e 1 h com o anticorpo secundário na estufa à 37 ^{o}C. Então, as amostras foram incubadas durante 30 min com o Sistema AB (Vectastain ABC kit Elite, Vector Laboratories, EUA). A reação foi peroxidada usando DAB (ScyTek Laboratories, EUA), corada com hematoxilina (Mayer´s Hematoxylin Solution, Sigma-Aldrich, EUA) e preparadas com meio de montagem (CC/Mount, Sigma-Aldrich, EUA) e lamínulas. As imagens foram obtidas pelo software NIS Elements (Nikon®, Japão) e então, analizadas pelo software Image-Pro Plus, versão 4.5.0.29. Anticorpos utilizados: bs-4943R (MPO) 1:1000 (Bioss Antibodies, EUA), iNOS antibody 1:500 (Novus Biologicals, EUA), eNOS antibody 1:1000 (Novus Biologicals, EUA) e anti-rabbit IgG (H+L), biotin 1:500 (Sigma-Aldrich, EUA).

4.18 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo setor de estatística do ICB/USP com a supervisão da Estatística Rosana Duarte Prisco. As análises estatísticas escolhidas de acordo com o desenho experimental foram conduzidas utilizando Statgraphics®Centurion XVI e IBM SPSS Statistics V22. Os dados obtidos foram expressos como média ± EPM. Empregou-se ANOVA dois fatores, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. A Homogeneidade de Variâncias foi verificada e quando necessário empregou-se transformação nos dados (raiz

quadrada para dados avaliados como contagem, arco seno da raiz quadrada para dados expressos em porcentagem ou logarítmica). O nível de significância adotado foi $p<0,05$. Na dissertação os dados foram apresentados por meio do GraphPad Prism 6.0. As análises foram confirmadas pelos programas mencionados acima. Empregou-se t-Student para validação da ovariectomia e caracterização da obesidade. A glicemia foi analisada pela área sob a curva. Empregou-se ANOVA dois fatores (Não OVx e OVx, IR Não OVx e IR OVx), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Validação da Ovariectomia

Nesta primeira fase de estudo os animais com ovários intactos ou removidos foram submetidos ao lavado vaginal, coleta do útero e dosagem sérica dos níveis de estradiol. Os dados gerados comprovaram a eficácia da ovariectomia.

5.1.1 Lavado Vaginal para determinação do ciclo estral

Antes da eutanásia dos animais, realizamos o lavado vaginal para determinar se os animais estavam de fato, ovariectomizados. Para isso, coramos o lavado vaginal com cristal violeta e identificamos a população de células presentes no mesmo. Animais submetidos à ovariectomia que apresentavam células semelhantes ao ciclo Diestro foram consideradas OVx e então, utilizadas para o experimento.

5.1.2 Peso do útero em animais com e sem ovário

Ainda, na figura 3 podemos observar redução significativa da quantificação da massa uterina no grupo de animais com ovários removidos em relação ao grupo de animais com ovários intactos.

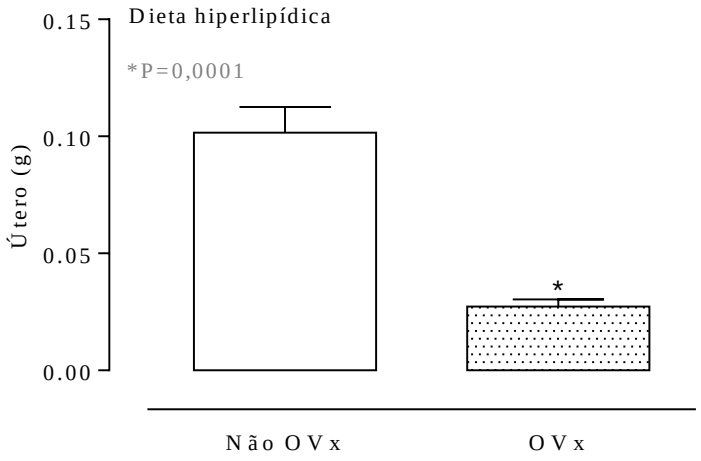


Figura 3 - Efeito da remoção dos ovários sobre a massa uterina. Grupos de animais foram submetidos à remoção dos ovários (OVx) ou mantidos com seus ovários preservados (Não OVx). Decorridas 9 semanas da cirurgia os animais foram submetidos à eutanásia, o útero removido e a massa uterina determinada. Os dados representam a media ± EPM de 06 a 10 amostras de útero. **P=0,0001* em relação ao grupo Não OVx.

5.1.3 Dosagem de estradiol no soro

Adicionalmente, determinamos os níveis séricos de estradiol nos animais com ovários intactos ou removidos. Nota-se na figura 4, redução significativa do nível sérico de estradiol no grupo OVx em relação ao Não OVx.

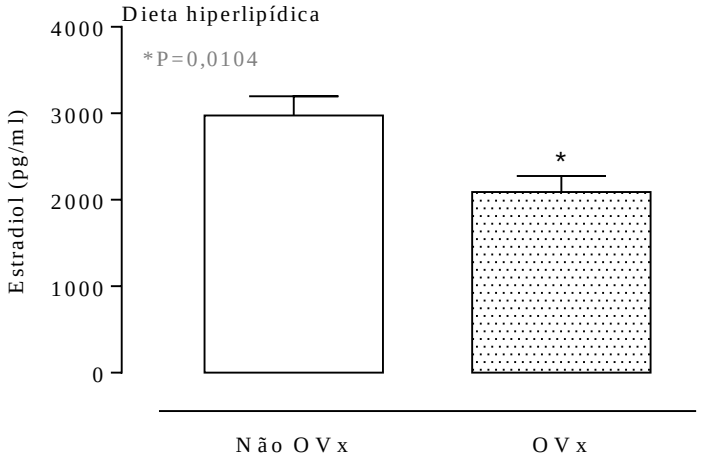


Figura 4 - Dosagem de estradiol no soro. Grupos de animais foram submetidos à remoção dos ovários (OVx) ou mantidos com seus ovários preservados (Não OVx). Decorridas 9 semanas da cirurgia os animais foram submetidos à eutanásia e a dosagem de estradiol no soro foi realizada. Os dados representam a media ± EPM de 09 a 14 amostras de soro. **P=0,0104* em relação ao grupo Não OVx.

5.2 Caracterização do modelo de obesidade

5.2.1 Efeito da dieta hiperlipídica sobre o peso dos animais

Após a remoção ou não dos ovários, oferecemos aos animais dieta convencional ou hiperlipídica durante 9 semanas. Para caracterizar a obesidade, analisamos o consumo semanal de ração por animal em gramas (figura 5, painel A) e o consumo semanal de ração em Kcal por animal (figura 5, painel B). Nossos dados indicam redução do consumo em gramas de dieta hiperlipídica em relação à dieta convencional entretanto, não há diferença do consumo em Kcal.

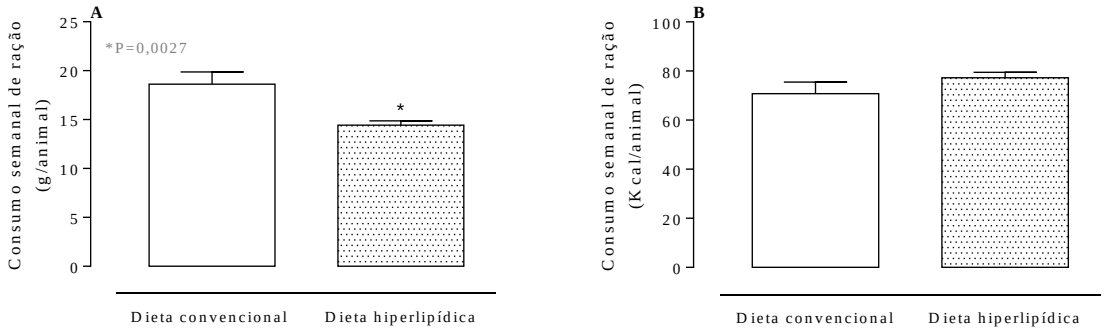


Figura 5 - Consumo semanal por animal de ração convencional ou hiperlipídica expresso em gramas (painel A) e em Kcal (painel B). Os animais foram mantidos durante 9 semanas com dieta

convencional ou hiperlipídica e seu consumo mensurado semanalmente. Os dados representam a media ± EPM de 20 animais por grupo. *$P=0,0027$ em relação ao grupo mantido com dieta convencional.

Com respeito à variação de peso dos animais dos grupos Não OVx e OVx, após 9 semanas de regime alimentar com a dieta hiperlipídica, pode-se notar (figura 6) que o grupo submetido à remoção dos ovários (OVx) registrou maior ganho de peso em relação ao grupo com ovários intactos (Não OVx). Animais mantidos com dieta convencional foram utilizados apenas como valor de referência (Controle).

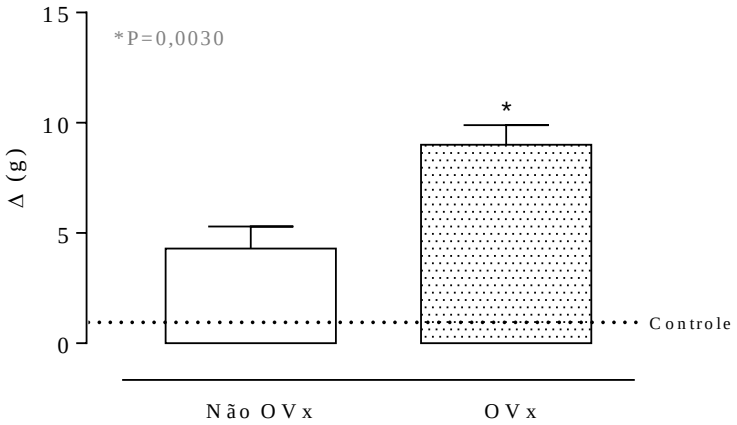


Figura 6 - Variação da massa corporal em camundongos fêmeas Não OVx e OVx. Os animais foram mantidos por 9 semanas com dieta convencional (representado como valor de referência: Controle) e dieta hiperlipídica (Não OVx e OVx) sendo então, registrada a variação do peso em gramas comparando o início da dieta com o término das 9 semanas. Os dados representam a media ± EPM de 10 animais por grupo. *$P=0,0030$ em relação ao grupo Não OVx.

Decorridas 9 semanas sob dieta hiperlipídica os animais com os ovários intactos ou removidos, foram submetidos a eutanásia e o tecido adiposo foi retirado e pesado. Como pode ser visto na figura 7, o grupo OVx apresentou aumento significativo do tecido adiposo gonadal quando comparado ao do grupo Não OVx. Animais mantidos com dieta convencional foram utilizados apenas como valor de referência (Controle).

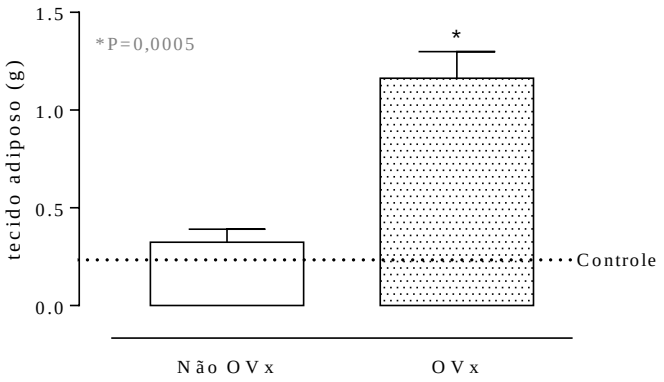


Figura 7 - Variação da quantidade de tecido adiposo gonadal em camundongos fêmeas Não OVx e OVx. Os animais foram mantidos por 9 semanas com dieta convencional (representado como valor de referência: Controle) e dieta hiperlipídica (Não OVx e OVx). Ao final do período mencionado, os animais foram submetidos à eutanásia e o tecido adiposo removido para determinação do seu peso. Os dados representam a media ± EPM de 06 a 10 amostras. *$^{*}P=0,0005$* em relação ao grupo Não OVx.

Realizamos também o teste de curva glicêmica nos animais que consumiram dieta convencional (Controle) e dieta hiperlipídica (Não OVx e OVx). Os resultados obtidos estão representados na figura 8 e como pode ser visto não observamos diferenças na glicemia nos grupos investigados.

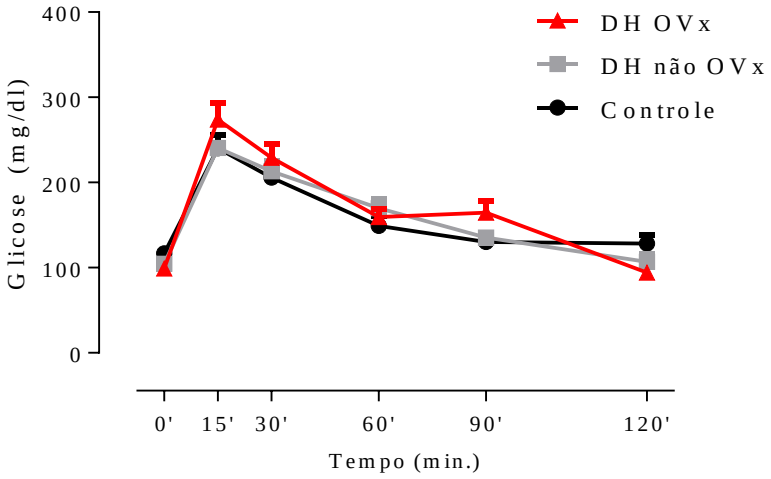


Figura 8 - Determinação da curva glicêmica de camundongos submetidos à dieta convencional (Controle) ou hiperlipídica (Não OVx e OVx). Os valores de glicemia foram obtidos antes (tempo zero), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose (20%) por via intraperitoneal. Os dados representam a média ± EPM de 5 a 10 animais. Foi analisada a área sob a curva, entretanto não foi detectada diferença estatística.

5.2.2 *Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis circulantes de colesterol e triglicérides*

Adicionalmente, mensuramos os níveis circulantes de colesterol e triglicérides nos animais com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). Podemos observar (Figura 9 - painéis A e B) que os níveis de colesterol e triglicérides, respectivamente, apresentaram alterações entre os grupos Não OVx e OVx. A ovariectomia aumentou significativamente os níveis de colesterol e triglicérides em relação ao grupo com ovários intactos. O grupo Controle (dieta convencional) foi utilizado para valores de referência.

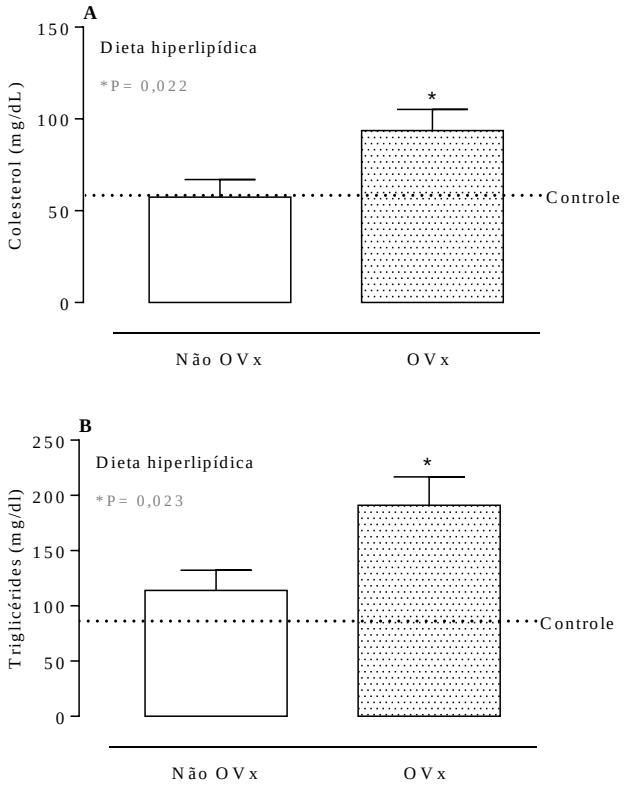


Figura 9 - Valores séricos de colesterol (painel A) e triglicérides (painel B) de camundongos fêmeas Não OVx e OVx. Os animais foram mantidos por 9 semanas com dieta convencional (representado como valor de referência: Controle) e dieta hiperlipídica (Não OVx e OVx). O soro foi obtido a partir de amostras de sangue coletadas da artéria aorta. Os dados referem-se à média ± EPM de 13 a 17 amostras. Painel A, *P=0,022 e Painel B, *P=0,023 em relação ao grupo Não OVx.

5.3 Efeitos Locais Causados pela IR Intestinal

Nesta fase de estudo, realizamos experimentos para investigar as repercussões locais ocasionadas pela IR intestinal. Estes experimentos têm como objetivo validar a eficácia da metodologia proposta. Para isso, quantificamos na

porção inicial do intestino delgado: extravasamento do corante azul de Evans, relação peso úmido/seco e atividade da enzima MPO.

5.3.1 Extravasamento do corante azul de Evans no intestino

Na figura 10 estão representados os dados sobre a permeabilidade vascular intestinal dos animais utilizando a metodologia do extravasamento do corante azul de Evans. Observa-se, aumento significativo entre os grupos de animais Controle OVx e de animais OVx submetidos à IR intestinal ao compararmos com o grupo Não OVx.

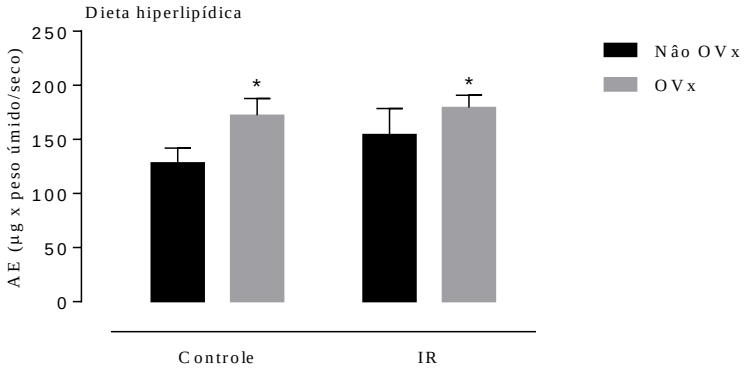


Figura 10 - Quantificação do extravasamento do corante azul de Evans (AE) no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 20-32 amostras. $^{*}P=0,001$ (Não OVx *vs* OVx).

5.3.2 Relação peso úmido/seco no intestino

A figura 11 mostra a relação peso úmido/seco de segmentos do intestino. A análise nos mostrou que houve diferença estatística entre os grupos IR e Controle, independente da remoção dos ovários, sugerindo, assim, que a IR intestinal desencadeou edema tecidual.

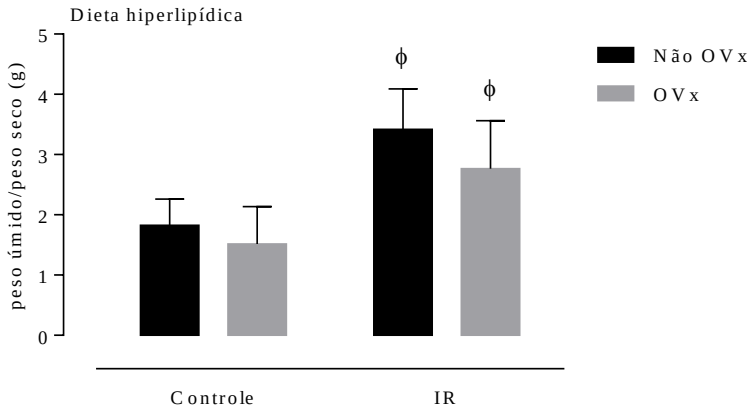


Figura 11 - Relação peso úmido/seco no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 20-28 amostras. $^{\phi}P=0,028$ (Controle *vs* IR).

5.3.3 Atividade da enzima mieloperoxidase no intestino

Observamos na figura 12, aumento de MPO nos animais OVx em relação aos animais Não OVx, tanto no grupo Controle quanto no IR. Além disso, a indução da IR intestinal exacerbou a atividade desta enzima no intestino tanto dos animais OVx como nos animais Não OVx.

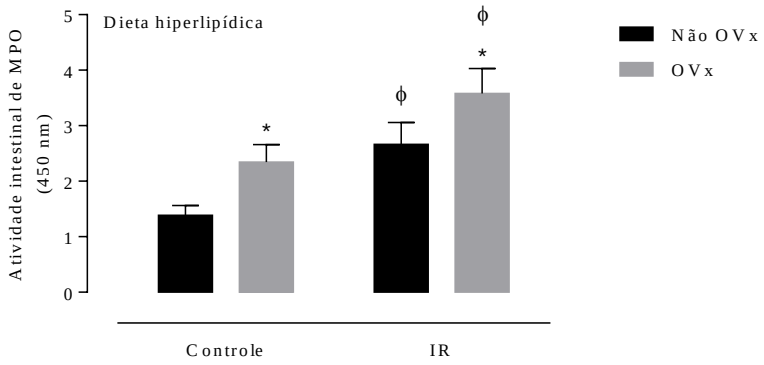


Figura 12 - Atividade de mieloperoxidase no intestino de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 11-25 amostras. $^{*}P=0,002$ (Não OVx *vs* OVx); $^{\phi}P<0,001$ (Controle *vs* IR).

5.4 Efeitos Sistêmicos Causados pela IR Intestinal

Partindo da premissa que produtos tóxicos gerados localmente durante a IR intestinal disseminem na corrente sanguínea e então, passam interferir com outros órgãos e mediar a inflamação sistêmica. Avaliamos neste tópico as células presentes na medula óssea e as circulantes, a atividade funcional dos leucócitos bem como a formação de seus complexos com plaquetas, além dos níveis séricos de alguns mediadores inflamatórios e marcadores de lesão.

5.4.1 Quantificação de leucócitos circulantes

A tabela 4 mostra redução de 27% do número de leucócitos nos animais submetidos a IR intestinal com os ovários intactos (Não OVx). A remoção dos ovários não mudou o número de leucócitos circulantes quando comparados aos animais Não OVx. Por outro lado, após a IR intestinal, animais OVx tiveram significativa redução de leucócitos circulantes (40,38%).

Tabela 4 - Número total de leucócitos circulantes (mm^3) em animais mantidos sob dieta hiperlipídica antes e após a indução da IR intestinal.

Grupos	Inicial	Final	índice de redução (%)
Não OVx	7016±583,8	-	-
IR Não OVx	6771±485,0	4950±387,3 **α**	27
OVx	8910±705,1	-	-
IR OVx	9588±876,6	5717±694,8 **β**	40,38

Os dados referem-se a valores obtidos em amostras de sangue periférico coletado antes da indução da isquemia (inicial) e após 2 h de reperfusão intestinal (final). Os dados referem-se a média ± EPM de 15 a 36 amostras. $^{\alpha}P= 0,0066$ em relação ao IR Não OVx inicial; $^{\beta}P= 0,0032$ em relação ao IR OVx inicial.

A seguir determinamos os tipos de leucócitos circulantes e observamos (Figura 13, painel A) que a remoção dos ovários associada à dieta hiperlipídica aumentou significativamente a quantidade de linfócitos circulantes comparadas à do grupo com ovários intactos. Ainda, a indução da IR intestinal de animais com ovários removidos reduziu o número de linfócitos em comparação ao grupo controle OVx. Contudo, no painel B nota-se uma redução de monócitos nos grupos IR intestinal (Não OVx e OVx) em relação aos grupos Controle (Não OVx e OVx). Por fim o painel C mostra que no grupo Controle a remoção dos ovários aumentou os granulócitos circulantes em relação ao grupo Não OVx. Além disso, após a IR intestinal houve aumento de granulócitos no grupo IR OVx em comparação ao grupo IR Não OVx. Também observamos nos grupos IR intestinal (IR Não OVx e IR OVx) redução do número de granulócitos circulantes ao ser comparado aos respectivos grupos Controle (Não OVx e OVx).

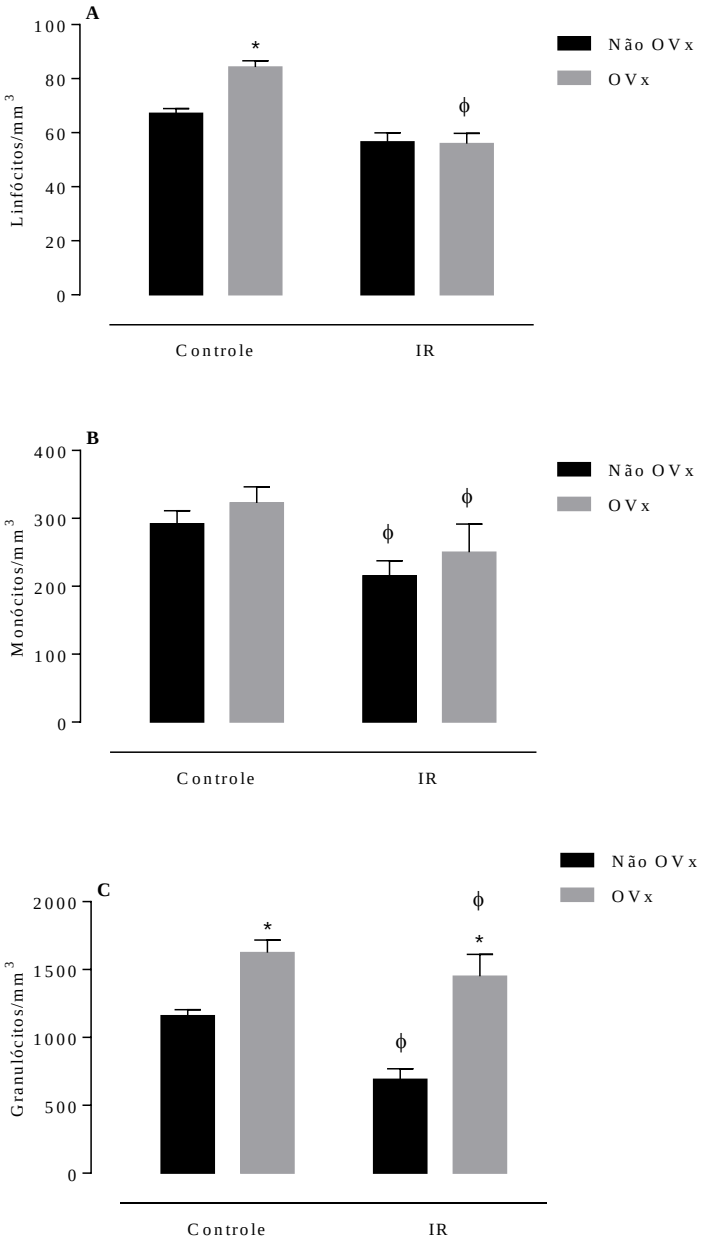


Figura 13 - Efeito da contagem diferencial dos leucócitos presentes no sangue periférico de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 15 a 36 amostras. Painel A, $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle) e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle). Painel B, $^{\phi}P=0,031$ (Controle *vs* IR); Painel C, $^{*}P<0,001$ (Não OVx *vs* OVx); $^{\phi}P=0,004$ (Controle *vs* IR).

Dando continuidade aos efeitos sistêmicos da IR intestinal nesses animais obesos, avaliamos o número de plaquetas e a taxa de hemoglobina circulante. Como pode ser visto na figura 14 (painel A), a ovariectomia *per se* aumentou o número de plaquetas em relação ao grupo de animais com ovários intactos. Com

relação aos efeitos na IR intestinal, nosso dados indicaram que animais obesos com ovários intactos e com ovários removidos reduziram o número de plaquetas circulantes em relação aos seus respectivos grupos Controle. Todavia, após a IR intestinal animais obesos OVx reduziram o número de plaquetas mas mantiveram elevado em relação ao grupo IR intestinal com ovários intactos.

O painel B da figura 14 mostra que nem a IR intestinal ou a remoção dos ovários interferiu com a taxa de hemoglobina dos animais obesos.

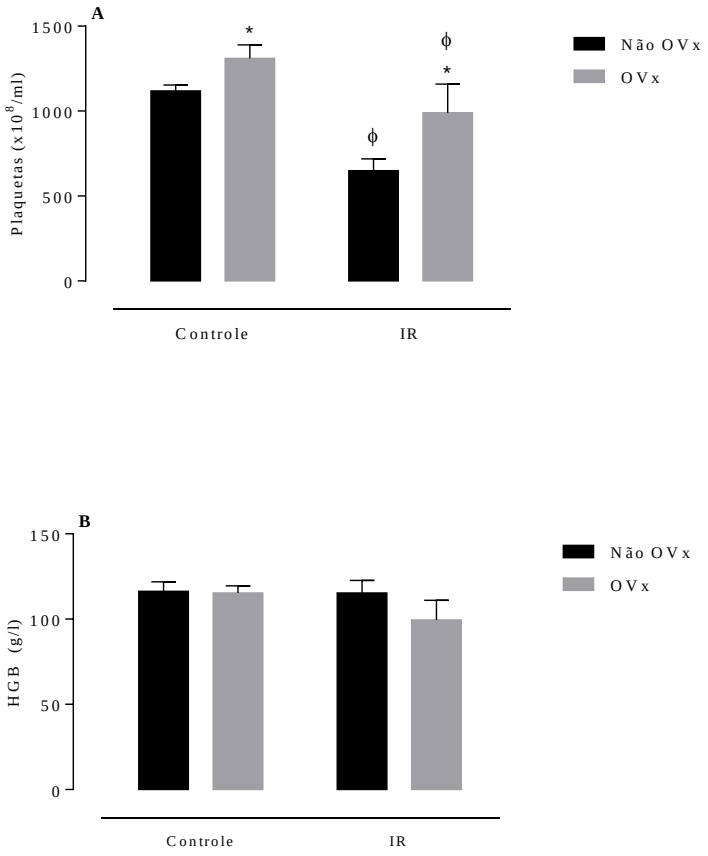


Figura 14 - Efeito da contagem de plaquetas e hemoglobinas presentes no sangue periférico de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 15 a 35 amostras. Painel A, $^{*}P=0,010$ (Não OVx vs OVx); $^{\phi}P<0,001$ (Controle *vs* IR).

5.4.2 Contagem de células na medula óssea

A figura 15 representa o número total de células recuperadas da medula óssea dos animais obesos submetidos ou não a IR intestinal com e sem ovários removidos. Como pode ser observado animais obesos OVx submetidos a IR intestinal aumentaram significativamente o número de células na medula em relação aos animais do grupo Controle (OVx) e IR intestinal com ovários intactos.

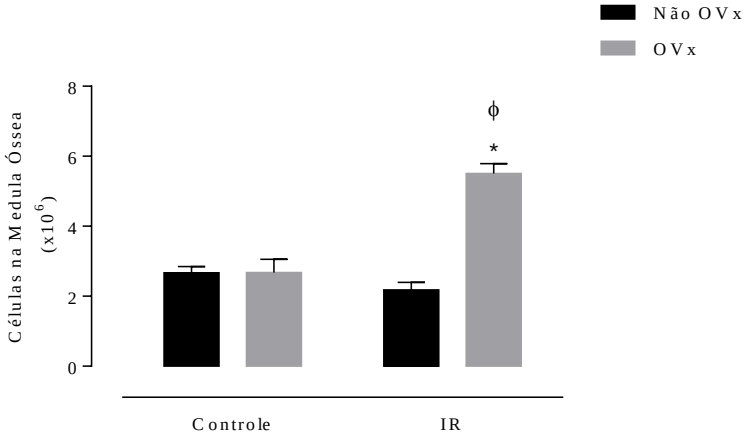


Figura 15 - Número de células presentes na medula óssea de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 8 a 11 amostras. $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx; $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle).

5.4.3 Atividade funcional de células da medula

Nesta série de experimentos avaliamos a migração espontânea *in vitro* de leucócitos da medula óssea como índice de atividade funcional. A figura 16 indica aumento da migração de leucócitos de um compartimento para outro da placa de quimiotaxia após a IR intestinal nos animais obesos dos grupos Não OVx e OVx em comparação aos grupos Controle.

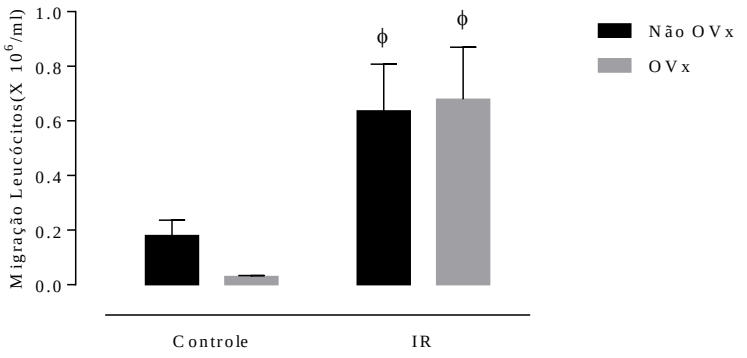


Figura 16 – Migração espontânea de leucócitos. Os leucócitos foram obtidos da medula óssea de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 8 a 18 amostras. $^{\phi}P=0,007$ (Controle *vs* IR).

5.4.4 Formação de complexos plaquetas e leucócitos

Nestes estudos investigamos a formação de dois complexos no soro dos animais dos grupos de estudo: CD45+/CD41+ e CD11b+/CD162+ (PSGL-1).

No complexo plaquetas agregadas a leucócitos (CD45+/CD41+) foi detectado diferença de interação entre a ovariectomia e IR intestinal nos grupos Não OVx *vs* OVx. No figura 17, painel A observa-se que não alterou o complexo entre os grupos Controle (Não OVx *vs* OVx). Todavia, no grupo submetido à remoção dos ovários e induzido a IR intestinal nota-se redução significativa na formação deste complexo ao ser comparado com o grupo Controle (OVx) e com o grupo IR (Não OVx).

Em relação ao complexo dos ligantes de P-selectina em leucócitos ativos (CD11b+/CD162+), também foi detectado interação entre a ovariectomia e IR intestinal. Observamos (Figura 17, painel B) que a IR intestinal reduziu a formação dos complexos nos animais IR Não OVx e IR OVx ao ser comparados com seus grupos Controle (Não OVx e OVx). Entretanto, nos animais com ovários removidos e submetidos a IR intestinal (IR OVx) aumentou a formação do complexo quando comparados aos animais com ovários intactos também submetidos a IR intestinal (IR Não OVx).

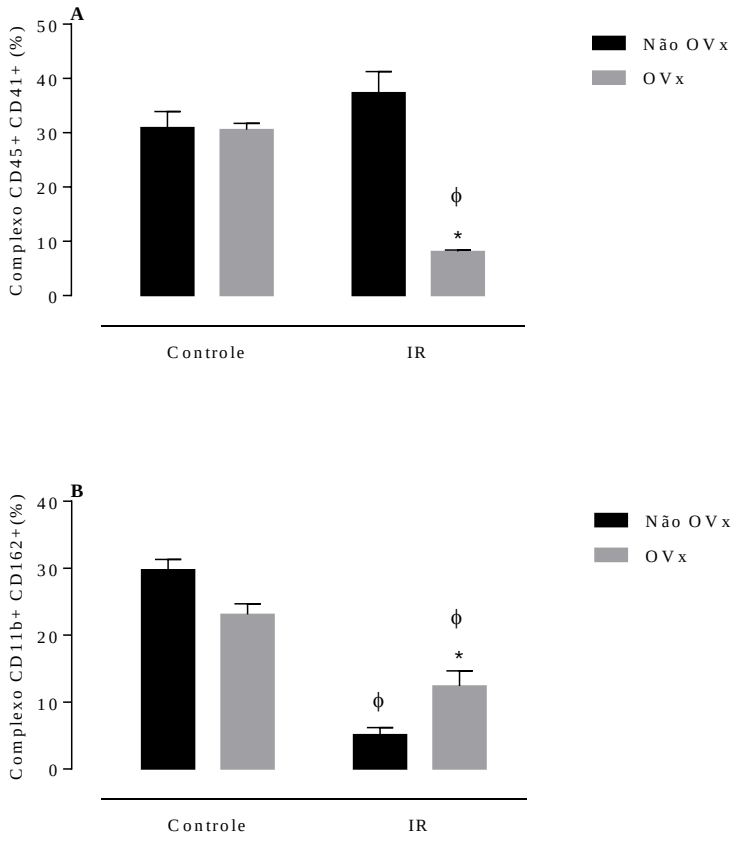


Figura 17 - Formação do complexo plaquetas e leucócitos em amostras de sangue de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 5 a 12 amostras.

Painel A, $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle). Painel B, $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx e $^{\phi}P<0,05$ (Controle *vs* IR).

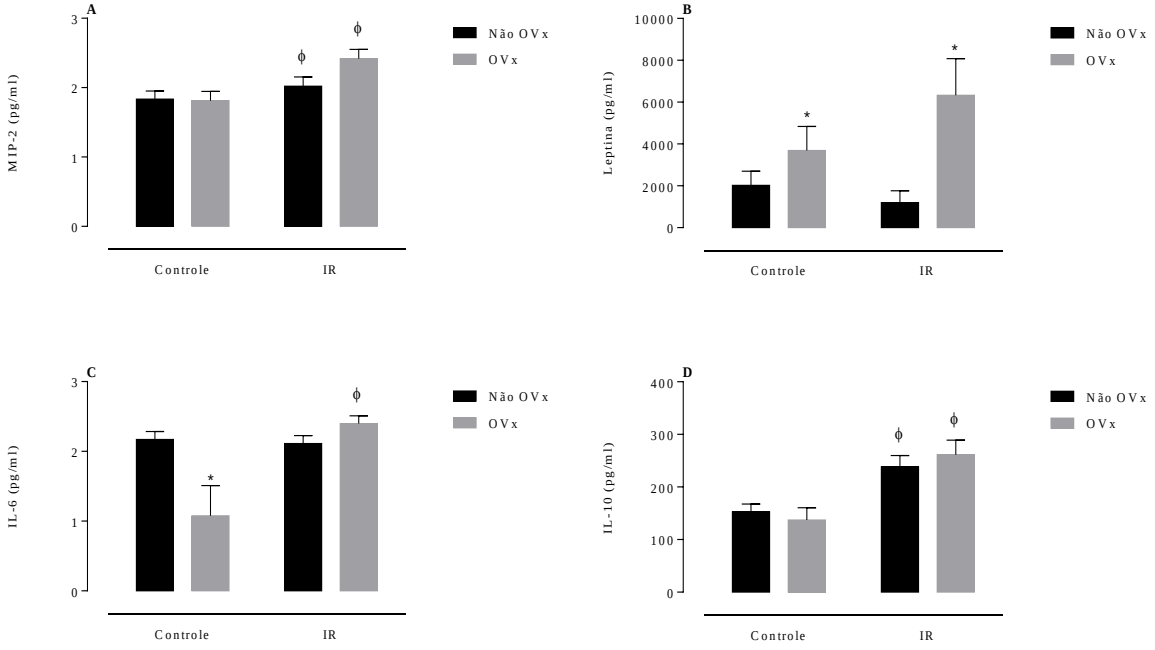
5.4.5 Concentração de mediadores inflamatórios no soro

A figura 18 mostra que animais obesos OVx do grupo Controle tiveram aumento da concentração de leptina (painel B), IL-17A (painel E), KC (painel F) e VEGF (painel G) em relação ao grupo Controle Não OVx. Em contraste, animais obesos OVx reduziram os níveis de IL-6 (painel C) e resistina (painel H) em comparação ao grupo Controle Não OVx.

Quando submetemos os animais obesos com ovários intactos à IR intestinal observamos aumento de MIP-2 (painel A), IL-10 (painel D), KC (painel F) e VEGF (painel G) em relação ao seu respectivo grupo Controle Não OVx.

Animais obesos OVx após serem submetidos à IR intestinal exacerbaram os níveis séricos de MIP-2 (painel A), IL-6 (painel C), IL-10 (painel D) e KC (painel F) em comparação ao seu grupo Controle OVx.

Finalizando as comparações, animais obesos OVx submetidos à IR intestinal apresentaram aumento de leptina (painel B), IL-17A (painel E) e KC (painel F) em relação ao grupo de animais obesos Não OVx também submetidos à IR intestinal. Em contraste, nos animais obesos IR intestinal com ovários removidos, observamos redução de resistina (painel H) em comparação ao grupo IR intestinal com ovários intactos.



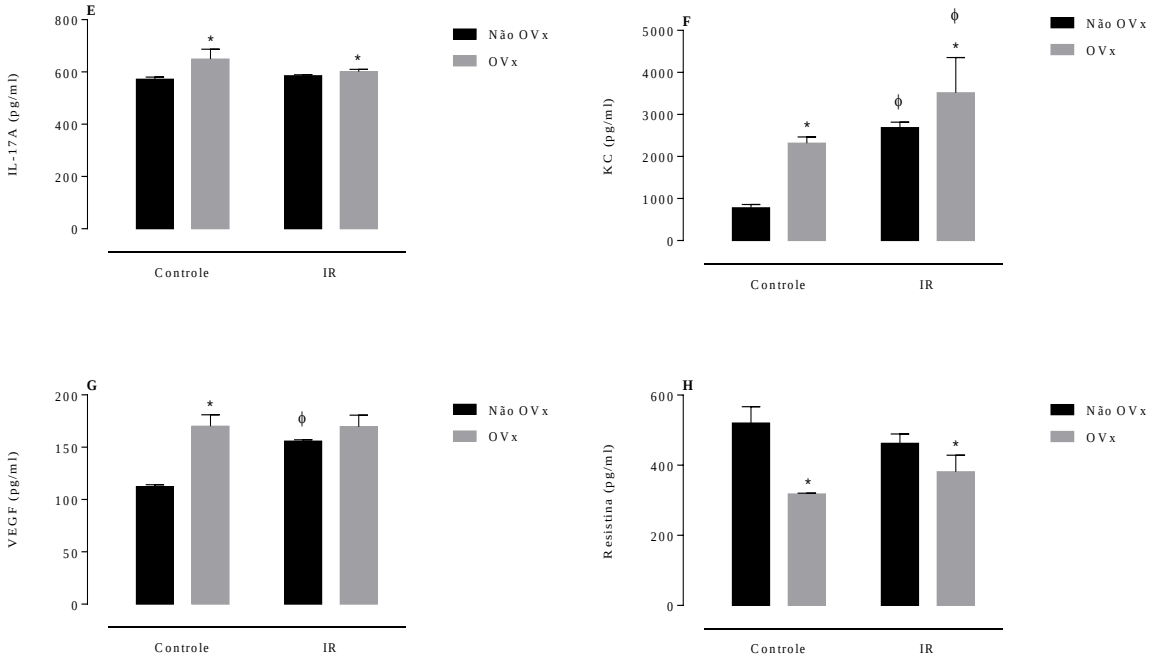


Figura 18 - Concentração sérica de MIP-2, leptina, IL-6, IL-10, IL-17A, KC, VEGF e Resistina de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 3 a 17 animais por grupo. Painel A e D: $^{\phi}P=0,006$ e $^{\phi}P<0,0001$ (Controle *vs* IR). Painel B, E e H: $^{*}P=0,013$, $^{*}P=0,032$ e $^{*}P=0,014$ (Não OVx *vs* OVx). Painel C: $^{*}P=0,04$ em relação ao grupo Não OVx (Controle) e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle). Painel F: $^{\phi}P=0,050$ (Controle *vs* IR) e $^{*}P=0,015$ (Não OVx *vs* OVx). Painel G: $^{*}P<0,05$ e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle).

5.4.6 Níveis circulantes de fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (LDH)

Nesta fase avaliamos os níveis circulantes dos marcadores de lesão: fosfatase alcalina e LDH em animais com ovários intactos e removidos e submetidos a IR intestinal. No painel A da figura 19 mostra que a remoção dos ovários de animais obesos do grupo Controle elevou de forma significativa os níveis de fosfatase alcalina em relação ao grupo de animais mantidos com ovários intactos. Resultados similares foram obtidos quando a IR intestinal foi desencadeada nos animais com ovários removidos.

Com respeito ao lactato desidrogenase (Figura 19, painel B) observamos que a indução da IR intestinal aumentou os níveis de LDH nos animais obesos com ovários intactos e removidos em comparação aos seus respectivos grupos Controle.

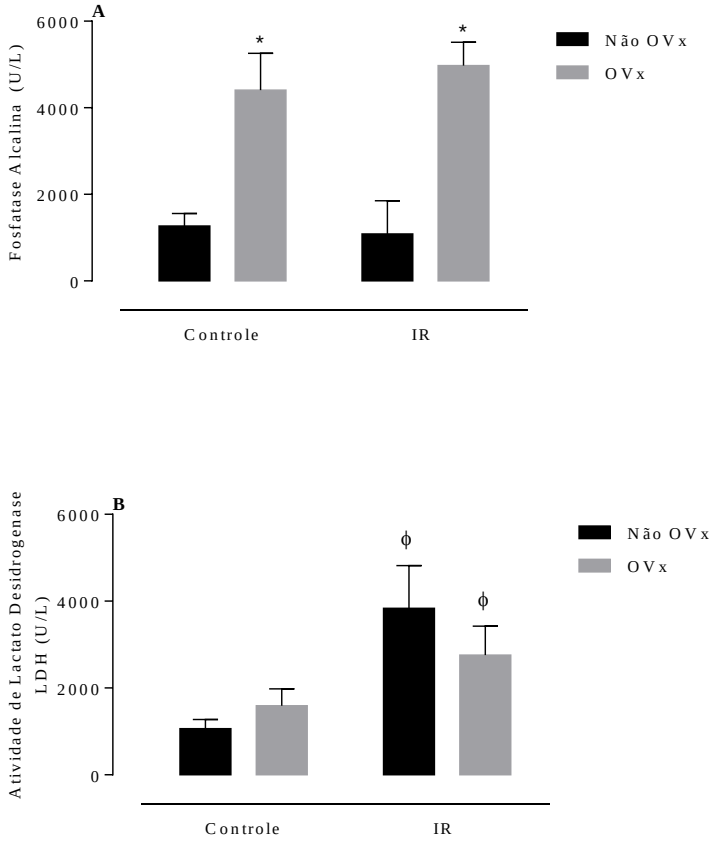


Figura 19 - Concentração de fosfatase alcalina e LDH no soro de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de amostras. Painel A, $^{*}P<0,0001$ (Não OVx *vs* Ovx); Painel B, $^{\phi}P=0,0033$ (Controle *vs* IR).

5.5 Inflamação Pulmonar Causada pela IR Intestinal

Neste subitem tratamos da inflamação pulmonar decorrente da IR intestinal em animais obesos Não OVx e OVx após 9 semanas de consumo da dieta hiperlipídica. Para tanto avaliamos a permeabilidade vascular, edema, presença de neutrófilos, mediadores inflamatórios e óxido nítrico. Estudos histopatológicos também foram realizados.

5.5.1 Extravasamento do corante azul de Evans no pulmão

A remoção dos ovários *per se* aumentou a permeabilidade vascular pulmonar em comparação aos animais com ovários intactos. A IR intestinal em animais com ovários intactos não alterou a permeabilidade vascular em relação ao seu grupo Controle. Porém a IR intestinal em animais com ovários removidos reduziu o

extravasamento do corante azul de Evans em relação ao encontrado no seu respectivo grupo Controle.

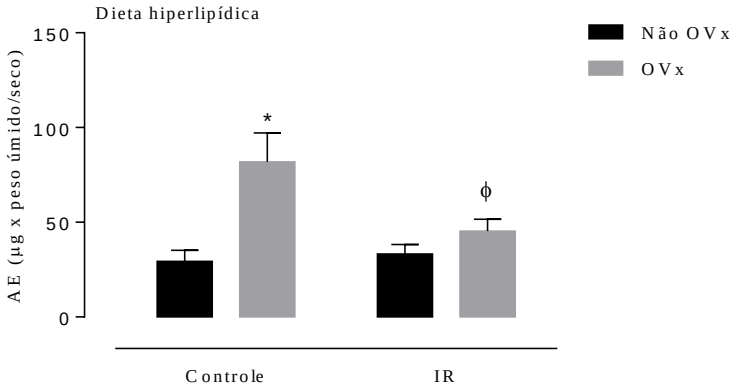


Figura 20 - Quantificação do extravasamento do corante azul de Evans (AE) no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 19 a 31 amostras. $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle) e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle).

5.5.2 Relação peso úmido/seco no pulmão

Na figura 21, o gráfico representa a relação peso úmido/seco no pulmão de camundongos fêmeas obesas. Nota-se que a remoção dos ovários *per se* reduziu a relação peso úmido/seco quando comparada com a do grupo com ovários intactos. A IR intestinal no grupo obeso IR Não OVx não alterou a relação peso úmido/seco. Por outro lado, a relação peso úmido/seco reduziu significativamente no grupo de animais obesos IR OVx.

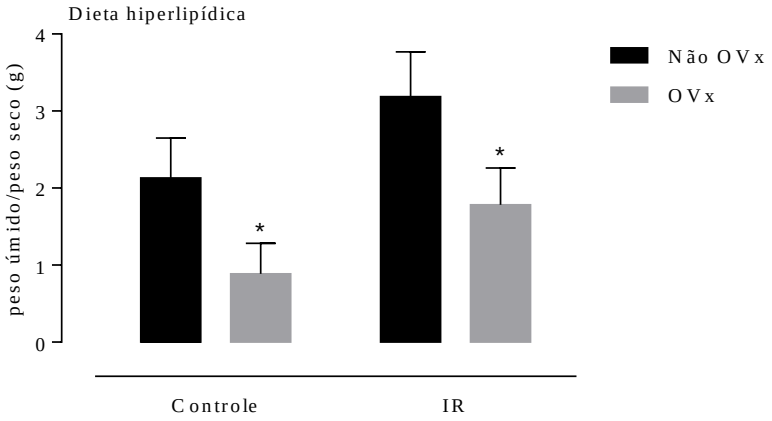


Figura 21 - Relação peso úmido/seco no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 19 a 28 amostras. $^{*}P=0,013$ (Não OVx vs OVx).

5.5.3 Quantificação de MPO no pulmão

A figura 22 mostra aumento da atividade de MPO no pulmão dos animais com ovários removidos em relação ao grupo de animais obesos Não OVx. A IR intestinal aumentou a atividade de MPO no tecido pulmonar dos animais IR Não OVx e IR OVx em relação aos seus respectivos grupos Controle. Além disso, a IR intestinal exacerbou a atividade de MPO no grupo IR OVx em relação ao grupo IR Não OVx.

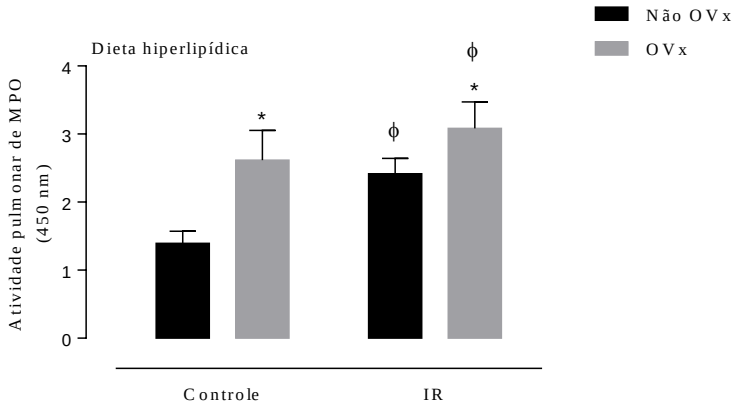


Figura 22 - Atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ± EPM de 11 a 25 amostras. **P=0,002* (Não OVx *vs* OVx) e $^{\phi}$*P=0,012* (Controle *vs* IR).

Quantificamos também a enzima MPO utilizando a técnica de imunohistoquímica. Os dados obtidos estão apresentados na figura 23 e indicam que a remoção dos ovários aumentou a marcação de MPO no pulmão de animais obesos do grupo Controle em relação aos animais obesos com ovários intactos. A IR intestinal no grupo IR Não OVx teve aumento significativo na marcação da enzima MPO em relação ao seu grupo Controle. Além disso, no grupo obeso IR OVx também observamos aumento significativo da MPO em relação ao seu grupo Controle e em relação ao grupo IR Não OVx (Figura 23, A e B).

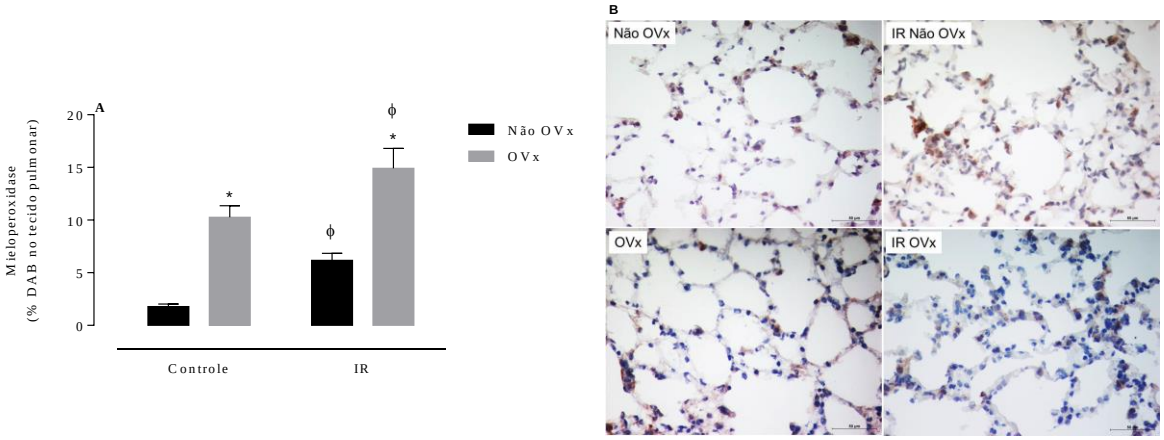


Figura 23 - Análise de imunohistoquímica da enzima mieloperoxidase no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 4 a 5 animais por grupo. $^{*}P<0,0001$ (Não OVx *vs* OVx) e $^{\phi}P=0,0001$ (Controle *vs* IR).

5.5.4 *Mediadores inflamatórios em sobrenadante de explante pulmonar após a IR intestinal*

As figuras 24 e 25 mostraram a concentração de mediadores inflamatórios produzidos pelo tecido pulmonar após 24 h de cultura. Observamos no grupo Controle OVx aumento da concentração de IL-10 (painel J) e IL-5 (painel L) e redução de leptina (painel D), IL-17A (painel E), KC (painel G) e IL-6 (painel I) em relação ao grupo Controle Não OVx.

Quando analisamos os animais com ovários intactos submetidos à IR intestinal, notamos que somente a concentração de IL-5 (painel L) se elevou. Contudo, no pulmão dos animais obesos IR OVx aumentou significativamente a concentração de VEGF (painel B), KC (painel G) e IL-6 (painel I) em relação ao grupo Controle OVx. Nesta mesma comparação foi observado redução de IL-10 (painel J). Adicionalmente, no grupo IR OVx encontramos aumento de VEGF (painel B) e IL-1β (painel F) em relação ao grupo IR Não OVx.

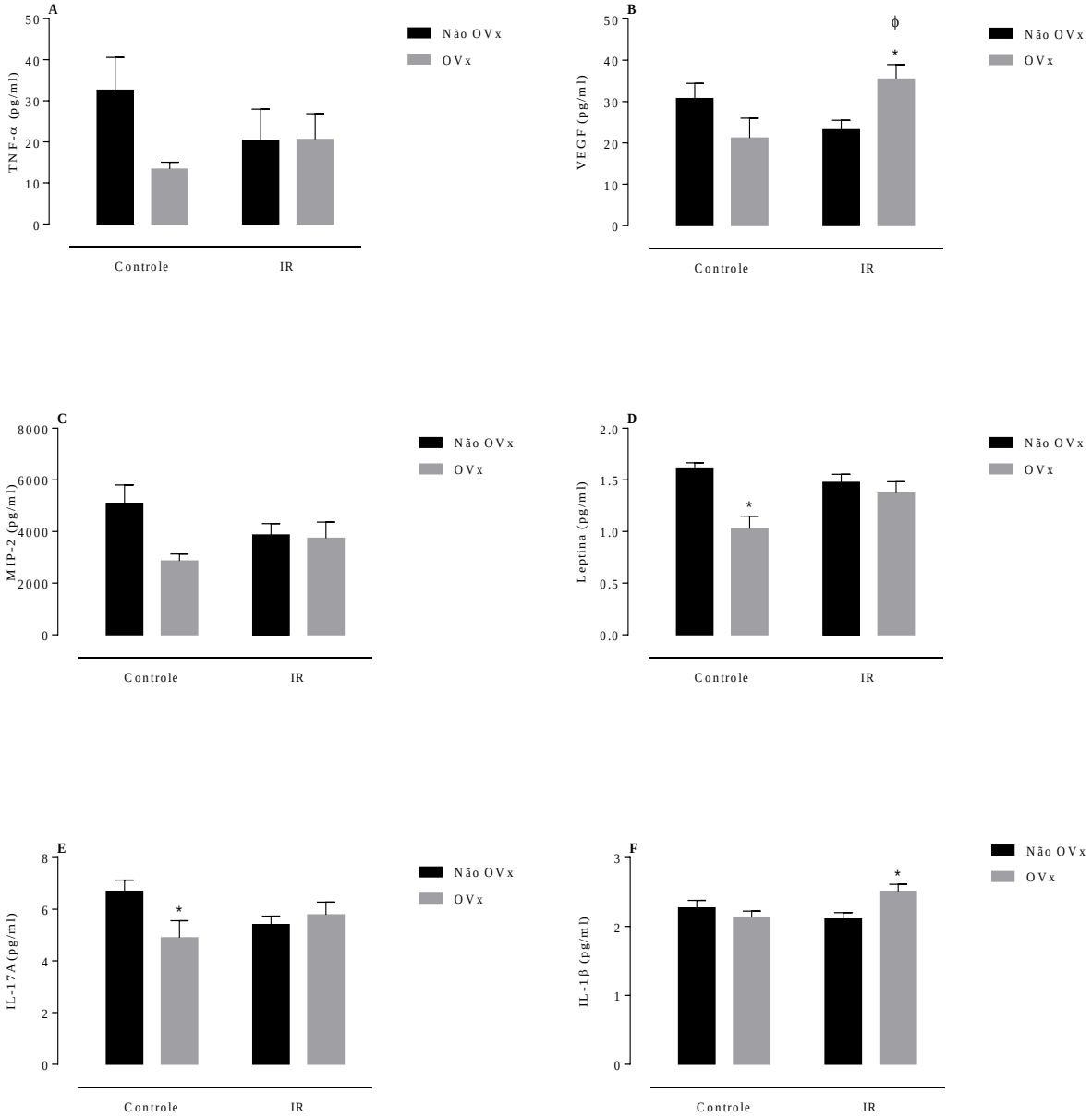


Figura 24 - Concentração de TNF-α, VEGF, MIP-2, Leptina, IL-17A e IL-1β no sobrenadante de explante de pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 5 a 12 amostras. Painel B: *$P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle); Painel D e E: *$P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle); Painel F: *$P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx.

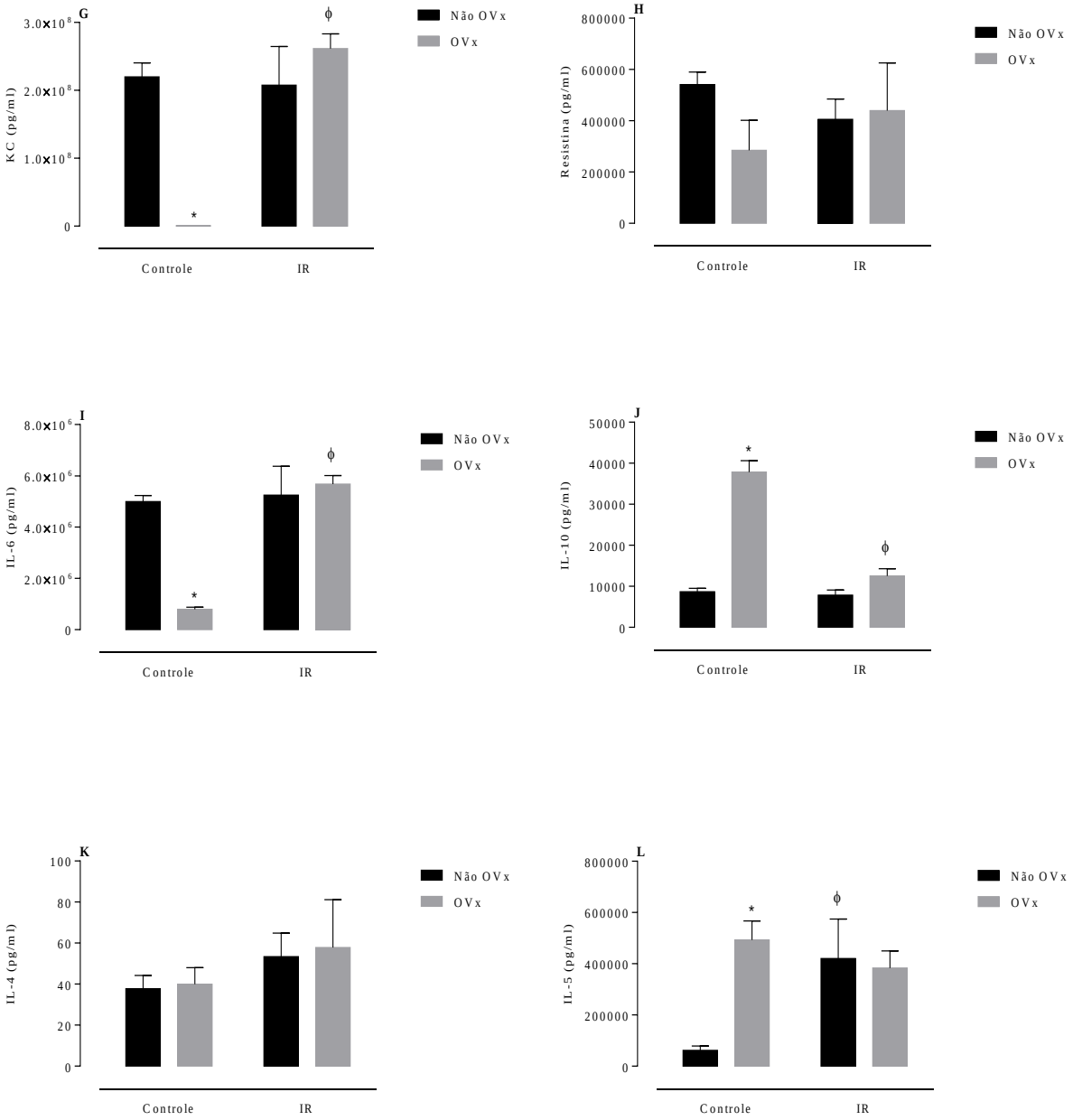


Figura 25 - Concentração de KC, Resistina, IL-6, IL-10, IL-4 e IL5 no sobrenadante de explante de pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 3 a 8 animais por grupo. Painel G, I, J: $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle) e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo OVx (Controle); Painel L: $^{*}P<0,05$ e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle).

5.5.5 Avaliação da presença de NO no tecido pulmonar

A figura 26 mostra que a ovariectomia *per se* elevou os níveis de nitrito em amostras de sobrenadante de explante pulmonar em relação ao grupo Não OVx. Após a IR intestinal o mesmo evento ocorreu no grupo obeso IR OVx com maior magnitude em relação ao grupo IR Não OVx.

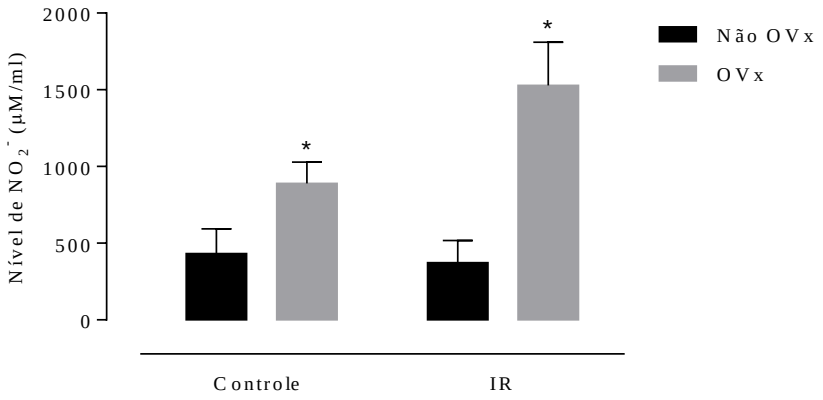


Figura 26 - Determinação de NO_2^- em explante de pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 23 a 28 amostras. **P<0,0001* (Não OVx *vs* OVx).

Ainda, avaliamos a expressão da NOS (induzida e endotelial) no parênquima pulmonar por imunohistoquímica. Os dados obtidos (Figura 27, painel A e B) revelaram que a remoção dos ovários elevou a expressão de iNOS independentemente da IR intestinal ao ser comparado com o grupo Não OVx. Posteriormente, mensuramos a expressão de eNOS (Figura 27, painel C e D) no tecido pulmonar e observamos que após a IR intestinal a expressão de eNOS foi reduzida em ambos os grupos Não OVx e OVx.

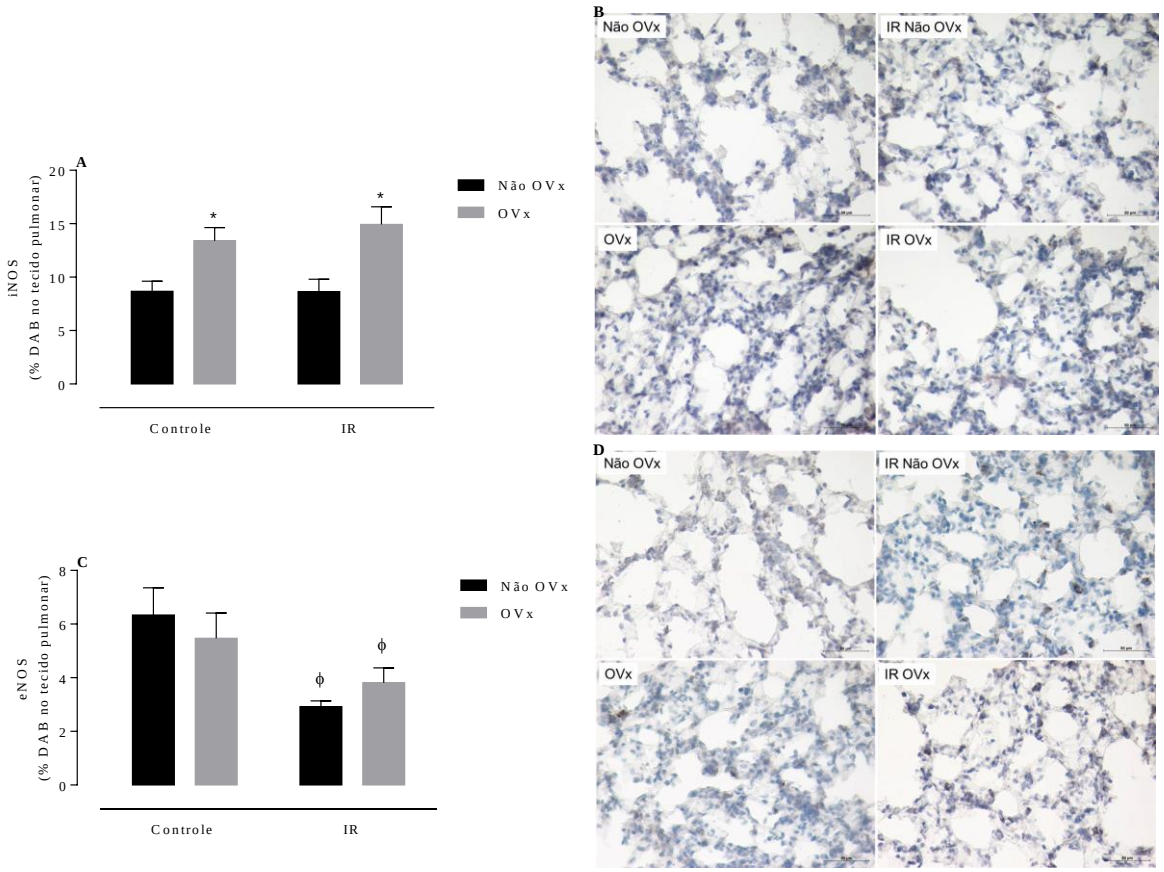


Figura 27 - Determinação de iNOS e eNOS pela técnica de imunohistoquímica de tecido pulmonar em camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 4 a 5 animais por grupo. Painel A, $^{*}P<0,0001$ (Não OVx *vs* OVx); Painel C, $^{\phi}P=0,0009$ (Controle *vs* IR).

5.5.6 *Avaliação histopatológica de infiltrado de células e hemorragia no pulmão de animais obesos após a IR intestinal*

Prosseguindo nossos estudos, mensuramos por análise histológica o infiltrado de células (leucócitos) e hemorragia em histologia no pulmão desses animais. A porcentagem de células infiltradas no tecido pulmonar (Figura 28, painel A) se apresentou aumentada no grupo ovariectomizado em comparação ao grupo não ovariectomizado, contudo na indução da IR intestinal não houve alteração no grupo IR OVx, mas no grupo IR Não OVx notamos aumento do infiltrado de células em relação ao grupo Controle Não OVx. Ainda, avaliamos a porcentagem de hemácias (Figura 28, painel B) e com isso detectamos aumento da porcentagem de hemácias no grupo OVx em comparação ao grupo Não OVx. Após a IR intestinal notamos que os animais IR Não OVx tiveram aumento de hemorragia em relação ao grupo Controle Não OVx. Em contraste, a hemorragia reduziu no grupo IR OVx em

relação aos grupos Controle OVx e IR Não OVx. No painel C da figura 28 está representado o infiltrado de células com seta vermelha e as hemácias com seta azul.

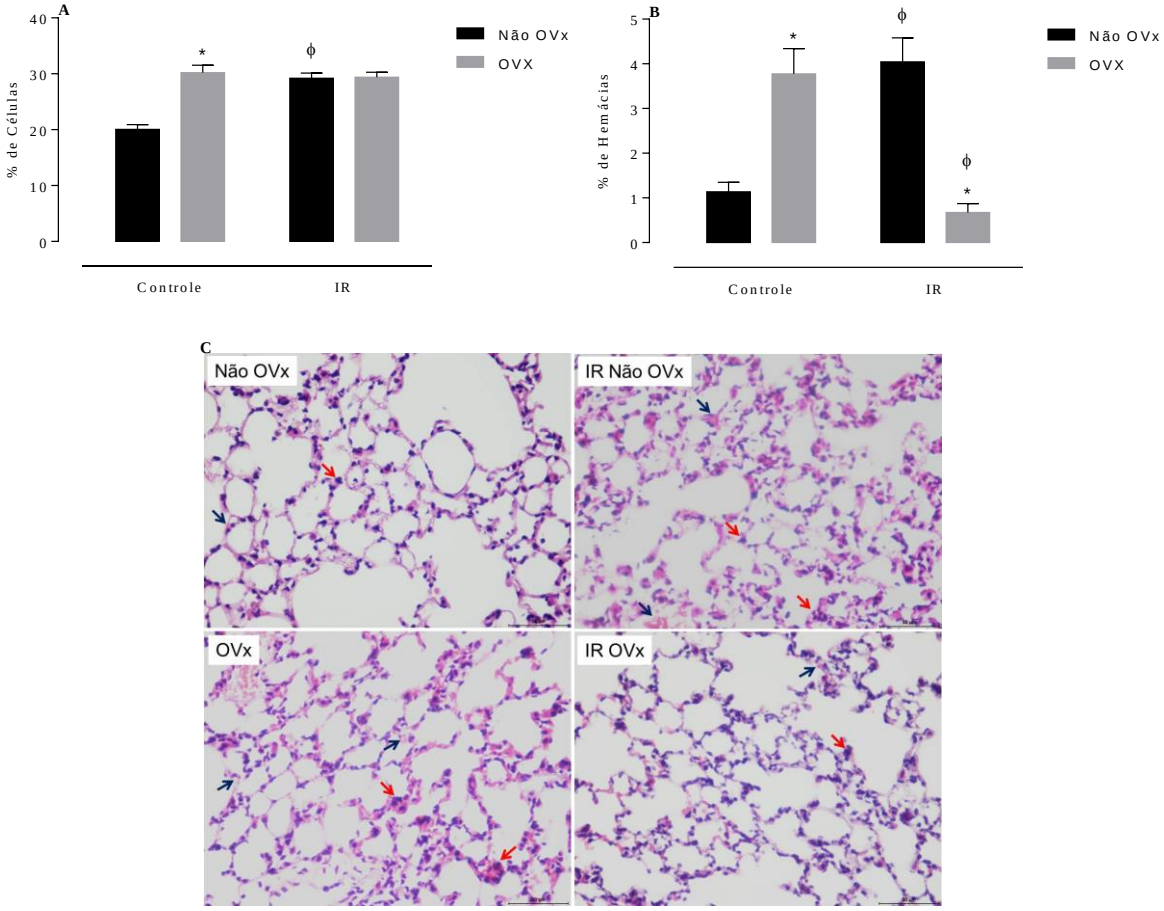


Figura 28 - Análise histológica de infiltrado de células e hemorragia no pulmão de camundongos fêmeas mantidas por 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 4 a 5 animais por grupo. Foram detectados efeitos de interação entre a ovariectomia e IR intestinal. Painel A, $^{*}P<0,05$ e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle); Painel B, $^{*}P<0,05$ (Não OVx *vs* OVx) $^{\phi}P<0,05$ (Controle *vs* IR); Painel C, infiltrado de células (seta vermelha) e hemácias (seta azul).

5.6 Inflamação no Tecido Adiposo

Neste tópico mensuramos alguns mediadores inflamatórios no sobrenadante de cultura realizado com tecido adiposo gonadal.

5.6.1 Concentração de mediadores inflamatórios em sobrenadante de explante no tecido adiposo de animais obesos

Na figura 29 apresentamos os dados referentes à dosagem de mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante da cultura de 24 h realizado com tecido adiposo. Nossos dados revelaram que os animais do grupo Controle OVx quando

comparado ao grupo Controle Não OVx, apresentaram aumento dos níveis de: KC (painel A), MIP-2 (painel B), IL-6 (painel D), leptina (painel G) e resistina (painel H).

A IR intestinal em animais com ovários intactos provocou aumento dos níveis de: VEGF (painel C), IL-10 (painel E), IL-17A (painel F) e leptina (painel G). Verificamos também redução de KC (painel A) e resistina (painel H) em relação ao grupo Controle Não OVx.

O tecido adiposo das fêmeas obesas que tiveram seus ovários removidos ao serem submetidas a IR intestinal apresentou aumento de leptina (painel G) e redução de KC (painel A) e resistina (painel H) em comparação ao seu grupo Controle OVx.

Adicionalmente, ao compararmos os grupos submetidos à IR intestinal observamos no grupo IR OVx elevação de KC (painel A), MIP-2 (painel B), IL-6 (painel D), leptina (painel G) e resistina (painel H) e redução da concentração de VEGF (painel C), IL-10 (painel E) e IL-17A (painel F) em relação ao grupo IR Não OVx.

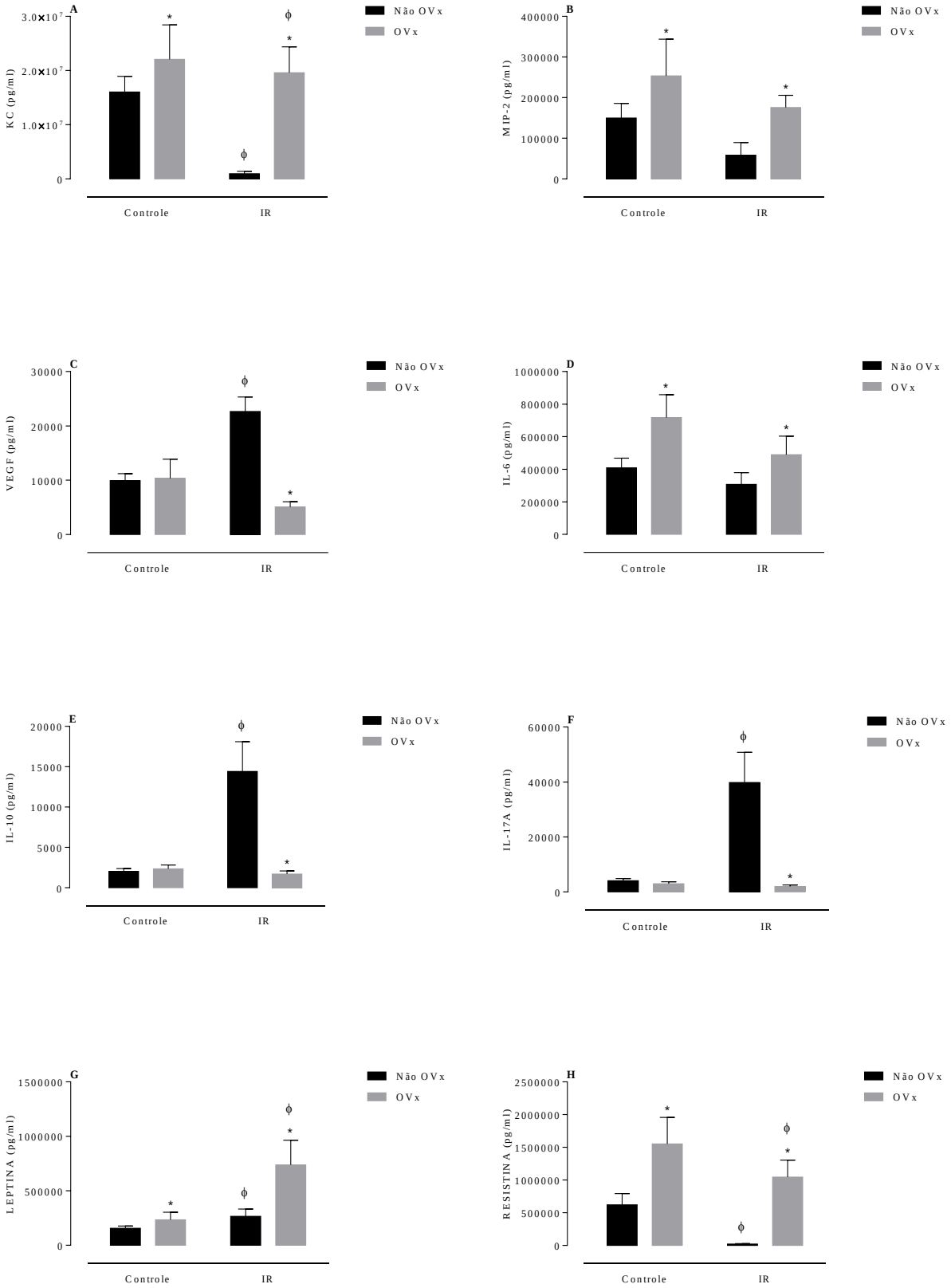


Figura 29 - Concentração de KC, MIP-2, VEGF, IL-6, IL-10, IL-17A, Leptina e Resistina no sobrenadante de explante de tecido adiposo de camundongos fêmeas mantidas 9 semanas sob dieta hiperlipídica com ovários intactos (Não OVx) ou removidos (OVx). E então, os animais foram separados em dois grupos: Controle e IR (submetidos à isquemia (45 min) e reperfusão intestinal (2 h)). Os dados representam a média ±EPM de 13 a 21 amostras. Painéis A, G e H: $^{*}P=0,001$, $^{*}P=0,008$

e $^{*}P<0,0001$ (Não OVx *vs* OVx) e $^{\phi}P=0,02$, $^{\phi}P=0,003$ e $^{\phi}P=0,013$ (Controle *vs* IR); Painéis B e D: $^{*}P=0,024$ e $^{*}P=0,009$ (Não OVx *vs* OVx); Painel C, E e F: $^{*}P<0,05$ em relação ao grupo IR Não OVx e $^{\phi}P<0,05$ em relação ao grupo Não OVx (Controle).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a interação dos hormônios sexuais femininos com a obesidade sobre a repercussão local, sistêmica e pulmonar causadas pela isquemia e reperfusão intestinal. Para tanto camundongos fêmeas submetidas à remoção cirúrgica dos ovários foram submetidos à dieta hiperlipídica e após 9 semanas à isquemia (45 min) e reperfusão (2 h) foi desencadeada. A razão para a condução destes estudos recai sobre o fato de existirem dados indicando que mulheres obesas apresentam piora no processo inflamatório e que na menopausa estão menos protegidas (LIZCANO; GUZMÁN, 2014). Além disso, a obesidade e a variação dos níveis circulantes dos HSF isoladamente são eventos que se associam ao desenvolvimento de doenças inflamatórias (SHEN; KUMAR; SHI, 2014).

Em um primeiro momento foi necessário validar as metodologias empregadas no presente estudo. Nesse sentido validamos a efetividade da ovariectomia bem como, o modelo de obesidade. Confirmamos a efetividade da remoção dos ovários analisando a mudança da morfologia das células do lavado vaginal bem como, o peso do útero desses animais após 9 semanas de OVx. O ciclo estral é determinado pelos níveis de estrógeno e progesterona circulantes. A remoção dos ovários reduziu significativamente os hormônios sexuais femininos (estradiol e progesterona) de modo que as células presentes no lavado vaginal de um animal com 9 semanas de remoção dos ovários, caracterizam a fase de diestro, onde há predominância de leucócitos. Neste estudo somente animais OVx em diestro foram utilizados. Todavia, animais com os ovários preservados, a despeito de havermos determinado a fase do ciclo estral, foram utilizados independentemente da fase em que se encontravam à época dos experimentos. Adicionalmente, dosamos os níveis séricos de estradiol o qual se apresentou reduzido no grupo OVx. Nossa análise está de acordo com os estudos de Ng; Yong; Chakraborty, (2010) que avaliaram os níveis de estradiol em animais com ovários intactos e removidos e constataram a redução de estradiol no grupo OVx.

Nossos resultados também identificaram significativa redução do peso do útero dos animais OVx em relação aquele obtido em animais com ovários mantidos intactos. Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório usando ratas revelaram que a remoção dos ovários acarretou diminuição no peso do útero (DE OLIVEIRA et

al., 2007). Obtivemos resultados similares em modelo de inflamação pulmonar em camundongos (ACCETTURI, 2014; GIMENES, 2013).

A obesidade foi caracterizada pela variação da massa corporal, deposição de gordura e pelo perfil lipídico. Nesta etapa do estudo utilizamos animais sob dieta convencional (Controle) e hiperlipídica (Não OVx e OVx). Inicialmente quantificamos o consumo semanal de ração por animal em gramas e em Kcal. Notamos redução do consumo da dieta hiperlipídica em relação aos animais mantidos sob dieta convencional. Apesar de não notarmos alteração no consumo da ração em Kcal, nossos dados estão de acordo com os de Kretschmer et al. (2005); S White et al. (2013) que mostraram menor consumo semanal de ração hiperlipídica em relação ao consumo de dieta convencional. Ainda, estudo conduzido por S White et al. (2013) mostraram o consumo semelhante de ração em Kcal. É possível que a menor ingestão de dieta hiperlipídica observada em nossos estudos seja consequência do seu alto teor energético (5,35 Kcal/g) em comparação a dieta convencional (3,8 kcal/g). Ainda, nossos dados também identificaram que a remoção cirúrgica dos ovários acentuou o ganho de peso dos animais indicando que a obesidade instalada decorre de dois eventos, a redução dos HSF circulantes e do alto teor de energia a que foram submetidos. Resultados similares foram obtidos por (HONG et al., 2009). Vale lembrar que camundongos deficientes de receptor de estrôgenio (ERα) apresentam aumento de tecido adiposo branco (HEINE et al., 2000). Ainda, mulheres no período de transição para menopausa desenvolvem aumento de tecido adiposo abdominal (CARR, 2003; IGNACIO et al., 2009). É importante ressaltar que estudos prévios, ainda não publicados, do nosso laboratório indicaram que em camundongos fêmeas sob dieta convencional Não OVx e OVx mostraram que animais OVx exibem maior peso em relação aos animais Não OVx. No geral animais OVx mantidos sob dieta convencional têm peso semelhante aos animais Não OVx mantido sob dieta hiperlipídica. Estes dados sugere interação da ovariectomia com a dieta hiperlipídica sobre a massa corpórea dos animais.

Em seguida, mensuramos o tecido adiposo gonadal nos grupos de animais obesos com ovários intactos ou removidos. Nossos resultados indicaram que os animais com ovários removidos apresentaram aumento do tecido adiposo gonadal em relação aos animais com ovários intactos. Dados do nosso laboratório, não publicados, mostraram o aumento do tecido adiposo de animais com ovários intactos sob dieta hiperlipídica em comparação aos de animais sob dieta convencional.

Estudos conduzidos por Ignacio et al. (2009) relataram que a redução de estrogênio desencadeia aumento de tecido adiposo. Sendo assim, é interessante considerar que a ovariectomia induz a formação de tecido adiposo e este, pode exercer papel importante no curso da resposta inflamatória.

É interessante notar que apesar do aumento de peso após a dieta hiperlipídica e a remoção dos ovários, nossos dados não revelaram diferenças na glicemia entre os grupos mantidos por 9 semanas com dieta convencional (Controle) e dieta hiperlipídica (Não OVx e OVx). Todavia, S White et al. (2013) referiram que em modelo de obesidade, camundongos Swiss ingeriram dieta convencional e hiperlipídica durante 10 semanas e após a avaliação da curva glicêmica, a glicemia estava exacerbada nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Visto que nossos estudos foram conduzidos em animais submetidos a 9 semanas de dieta hiperlipídica, então é possível que diferenças na taxa glicêmica possam surgir após um consumo mais prolongado da dieta.

Também foram mensurados os níveis circulantes de colesterol e triglicérides nos animais obesos Não OVx e OVx. O aumento de colesterol e triglicérides está associado à ingesta de dieta hiperlipídica quando comparado à dieta convencional (CAMPOS et al., 2014; SENGER PATRÍCIA FIORINO APOIO; MACKENZIE RESUMO, 2011). Em nossos estudos notamos que a remoção dos ovários, acentuou a concentração circulante de colesterol e triglicérides. Dados anteriores do nosso laboratório relataram aumento dos níveis circulantes de colesterol, mas para o triglicérides não foi observado diferença entre animais sob dieta hiperlipídica em relação aos animais sob dieta convencional. Correia-Júnior, (2011) descreveu que a concentração circulante de colesterol e triglicérides em animais da linhagem C57BL/6 (30 semanas) foi maior em animais OVx em relação ao grupo Não OVx sob dieta hiperlipídica. Assim, nossos dados referentes à caracterização da obesidade permitem inferir que animais submetidos a 9 semanas de consumo de dieta hiperlipídica apresentaram um quadro de obesidade e que esta parece ser exacerbada nos animais com ovários removidos. Em conjunto os dados obtidos com animais OVx e Não OVx indicam uma potencial influência da redução dos HSF circulantes com a obesidade.

Uma vez caracterizado a influência da ovariectomia e o modelo de obesidade passamos a investigar as repercussões da IR intestinal nos animais obesos com e sem ovários. Uma das consequências da IR intestinal é o aumento da

permeabilidade vascular, o recrutamento de leucócitos, notadamente os neutrófilos, e liberação de mediadores inflamatórios. Nossos dados indicaram que animais obesos ovariectomizados apresentaram aumento do extravasamento do corante azul de Evans no intestino em relação ao grupo Não OVx. Ainda, a IR intestinal elevou o extravasamento do corante no grupo IR OVx em relação ao grupo IR Não OVx em uma magnitude similar à observada no grupo Controle OVx. Estes dados são sugestivos que a redução dos HSF *per se* modifique a permeabilidade vascular intestinal. Existem dados sugerindo que a obesidade causa mudanças na permeabilidade do intestino e na microbiota e estas estão associadas com alterações na absorção de nitrogênio fornecida pela dieta (DO et al., 2014).

Além das alterações no extravasamento proteico avaliamos a relação peso úmido/seco de fragmentos do intestino para identificação do edema. Nossos dados sugeriram indução de edema após IR intestinal em relação aos grupos Controle, independentemente da ovariectomia. Observando dados anteriores do laboratório ainda não publicados, notamos que animais com ovários intactos submetidos à dieta convencional portanto não obesos apresentaram edema com 24 h de reperfusão intestinal em contraste aos animais OVx que não apresentaram nenhuma alteração. É possível portanto que os dados do presente estudo possam indicar uma interação da obesidade com a indução do edema em períodos mais precoces e que o edema diferentemente do aumento da permeabilidade vascular no intestino não sofre influência dos HSF na obesidade.

A presença de neutrófilos no intestino de animais obesos foi determinada por meio da atividade e da expressão da enzima MPO. Esta enzima é expressa por leucócitos, principalmente neutrófilos, tendo como função catalisar a reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons cloreto (Cl^-) para formar hipoclorito, que tem função bactericida (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; WEISS, 1989). No processo de restauração do fluxo sanguíneo, leucócitos são ativados e liberam várias enzimas que contribuem para a resposta inflamatória ocasionando danos ao tecido (FRANCISCHETTI et al., 2010). Em nosso modelo a remoção dos ovários dos animais obesos aumentou a atividade de MPO no intestino dos animais do grupo Controle e no grupo de animais após a IR intestinal. O mesmo foi observado entre os grupos IR *versus* Controle. Portanto, sugerimos a existência de influência dos HSF sobre as repercussões da IR intestinal na obesidade no contexto da inflamação intestinal. É interessante notar que a redução dos HSF pode tornar o organismo

mais sensível aos efeitos locais da IR intestinal. Ainda, existem estudos como os de Doucet et al. (2010); Sharawy et al. (2013) que evidenciaram a participação dos receptores α e β de estradiol no controle do recrutamento/adesão de neutrófilos na lesão do intestino após o choque hemorrágico ou sepse em modelo experimental. Essa participação protegeu a lesão intestinal ocasionada pelos modelos estudados. Dados anteriores não publicados do nosso laboratório mostraram que animais OVx sob dieta convencional desenvolveram aumento de recrutamento de neutrófilos no intestino 24 h após a reperfusão intestinal. Esse aumento não foi observado no grupo Não OVx também sob dieta convencional. Esses dados são sugestivos de uma interação dos HSF com a obesidade também no controle do recrutamento de neutrófilos causado pela IR intestinal.

Nossos dados de permeabilidade vascular intestinal e atividade de MPO obtidos em nosso modelo de IR intestinal se apresentam com magnitudes distintas se os ovários estão ou não preservados e que a obesidade parece ser um fator modulador da inflamação local gerada pela IR intestinal.

É sabido que a IR intestinal pode causar inflamação sistêmica. Portanto, dando sequência aos nossos estudos avaliamos alguns efeitos sistêmicos gerados pela IR intestinal frente à obesidade e à ovariectomia. Sabemos que os leucócitos representam uma das principais células que participam da resposta inflamatória. Dessa forma, avaliamos o número de leucócitos circulantes e presentes na medula óssea dos animais Não OVx e OVx submetidos ou não à IR intestinal.

Nossos resultados mostraram que o número de leucócitos circulantes nos animais obesos com ovários intactos ou removidos reduziu após a IR intestinal. É interessante observar que a porcentagem de redução dos leucócitos circulantes foi mais acentuada nos animais OVx após a IR intestinal. Constatamos em estudos anteriores, ainda não publicados, realizados em nosso laboratório em camundongos fêmeas com ovários intactos ou ovários removidos mantidos sob dieta convencional, que apenas no grupo OVx houve redução do número de leucócitos circulantes após 2 h de reperfusão intestinal enquanto no grupo Não OVx observamos após 24 h de reperfusão intestinal.

Vale destacar que a IR intestinal exacerbou a atividade da enzima MPO no intestino e pulmão (ver adiante) do grupo OVx. No contexto do tráfego de leucócitos, sugerimos que a medula óssea também possa estar mediando a variação do número de leucócitos circulantes na medida em que observamos aumento no

número de leucócitos coletados no lavado medular. Na análise diferencial dos leucócitos circulantes, mostramos que animais obesos sem ovários apresentaram aumento de linfócitos e granulócitos. Além disso, animais obesos mantidos com ovários intactos quando submetidos a IR intestinal, apresentaram redução dos valores de monócitos e granulócitos enquanto animais obesos OVx sob IR intestinal reduziram os de linfócitos, monócitos e granulócitos em relação aos seus respectivos grupos Controle. Animais obesos OVx após a IR intestinal aumentaram os valores de granulócitos em relação aos animais Não OVx sob IR intestinal. É interessante refletir sobre a elevação circulante de granulócitos. É possível que tais granulócitos sejam neutrófilos e nesse sentido estes dados podem justificar o aumento de atividade de MPO observado nos animais obesos OVx.

Os neutrófilos são as células que predominam nas primeiras horas da inflamação aguda. Evidências clínicas (NIJHUIS et al., 2009) indicaram aumento de neutrófilos em pacientes com obesidade grave. Ainda, de acordo com Foschini et al. (2008) adolescentes não obesos e obesos não apresentam diferenças na mensuração de leucócitos circulantes. Em contraste, Spite et al. (2011) observaram aumento de monócitos circulantes em animais obesos. Estudos conduzidos por Hierholzer et al. (1999) identificaram aumento de neutrófilos e monócitos após a IR intestinal no interior da camada muscular do intestino de ratos. Assim, embora não tenhamos avaliado a presença de monócitos no tecido, observamos redução do número de monócitos circulantes nos animais após a IR intestinal em relação ao seu grupo Controle (Não OVx e OVx). Isso poderia ser resultante da migração de monócitos para o tecido. Portanto, estudos que avaliem a presença de monócitos no tecido intestinal podem ser de interesse.

No geral os dados deste estudo identificaram que animais obesos com ovários removidos podem ser considerados sensíveis no sentido de elevar números de linfócitos e granulócitos circulantes. Estudos anteriores do nosso grupo revelaram participação dos HSF em eventos inflamatórios após a IR intestinal.

Neste estudo, também quantificamos o número de plaquetas e a concentração de hemoglobina. Nossos dados indicaram que a remoção dos ovários dos animais obesos aumentou o número de plaquetas em comparação aos animais obesos com ovários intactos e reduziu naquelas submetidas a IR intestinal em relação aos seus respectivos grupos Controle. É interessante notar que adolescentes obesos apresentam maior número de plaquetas circulantes assim,

admitindo-se que a leptina possa mediar o aumento de plaquetas favorecendo o risco de doenças cardiovasculares na obesidade (FOSCHINI et al., 2008). Embora não tenhamos investigado, é possível que a IR intestinal possa interferir com a atividade plaquetária e assim formar trombos justificando a redução destas células livres circulantes. No presente estudo, mostramos aumento de leptina sérica em animais obesos OVx e IR OVx. Todavia ainda não podemos estabelecer alguma correlação entre leptina e plaquetas em nosso modelo.

É interessante ressaltar que as plaquetas também participam do processo inflamatório, visto que por vezes os leucócitos, notadamente neutrófilos, se aderem às plaquetas para migrarem para um sítio inflamatório (PAGE; PITCHFORD, 2013; SREERAMKUMAR et al., 2014). Esses dados nos remetem ao fato das plaquetas estarem reduzidas na circulação após IR intestinal. Além do mais, Lapchak et al. (2012) mostraram redução do número de plaquetas circulantes após uma lesão fato que se alinha aos nossos achados. Ainda as plaquetas poderiam causar danos ao intestino e pulmão após IR intestinal em função de substâncias liberadas pela sua ativação, entre elas MIP-1α, IL-1β (ANFOSSI et al., 2010).

Ao avaliar a celularidade da medula óssea podemos inferir como a IR intestinal influencia o tráfego de células. Nossos dados revelaram aumento significativo de leucócitos na medula óssea do grupo de animais obesos OVx submetidos a IR intestinal. Considerando que a IR intestinal ocasiona inflamação sistêmica, estes dados podem sugerir um papel modulador dos HSF na quantificação de leucócitos presentes na medula óssea de animais obesos. Outro fato importante é que nos grupos Não OVx e IR Não OVx apresentaram semelhança nos dados. Num estudo conduzido por Sifri et al. (2007), utilizando modelo de trauma seguido de choque hemorrágico, esses autores sugerem que os HSF exercem efeito protetor nas células presentes na medula óssea. Assim nossos dados se alinham aos resultados obtidos pelos autores.

É interessante notar que apesar da alta celularidade na medula óssea nos animais OVx após a IR intestinal observamos redução dos leucócitos circulantes. Este evento pode ser explicado de duas maneiras. A primeira, é que células produzidas na medula óssea não são recrutadas para o sangue devido a alguma falha na migração destas células. Outra possibilidade, é que estas células são recrutadas do sangue para os tecidos lesionados pela IR intestinal. Além disso, a inflamação de baixo grau causada pela obesidade pode eventualmente estar

associada à mudança nas células da medula óssea após a IR intestinal. Estudos utilizando marcadores específicos de células progenitoras endoteliais na medula óssea ($CD45^-/CD34^+$) e de populações de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea ($CD133^+/VEGFR\text{-}2^+$), revelaram que ambas as populações apresentaram-se reduzidas. Isto pode indicar mudança no padrão de mobilização dessas células e de recrutamento para o tecido (MCGUIRE et al., 2011). Em um tecido isquêmico, as células progenitoras endoteliais favorecem a angiogênese auxiliando no reparo tecidual (NOLAN et al., 2007).

Como forma de avaliar se os leucócitos desses animais poderiam estar com sua atividade alterada, avaliamos a formação de complexos leucócitos/plaquetas. Quantificamos a formação de dois complexos (CD45+/CD41+ e CD11b+/CD162+). Estes complexos parecem ser essenciais para a migração de leucócitos para tecidos inflamados (GRANJA et al., 2015; ROMBOUTS et al., 2016).

Nossos dados mostraram que animais obesos OVx submetidos à IR intestinal tiveram redução significativa na formação de complexos CD45+/CD41+. A formação de plaquetas-leucócitos é utilizada como marcador de ativação de plaquetas (PEARSON et al., 2009). Nagasawa et al. (2013) avaliaram a agregação leucócitos-plaquetas em indivíduos saudáveis e 5% dos agregados foram expressos em diferentes leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos). Apesar de nossos dados não terem especificado o tipo de leucócito envolvido na formação dos complexos, nossos dados são interessantes, uma vez que mostram redução na formação dos complexos nos animais OVx submetidos a IR intestinal. É possível assim associar os HSF à IR intestinal e à obesidade.

O complexo dos ligantes de P-selectina (PSGL-1) em leucócitos ativos (CD11b+/CD162+), é importante porque sugere a propensão dos leucócitos de se aderirem ao endotélio e assim poderem migrar para os tecidos (SOO et al., 2009). Nossos dados revelaram que animais obesos OVx desenvolvem menor formação de complexos mais numa magnitude maior do que a observada em animais obesos com ovários intactos e submetidos a IR intestinal. Segundo Frenette et al. (2000) a interação da P-selectina com seu receptor PSGL-1 pode desencadear a interação de plaquetas com células endoteliais.

Estes nossos dados, associados aos nossos achados sobre a atividade de MPO no pulmão e intestino podem sugerir que na IR intestinal em animais obesos OVx células migradas para o tecido se encontram ativadas. Ainda esses complexos

podem representar algum grau da dinâmica do tráfego de células entre os compartimentos.

Em uma análise mais específica, avaliamos *in vitro*, a migração espontânea dos leucócitos presentes na medula óssea desses animais. Assim, pudemos inferir se a IR intestinal altera a atividade funcional e torna-los mais propensos a migrarem para o sistema circulatório e possivelmente para os tecidos afetados pela IR intestinal. Os dados indicaram que após a IR intestinal, a capacidade de migração *in vitro* dos leucócitos foi similar, contudo maior em relação aos grupos Controle (Não OVx e OVx). Portanto, independente da ovariectomia leucócitos mantem atividade migratória similar.

Sabendo que a obesidade causa inflamação crônica de baixo grau avaliamos alguns mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no soro dos animais obesos com ou sem ovários e submetidos à IR intestinal.

Os dados acerca de MIP-2 nos indicaram que a IR intestinal, causa elevação de MIP-2. Neste caso ter ou não ovários mostrou-se indiferente. Kapur et al. (2015), mostraram relação do aumento de MIP-2 com acúmulo de neutrófilos em um modelo de lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão de sangue. Podemos também relacionar em nosso estudo o aumento de MIP-2 e de MPO no intestino e pulmão dos animais após a IR intestinal. Nossos dados parecem se alinhar a estudos que avaliam o efeito dos HSF sobre a resposta inflamatória no pulmão induzida por LPS. Tais estudos mostraram alta concentração de MIP-2 em grupos com ovários intactos ou removidos sem que houvesse diferenças entre os grupos Não OVx e OVx (SPEYER et al., 2004).

Como mencionado anteriormente, nossos estudos investigaram a concentração sérica de leptina. Os dados gerados mostraram que a remoção dos ovários causou aumento deste hormônio e que a IR intestinal acentuou ainda mais a sua concentração no soro quando comparada à do grupo IR Não OVx. A leptina é um hormônio cuja concentração se eleva na obesidade. Produzida pelo tecido adiposo, atua como um sinalizador, informando ao sistema nervoso central sobre o controle da ingestão de alimentos e gasto energético. Não obstante defeitos na via de sinalização da leptina levam à obesidade. As concentrações séricas de leptina estão aumentadas em humanos e animais obesos (BRYSON et al., 1999; CONSIDINE; CARO, 1997; O'DONNELL et al., 1999).

A leptina também participa da resposta imune, estudos de Arnalich et al. (1999) mostraram uma relação entre taxa de mortalidade e níveis altos de leptina. Outros estudos mostraram alta concentração de leptina no soro de pacientes sobreviventes à sepse (TORPY; BORNSTEIN; CHROUSOS, 1998). Ainda dados mostram que a resistência aos efeitos da leptina protege camundongos da lesão pulmonar aguda causada pela hipóxia (BELLMEYER et al., 2007). Este hormônio pode induzir a produção de TNF-α, IL-1β, IL-1RA, IL-1R2 e IL-6 e também pode produzir espécies reativas de oxigênio (LAM; LU, 2007). Alguns autores mostraram efeito protetor da leptina em modelo IR intestinal (DENG et al., 2012, 2013; SARSU et al., 2015). Estudos não publicados conduzidos em nosso laboratório mostraram aumento da concentração de leptina no soro de animais Não OVx submetidos a IR intestinal e esta concentração exacerbou nos animais com ovários removidos. Apesar destas informações, nossos dados não permitem indicar se o aumento de leptina na OVx está associada a alguma falha na sinalização que contribua para a obesidade ou se sua elevação após a IR intestinal pode ser compreendida como uma ação pró/anti-inflamatória. Entretanto, parece existir uma relação entre a redução HSF e a IR intestinal na obesidade.

No presente estudo observamos que remoção dos ovários de animais obesos e submetidos à IR intestinal intensificou o aumento da concentração de leptina quantificado nos animais obesos somente ovariectomizados. Estes dados permitem inferir que a obesidade na vigência da redução dos HSF modula positivamente a geração de leptina. No contexto da IR intestinal existem estudos mostrando o papel da leptina na modulação da inflamação (SARSU et al., 2015).

Com respeito a IL-6 nossos dados mostraram sua redução nos animais obesos ovariectomizados sugerindo que os HSF medeiam positivamente a geração desta interleucina nos animais obesos. Animais OVx submetidos a IR intestinal elevaram a concentração sérica de IL-6 em relação ao seu grupo Controle OVx. Talvez na obesidade a inflamação após a IR intestinal se sobreponha aos efeitos dos hormônios sexuais. Estudos experimentais e clínicos revelaram que diante da associação obesidade e lesão pulmonar aguda ocorre diminuição de citocinas pró-inflamatórias (KORDONOWY et al., 2012; STAPLETON et al., 2010). Além disso, existem dados mostrando a participação da IL-6 na obesidade (SIPPEL et al., 2014), visto que a mesma também é produzida pelo tecido adiposo.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e nossos dados não apresentaram diferenças entre os animais obesos com ovários intactos ou removidos. Porém, os animais com ovários intactos e removidos após a IR intestinal tiveram aumento significativo de IL-10. Portanto, na vigência da obesidade a geração de IL-10 parece não ser modulada pelos HSF. Num processo inflamatório há diminuição dos níveis desta interleucina, o que não foi observado neste estudo. Como sugestão consideramos que sua elevação pode ocorrer como um balanço modulador da inflamação. Apesar de seu reconhecido efeito anti-inflamatório, existem estudos que sugerem um efeito pró-inflamatório da IL-10 na IR intestinal (NÜSSLER et al., 2003) Em outros estudos realizados em camundongos os níveis séricos de IL-10 após IR intestinal aumentaram e segundo os autores a elevação de IL-10 se associou a um efeito anti-inflamatório de IL-10 (TONG et al., 2017).

A IL-17A apresenta perfil pró-inflamatório, é uma citocina produzida por células T e pode auxiliar na expressão de TNF-α, IL-6 e IL-1β (MOSELEY et al., 2003). Nossos dados mostrando aumento dos níveis circulantes de IL-17A em animais obesos ovariectomizados e após a IR intestinal sugerem que na obesidade a redução dos HSF parece ser evento modulador. Adicionalmente, relatos de estudo sobre osteoporose em animais OVx indica aumento dos níveis circulantes de IL-17 (TYAGI et al., 2012). Outro fator importante a ser discutido é o papel da IL-17 na obesidade cujo esta concentração está elevada em animais (WINER et al., 2009) e humanos (SUMARAC-DUMANOVIC et al., 2009).

Os níveis séricos da quimiocina KC, aumentaram pela remoção dos ovários e pela indução da IR intestinal. Observamos que a remoção dos ovários elevou ainda mais os níveis séricos de KC nos obesos após a IR intestinal. Portanto, sugerimos influencia da obesidade e dos HSF no controle de KC circulante após a IR intestinal. Outro parâmetro de avaliação que mostramos neste mesmo perfil foi o estudo realizado sobre a enzima mieloperoxidase em homogenato de intestino e pulmão e na imunohistoquímica da enzima MPO no pulmão. Como já mencionado a MPO é uma enzima abundante nos neutrófilos. O KC é uma quimiocina que participa do recrutamento de neutrófilos. Estudos realizados por Abu-Taha et al. (2009) mostraram em modelo de inflamação causada por lesões vasculares que a remoção dos ovários se associa com aumento sérico de CINC/KC, MCP-1 e MIP-1α e adesão leucocitária. Em estudo comparativo entre camundongos neonatos e adultos (C57BL/6), observou-se que a inflamação sistêmica causada pela IR intestinal foi

mais acentuada nos camundongos neonatos com aumento de CXCL1/KC (YU et al., 2015). A respeito dos nossos estudos podemos inferir que a baixa de hormônio associada à IR intestinal modula a inflamação sistêmica e assim pode intensificar o processo inflamatório.

Continuando a avaliação sérica de mediadores inflamatórios, medimos a concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) o qual aumentou com a remoção dos ovários e se manteve semelhante após a IR intestinal. Contudo no grupo IR Não OVx os valores de VEGF aumentaram em comparação ao grupo Controle Não OVx. Em modelo experimental de IR intestinal, animais tratados com célula de estroma mesenquimal derivado da medula óssea de humanos, que apresentam propriedade imunomoduladora, observou-se níveis elevados de VEGF, IL-6 e IL-8 (MARKEL et al., 2015). Nossos estudos podem sugerir algum grau de interação da redução dos HSF e obesidade na geração de VEGF que não influencia sua expressão adicional após a IR intestinal.

A respeito da resistina, uma proteína secretada por adipócitos, monócitos e macrófagos, esta é associada à resistência à insulina na obesidade e apresenta propriedades pró-inflamatórias como o TNF-α e a IL-6 (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SILVEIRA et al., 2009). Em nossa análise, a ovariectomia em animais obesos e sua associação com a IR intestinal reduziu os valores circulantes de resistina. Iwasa et al. (2015) descreveram que a ovariectomia elevou os níveis séricos de resistina, entretanto não houve diferença após a administração da endotoxina LPS. Estudos clínicos mostraram concentrações circulantes aumentadas de resistina em mulheres obesas na pós-menopausa e em comparação as mulheres obesas na pré-menopausa (CHU et al., 2006). Ainda dados clínicos não detectaram diferenças séricas de resistina em mulheres que se submeteram a remoção dos ovários tratadas ou não com estradiol e também em mulheres na pós-menopausa tratadas com estradiol (CHALVATZAS et al., 2009).

Para finalizar nosso estudo de inflamação sistêmica, avaliamos os níveis séricos de fosfatase alcalina e LDH. Estes marcadores são encontrados em vários tecidos e níveis elevados indicam lesão tecidual. O LDH é uma enzima que converte o piruvato e o lactato e tem como produto final a glicose. A avaliação destes biomarcadores da inflamação é descrito na IR intestinal (THOMPSON; BRAGG; WEST, 1990). Nossos estudos mostraram que a fosfatase alcalina aumentou com a remoção dos ovários e se manteve com a IR intestinal. É interessante notar que a IR

intestinal em animais obesos com ovários intactos não alterou os valores da fosfatase alcalina, o que poderia sugerir efeito protetor dos HSF. De acordo com Fantozzi, (2013) após a IR intestinal animais ovariectomizados apresentaram valores circulantes elevados de fosfatase alcalina em comparação com animais não ovariectomizados. Nota-se também que não houve diferença entre os animais não ovariectomizados. Herek et al. (2003) relataram que a concentração de fosfatase alcaliana reduziu no início da IR intestinal. Em outro relato também observou-se redução de fosfatase alcalina no soro após a IR intestinal (THOMPSON; BRAGG; WEST, 1990).

A lactato desidrogenase (LDH) também é um marcador inflamatório que está relacionado com a IR intestinal (VAN NOORD et al., 2011). No presente estudo relatamos aumento de LDH nos grupos Não OVx e OVx após a IR intestinal em relação aos seus controles. Dados similares foram descritos por (FANTOZZI, 2013). No início da IR intestinal Herek et al. (2003) relataram aumento dos níveis séricos de LDH. Segundo Cavriani et al. (2005); Guzmán-De La Garza et al. (2013); Sözen et al. (2011) a lesão causada pela IR elevou a geração de LDH na circulação. Portanto nossos estudos se harmonizam com dados acerca da IR intestinal como geradora de LDH circulante.

Após avaliarmos alguns aspectos da inflamação local e sistêmica induzidos pela IR intestinal, avaliamos a inflamação pulmonar. Primeiramente quantificamos o corante azul de Evans extravasado para o tecido pulmonar e a atividade de MPO no pulmão. Está bem estabelecido que o pulmão seja um dos principais órgãos afetados pela IR intestinal (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2014; SOARES et al., 2010; THOMAS; KARNIK; BALASUBRAMANIAN, 2002).

Nossos dados mostraram que em animais obesos a remoção dos ovários *per se* aumentou a permeabilidade vascular no pulmão. Após este grupo ser submetido a IR intestinal observamos redução do extravasamento do corante azul de Evans ao ser comparado ao seu grupo Controle OVx. Breithaupt-Faloppa et al. (2013), mostraram que o tratamento de ratas OVx com estradiol reduziu o extravasamento do corante azul Evans no pulmão após a IR intestinal. Esses dados podem sugerir que a obesidade interage com os HSF de maneira que na vigência da IR intestinal o aumento de extravasamento proteico no pulmão é atenuado pela falta dos HSF.

Além de avaliarmos a permeabilidade vascular por meio do extravasamento do corante azul de Evans no pulmão, também avaliamos a relação peso úmido/seco

no pulmão para observar o edema. Notamos que a remoção dos ovários em animais obesos reduziu a relação peso úmido/seco. Dados anteriores do laboratório não publicados, mostraram que a permeabilidade vascular causada pelo extravasamento do corante azul de Evans reduziu após 24h de reperfusão e a relação peso úmido/seco no pulmão aumentou após 24h de reperfusão nos animais mantidos sob dieta convencional. Aqui observamos redução da relação peso úmido/seco após 2 h de reperfusão. No geral esses dados podem indicar que a obesidade e os HSF tendem a modular negativamente a formação de edema pulmonar.

A remoção dos ovários *per se* aumentou a atividade e expressão de MPO no pulmão. A IR intestinal (IR Não OVx) aumentou MPO no pulmão em relação ao grupo Não OVx e a IR OVx intensificou a atividade da enzima MPO em comparação ao grupo Controle OVx e ao grupo IR Não OVx em ambos os parâmetros de análise. Kordonowy et al. (2012) relataram que a lesão pulmonar causada por LPS em animais obesos apresenta menor intensidade de recrutamento de neutrófilos. Estudos conduzidos por Breithaupt-Faloppa et al. (2013) também mostraram que ratas OVx tratadas com estradiol não alteraram a atividade de MPO no pulmão após a IR intestinal porém em animais não obesos. Carvalho et al. (2017) avaliaram a atividade da enzima MPO no pulmão de camundongos submetidos a IR intestinal e tratados com terapia a laser. A IR intestinal exacerbou a enzima MPO no pulmão e o tratamento atenuou este efeito. Dados ainda não publicados do nosso laboratório mostraram que animais mantidos sob dieta convencional (IR Não OVx) apresentaram a atividade da enzima MPO aumentada em 2 h de reperfusão intestinal e a IR OVx aumentou em 24 h de reperfusão intestinal. Adicionalmente, a expressão de MPO em animais sob dieta convencional aumentou com a IR intestinal. Todavia nos animais sob dieta hiperlipídica a expressão de MPO foi mais acentuada. Nestes parâmetros, a ovariectomia e a IR intestinal aumentaram a atividade da enzima MPO em animais obesos. Estudos em andamento do laboratório sugerem que animais obesos apresentam resposta de recrutamento de neutrófilos mais tardia após a IR intestinal. Considerando esses dados, no presente trabalho mostramos que a remoção dos ovários aumenta o recrutamento de leucócitos, notadamente neutrófilos, para o pulmão de animais obesos e que a IR intestinal pode potencializar esse efeito.

De maneira a investigar o quanto a IR intestinal afeta o pulmão dos animais obesos, avaliamos a geração de mediadores pelo pulmão. Os dados obtidos

revelaram que o pulmão de animais OVx submetidos a IR intestinal, elevou a geração de VEGF e IL-1β e que o VEGF pode estar sendo modulado pela OVx. A remoção dos ovários *per se* reduziu leptina e IL-17A, porém após a IR intestinal não houve mudanças dos níveis destes mediadores.

Dados anteriores do nosso laboratório mostraram aumento de mediadores inflamatórios, assim como IL-1β, IL-10 e IL-6 no pulmão após insulto isquêmico seguido de reperfusão em ratos machos (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2012). É de interesse salientar o papel do VEGF na permeabilidade vascular (KOH et al., 2007) bem como seu efeito anti-inflamatório (OSTERMAN et al., 2015). No presente estudo os dados de VEGF no tecido pulmonar poderia estar associado com a diminuição da permeabilidade vascular no grupo de fêmeas obesas sem ovários submetidas a IR intestinal ou que este mediador possa contribuir para o controle negativo de alguns mediadores pró-inflamatório ou recrutamento de neutrófilos.

Ubags et al. (2014) mostraram que os níveis de leptina no pulmão de humanos e de murinos com pneumonia induzida por vírus ou bactérias estão elevados. Em nosso modelo de estudo observamos redução de leptina com a remoção dos ovários, todavia não houve alteração após a IR intestinal.

Prosseguindo as análises de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar, notamos que KC e IL-6 reduziram com a remoção dos ovários mas a IR intestinal aumentou os seus níveis pulmonares nesses animais. O KC exerce efeito positivo sobre o recrutamento de neutrófilos (KORDONOWY et al., 2012). No contexto do nosso estudo é interessante que o estrogênio em modelo de lesão por queimadura e infecção reduziu a concentração de KC no pulmão de animais ovariectomizados (PLACKETT et al., 2016). Por outro lado, em lesão pulmonar causada por instilação de LPS em camundongos ovariectomizados observou-se aumento desta quimiocina em lavado broncoalveolar nos animais com ovários intactos e removidos (SPEYER et al., 2004). Além disso, Speyer et al. (2004) observaram os níveis séricos de IL-6 e animais ovariectomizados e instilados com LPS tiveram maior concentração desta citocina. De acordo com Kordonowy et al. (2012) em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em animais obesos foi observado redução de neutrófilos na medula óssea em resposta ao KC e níveis plasmáticos reduzidos de IL-6.

A remoção dos ovários elevou os níveis de IL-10. Com a IR intestinal o valores foram reduzidos em comparação ao grupo Controle. Como já mencionado a IL-10 possui propriedades anti-inflmatórias. Em modelo de inflamação alérgica a

concentração de IL-10 elevou no pulmão de ratos (OLIVEIRA et al., 2011). Outro modelo de estudo relatou que a IL-10 diminuiu a resposta inflamatória e a mortalidade em peritonite séptica em estudo experimental de ligação do ceco e punção (CLP). Notaram após 1h de indução do CLP a expressão de IL-10 no fígado e após 2 h no pulmão e baço (VAN DER POLL et al., 1995). Visto a ação anti-inflamatória da IL-10, nossos dados podem sugerir que animais obesos quando apresentam redução dos HSF apresentam maior propensão a inflamação a qual pode ser contrabalanceada pelo aumento da IL-10. Eventos similares poderiam ocorrer nos animais obesos OVx após a IR intestinal.

Referente a IL-5, mostramos que a ovariectomia aumentou a sua concentração no pulmão, mas não alterou após a IR intestinal neste grupo. Todavia elevou após a IR intestinal quando os ovários estavam mantidos. Esta citocina é produzida por linfócitos T e atua como fator de crescimento e diferenciação de eosinófilos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). É interessante que a IL-5 reduziu em homogenato de pulmão de animais obesos desafiados com alérgeno em comparação aos animais alérgicos não obesos (GE et al., 2013). Considerando que nosso modelo de IR intestinal é não alérgico, então nossos dados podem indicar interação da obesidade com os HSF. Na presença de IR intestinal esta interação se manifesta de forma a não modificar a geração de IL-5 na ausência dos ovários.

É importante mencionar que dados prévios, ainda não publicados, do laboratório indicaram que a obesidade *per se* elevou os níveis de KC e MIP-2 e reduziu a IL-10, IL-17A, VEGF e leptina no pulmão ao ser comparado com animais sob dieta convencional. Após a IR intestinal o mesmo evento se manteve. Assim é possível que a obesidade eleve o perfil de mediadores inflamatórios no pulmão para valores que a IR intestinal não seja efetiva em modificar. Todavia a remoção dos ovários pode exercer algum grau de controle.

Em relação aos mediadores gerados no tecido pulmonar nossos dados permitem sugerir que, os HSF parecem desempenhar papel modulador pelo menos em parte em resposta à obesidade e a inflamação pulmonar causada pela IR intestinal.

Seguindo nossos estudos e os dados indicando aumento de células no tecido pulmonar fomos avaliar o infiltrado de células e hemorragia em cortes de tecido pulmonar. Nossos achados mostraram infiltrado de células no pulmão de animais

obesos o qual a ovariectomia e a IR intestinal no grupo IR Não OVx elevou sua porcentagem.

Além disso, a porcentagem de hemácias também aumentou de maneira significativa no grupo ovariectomizados. Interessante que após a IR intestinal os valores foram reduzidos nos animais IR OVx. Além disso, a IR intestinal no grupo IR Não OVx elevou em relação ao seu controle. (TEKE et al., 2008) propuseram avaliar um agente antioxidante e anti-inflamatório, cujo nome, Tempol, um nitróxido de piperidina e permeável a célula. Em modelo experimental de IR intestinal o tratamento com o Tempol atenuou o infiltrado de células e a hemorragia no parênquima pulmonar. Estes nossos resultados devem ser vistos com cautela pois a redução dos níveis de hemorragia no grupo IR OVx não foi esperado. Visto que a redução do estradiol pode fragilizar a vasculatura, a expectativa seria, salvo a geração de um controle endógeno, de um grau de hemorragia similar ao observado no OVx ou exacerbado em relação ao grupo IR intestinal com ovários intactos. Se estes resultados decorrem de influência da obesidade, estudos sobre a microcirculação de animais poderão ser de interesse.

Podemos correlacionar a elevação de infiltrado de células no pulmão com o aumento da atividade e expressão de MPO no pulmão. Embora não tenhamos diferenciado as células no infiltrado pulmonar, podemos sugerir o aumento de neutrófilos pois observamos aumento da atividade da enzima MPO.

Foi de interesse neste estudo avaliar o papel do óxido nítrico no tecido pulmonar após a IR intestinal. Visto que é descrito na literatura que a IR intestinal desencadeia a liberação deste mediador (CAVRIANI et al., 2004; CAVRIANI et al., 2007; TAVAF-MOTAMEN, et al 1998 TURNAGE et al., 1998). Mensuramos os níveis de nitrito em explante pulmonar e verificamos que a ovariectomia aumentou a concentração de NO_2^- no pulmão e a IR intestinal potencializou este efeito no grupo de animais sem ovários. Em contraste os resultados apresentados por Fantozzi, (2013) demonstraram aumento da geração de nitritos em explante de tecido pulmonar em ratas não ovariectomizados (Não OVx) e submetidas a IR intestinal. Além disso, Fantozzi, (2013) evidenciou que no grupo OVx submetidos a IR intestinal o tratamento dos animais com estradiol elevou a geração de nitritos. Em outro estudo interessante realizado por Breithaupt-Faloppa et al. (2009), mostrou a participação do NO no aumento da permeabilidade vascular no pulmão de ratos.

Existem diversos estudos indicando participação da iNOS e da eNOS na inflamação pulmonar causada pela IR intestinal (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2013; CUZZOCREA et al., 2002; DAVID et al., 2000). Nesta fase de estudo avaliamos se haveria alguma interferência da obesidade e dos HSF na expressão dessas isoformas de NO no pulmão de camundongos submetidos a IR intestinal. Observamos que a remoção dos ovários *per se* aumentou a expressão de iNOS no pulmão e após a IR intestinal esta expressão se elevou em comparação ao grupo IR Não OVx. É importante relatar que a expressão da iNOS quantificada no pulmão dos animais obesos foi maior do que a observada em estudos prévios realizados em pulmão de animais não obesos. Além disso, após a IR intestinal houve aumento da expressão de iNOS no grupo de animais de dieta convencional após o período de 2 h de reperfusão e nos animais de dieta hiperlipídica após 24 h de reperfusão ao ser comparado com seus respectivos grupos controle. De acordo com David et al. (2000) após o período de reperfusão intestinal há uma redução da óxido nítrico sintase constitutiva e aumento da óxido nítrico sintase induzida o que poderia mediar lesões teciduais. Nossos resultados são sugestivos de que na obesidade a remoção dos ovários poderia contribuir para elevação da expressão de iNOS mas a IR intestinal não interfere com a expressão adicional desta enzima.

A seguir quantificamos a expressão pulmonar da eNOS. Nossos resultados revelaram que a IR intestinal de forma independente da presença ou ausência dos ovários reduziu a expressão de eNOS. Embora não tenhamos notado que os HSF apresente participação na expressão desta enzima, existe estudo que descreve a influência do mesmo. De acordo com Breithaupt-Faloppa et al. (2013) a expressão de eNOS no pulmão encontrou-se reduzida após a IR intestinal em animais ovarictomizados quando comparado aos animais não ovarictomizados. Todavia o grupo tratado com estradiol e submetido a IR intestinal impediu a redução da proteína eNOS. Logo, este estudo mostra o efeito protetor dos HSF. Estudos a respeito da eNOS em animais não obesos encontra-se em andamento. De forma hipotética, considerando os efeitos da eNOS na manutenção da homeostasia e os mecanismos inflamatórios desencadeados pela iNOS, é possível sugerir que nossos resultados se harmonizam com a maior probabilidade de lesão inflamatória no pulmão dos animais obesos com ovários removidos após a IR intestinal.

Como o objeto de estudo são exclusivamente animais obesos e sabendo que o tecido adiposo apresenta funções endócrinas, fomos averiguar a produção de

alguns mediadores inflamatórios em sobrenadante de tecido adiposo (explante) de animais obesos com ovários intactos ou removidos e submetidos a IR intestinal. Acreditamos que estes dados gerem justificativas de por que os animais obesos respondem de maneira diferente a um insulto inflamatório. As análises dos dados nos indicaram que KC e resistina tiveram perfis de aumento e redução similares. A remoção dos ovários aumentou de maneira significativa a geração desses mediadores e a IR intestinal nos animais com ovários intactos reduziu, enquanto o grupo IR OVx potencializou a geração de KC e da resistina.

Com respeito à concentração de MIP-2 e IL-6, observamos que a remoção dos ovários *per se* aumentou a produção desses mediadores. O mesmo ocorreu após a IR intestinal (IR OVx).

Os dados relativos à VEGF, IL-10 e IL-17A, indicaram que a IR intestinal no grupo IR Não OVx aumentou a produção destes mediadores. Por outro lado o tecido adiposo no grupo IR OVx não gerou quantidade apreciáveis desses mediadores.

Quanto à concentração de leptina, foi observado que a remoção dos ovários provocou aumento da sua produção no tecido adiposo e a IR intestinal se sobrepôs a este efeito aumentando ainda mais seus valores. Mesmo com a presença dos ovários a IR intestinal aumentou a síntese de leptina.

Nossos estudos indicam que a ovariectomia em animais obesos *per se* interferiu na geração de alguns mediadores inflamatórios tais como KC, MIP-2, IL-6, leptina e resistina no explante de tecido adiposo. Estudos experimentais e clínicos revelaram que os hormônios sexuais desempenham uma importante função na regulação do metabolismo de adipócitos (LIZCANO; GUZMÁN, 2014). Os adipócitos podem aumentar as concentrações de IL-6, TNF-α e resistina na obesidade e o tratamento com estradiol em animais ovariectomizados reduz os níveis destes mediadores (LIZCANO; GUZMÁN, 2014; STEPPAN et al., 2001; STUBBINS et al., 2012). A obesidade determina um estado infamatório com elevação da produção de IL-6, TNF-α, resistina e leptina e redução de adiponectina o que leva ao desencadeamento de disfunção metabólica (HARWOOD, 2012). As quais podem interferir com nosso modelo de IR intestinal.

Segundo Neels et al. (2009) relataram que a expressão da quimiocina KC foi elevada no soro e tecido adiposo de animais obesos. Vale ressaltar que evidências experimentais demonstraram em camundongos que a remoção dos ovários aumentou de maneira significativa a expressão de TNF-α, IL-1β, MIP-2 e IL-6 em

órgãos metabólicos como o fígado e o tecido adiposo sugerindo a ação anti-inflamatória dos HSF (BENEDUSI et al., 2015).

Quanto a concentração de VEGF, IL-10 e IL-17A estes foram aumentados após a IR intestinal em animais obesos com ovários intactos em comparação ao grupo Controle Não OVx e ao grupo IR OVx. Uma das ações do VEGF é atuar na produção da angiogênese no tecido adiposo (LEITE et al., 2009; HARWOOD, 2012). Estudos apontam que a redução de IL-10 promove lesões de asterosclerose, uma doença vascular associada à obesidade (SIPPEL et al., 2014). Nossos achados mostraram aumento de IL-10 após IR intestinal no tecido adiposo de animais com ovários intactos o que indica um papel modulador desta citocina. Todavia, isso não ocorreu para o grupo com ovários removidos. É interessante notar que a IL-10 pode inibir a síntese de IL-6, IL-1β e TNF-α (SIPPEL et al., 2014).

A respeito da interleucina IL-17A, Qu et al. (2016) detectaram que a concentração desta interleucina está exacerbada no tecido adiposo de animais obesos e que o tratamento com a IL-17A leva ao aumento da expressão gênica inflamatória e metabólica no tecido adiposo de camundongos machos magros e obesos. Por outro lado, estudos experimentais e clínicos avaliaram a concentração de IL-17A no plasma de adolescentes com sobrepeso e de camundongos obesos e evidenciaram níveis baixos desta citocina (JUNG et al., 2016). Em nosso modelo observamos aumento da IL-17A nos animais obesos com ovários intactos submetidos a IR intestinal e a redução da IL-17A nos animais obesos com ovários removidos o que implica que a redução dos HSF possa ter interferido na produção desta citocina no tecido adiposo durante o processo inflamatório ocasionado pela IR intestinal. Já em nível circulante observamos aumento significante desta citocina no grupo obeso sem ovários e também após a IR intestinal neste mesmo grupo, embora os níveis não tenham apresentados valores tão elevados em comparação ao grupo com ovários intactos.

Estudos prévios do nosso laboratório realizado em tecido adiposo de animais obesos e não obesos mostraram redução dos níveis de IL-6, IL-10, IL-17A e VEGF e aumento de leptina no grupo obeso. Após a IR intestinal observamos o mesmo evento, além disso, também notamos redução de KC, MIP-2 e resistina nos animais obesos em comparação aos animais não obesos.

A interpretação de que dispomos no momento é considerar que a obesidade e os HSF participam da modulação da atividade funcional do tecido adiposo. Apesar

do mencionado é interessante considerar a interferência da IR intestinal sobre a geração desses mediadores pelo tecido adiposo. Nós não dispomos de dados que possam justificar tal interferência visto que a obesidade e a redução dos hormônios neste modelo pode ser consideradas como eventos crônicos enquanto que a IR intestinal sabidamente é um processo agudo.

Tomados em conjunto, nossos estudos sugerem que em animais obesos a inflamação causada pela IR intestinal pode ser acentuada pela remoção dos ovários. Neste sentido, poderia ser de interesse, avaliar um tratamento prolongado dos animais com reposição de estradiol.

7 CONCLUSÃO

Os dados gerados neste estudo permitem concluir que:

Camundongos fêmeas C57BL/6 submetidas a dieta hiperlipídica por 9 semanas ficaram obesas e, a remoção dos ovários reduziu, após o mesmo período, os níveis séricos de estradiol. Além disso, a remoção dos ovários acentuou o ganho de peso dos animais bem como os níveis circulantes de colesterol e triglicérides em comparação aos observado em animais com ovários intactos. É possivel portanto que a remoção dos ovários exacerba o quadro de obesidade.

Os hormônios sexuais femininos e a obesidade parecem modular a permeabilidade vascular e o recrutamento de neutrófilos intestinal e este evento ocorre de forma semelhante após a IR intestinal.

O perfil de leucócitos circulantes nos animais sob IR intestinal também parece ser controlado pelos hormônios sexuais femininos enquanto o perfil de linfócitos, granulócitos e plaquetas parecem estar sob influência conjunta da obesidade e dos hormônios sexuais femininos.

O organismo pode ter se tornado mais sensível a estímulos lesivos visto o aumento de fosfatase alcalina causado pela remoção dos ovários. Além disso, a remoção dos ovários aumentou os níveis circulantes de leptina, IL-17A, KC e VEGF e reduziu aqueles de IL-6 e resistina. A IR intestinal aumentou a concentração de leptina, IL-17A e KC a qual parece ser controlada pela interação dos hormônios sexuais femininos/obesidade.

A remoção dos ovários interfere com a formação de complexos de plaqueta com leucócitos podendo reduzir ($CD45^+/CD41^+$) ou aumentar ($CD11^+/CD162^+$) após a IR intestinal. Com isto, a redução do complexo leucócitos plaquetas após a IR intestinal nos sugere que estas células estão sendo recrutadas para o stítio inflamatório, e pode justificar o aumento da atividade de MPO intestinal, pulmonar e o aumento do infiltrado de células no pulmão.

A permeabilidade vascular pulmonar, mas não a formação de edema parece depender dos hormônios sexuais femininos na obesidade. Ainda, sugere-se que no tecido pulmonar, o recrutamento de neutrófilos está sob controle da interação obesidade/hormônios sexuais femininos e de forma semelhante após a IR intestinal.

A redução da concentração de IL-17A, KC, IL-6 e leptina bem como o aumento da geração de IL5 e IL-10 no tecido pulmonar de animais com ovários removidos parece ser mediada pelos HSF em animais obesos. A IR intestinal aumentou os níveis de VEGF e IL-1β no pulmão sugerindo uma interação da obesidade com os hormônios sexuais femininos.

A geração de nitrito eleva em animais obesos sem ovários e pode ser modulada pela atividade de iNOS. Após a IR intestinal este evento ocorreu de forma similar.

A IR intestinal em animais com os ovários removidos manteve a atividade de iNOS elevada mas reduziu a atividade de eNOS, eventos que podem contribuir para a inflamação pulmonar nos animais obesos.

O tecido adiposo de animais obesos desprovidos de ovários aumentou a geração de KC, MIP-2, IL-6, leptina e resistina, sendo que o mesmo ocorreu após a IR intestinal.

Os dados sugerem interação da obesidade com os hormônios sexuais femininos a qual pode modular a sensibilidde aos efeitos locais, sistêmicos e pulmonar decorrentre da IR intestinal.

REFERÊNCIAS*

ABALLAY, L. R. et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 3, p. 168–179, mar. 2013.

ABU-TAHA, M. et al. Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 1393–1402, 15 jul. 2009.

ACCETTURI, B. G. **Avaliação do papel dos hormônios sexuais femininos em modelo murino de asma experimental.** 2014. 111f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

AHIMA, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 18 jul. 1996.

AINSLIE, D. A. et al. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 438–442, fev. 2000.

ALAM, I.; NG, T. P.; LARBI, A. Does Inflammation Determine Whether Obesity Is Metabolically Healthy or Unhealthy? The Aging Perspective. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

ALTIN, J. G.; SLOAN, E. K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, n. 5, p. 430–445, out. 1997.

AN, S. et al. Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-α and activation of Bid pathway. **Apoptosis**, v. 12, n. 11, p. 1989–2001, 28 set. 2007.

ANFOSSI, G. et al. Adipocytokines in atherothrombosis: focus on platelets and vascular smooth muscle cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 174341, 2010.

ANGELE, M. K.; FRANTZ, M. C.; CHAUDRY, I. H. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 61, n. 5, p. 479–488, out. 2006.

ARAÚJO, E. P.; MORAES, J. C. Adipocitocinas e Controle da Ingestão Alimentar. CINTRA, D. E. ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular.** Editora: Sarvier. Cap.7 pág.126, 2011.

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

ARNALICH, F. et al. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survivalin sepsis and septic shock. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 3, p. 908–911, set. 1999.

ARSLAN, N.; ERDUR, B.; AYDIN, A. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian Pediatrics**, v. 47, n. 10, p. 829–839, out. 2010.

BARON, P. et al. Gut Failure and Translocation Following Burn and Sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 57, n. 1, p. 197–204, jul. 1994.

BASTARD, J.-P. et al. Point-counterpoint: Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 2, p. 821–825, fev. 2007.

BECKERS, P. A. J. et al. Lung ischemia reperfusion injury: the therapeutic role of dipeptidyl peptidase 4 inhibition. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 6, p. 129–129, mar. 2017.

BELLMEYER, A. et al. Leptin resistance protects mice from hyperoxia-induced acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 6, p. 587–594, 15 mar. 2007.

BENEDUSI, V. et al. Ovariectomy shortens the life span of female mice. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10801–10811, 10 maio 2015.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C. et al. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne il-6 after an intestinal ischemic insult. **Shock**, v. 32, n. 1, p. 55–61, jul. 2009.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C. et al. Intestinal lymph-borne factors induce lung release of inflammatory mediators and expression of adhesion molecules after an intestinal ischemic insult. **The Journal of Surgical Research**, v. 176, n. 1, p. 195–201, jul. 2012.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C. et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. **Shock**, v. 40, n. 3, p. 203–209, set. 2013.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C. et al. Acute Effects of Estradiol on Lung Inflammation Due to Intestinal Ischemic Insult in Male Rats. **Shock**, v. 41, n. 3, p. 208–213, mar. 2014.

BRYSON, J. M. et al. Plasma insulin rise precedes rise in ob mRNA expression and plasma leptin in gold thioglucose-obese mice. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 2 Pt 1, p.358-364, fev. 1999.

CAMPOS, D. H. S. DE et al. Obesity Preserves Myocardial Function During Blockade of the Glycolytic Pathway. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 4, p. 330–337, 2014.

CARR, M. C. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404–2411, jun. 2003.

CARVALHO-FILHO, et al. Obesidade e Diabetes da Origem ao Caos. CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular.** Editora: Sarvier, Cap.1 pág.3, 2011.

CARVALHO, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v.55, p.2823-2834, 2012.

CARVALHO, J. L. et al. Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after i-I/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 2, p. 305–315, 6 fev. 2017.

CAVRIANI, G. et al. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **European Journal of Pharmacology**, v. 494, n. 2–3, p. 241–249, 28 jun. 2004.

CAVRIANI, G. et al. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Shock**, v. 23, n. 4, p. 330–336, abr. 2005.

CAVRIANI, G. et al. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of il-1β and il-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor α and nitric oxide. **Shock**, v. 27, n. 2, p. 209–213, fev. 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHALVATZAS, N. et al. Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 4, p. 1189–1194, abr. 2009.

CHAN, J. L. et al. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1409–1421, mai. 2003.

CHEN, L.-W. et al. The two faces of IKK and NF-κB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 575–581, mai. 2003.

CHEN, L.-W. et al. TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through tnf-α signaling. **Shock**, v. 30, n. 5, p. 563–570, nov. 2008.

CHU, M. C. et al. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 1, p. 100–104, jan. 2006.

CLEGG, D. J. Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 26, n. 12, p. 1957–1960, dez. 2012.

CONSIDINE, R. V; CARO, J. F. Leptin and the regulation of body weight. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 11, p. 1255–1272, nov. 1997.

COOPER, D. et al. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, n. 6, 2003.

CORREIA-JÚNIOR, A.L. **Efeitos da associação da ovariectomia com uma dieta hiperlipídica sobre alterações no metabolismo lipídico, remodelamento e redistribuição do tecido adiposo e sobre os marcadores inflamatórios em camundongos C57BL/6.** 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CUZZOCREA, S. et al. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. **Shock**, v. 18, n. 2, p. 169–176, ago. 2002.

DAVID, et al. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 89, n. 1, p. 13-19, mar. 2000.

DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. 440-448, ago. 2010.

DE OLIVEIRA, A. P. L. et al. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 293, n. 3, p. 1120-1128, set. 2007.

DEITCH, E. A. et al. Hormonally active women tolerate shock-trauma better than do men: a prospective study of over 4000 trauma patients. **Annals of Surgery**, v. 246, n. 3, p. 447-453, set. 2007.

DENG, Z.-H. et al. Leptin relieves intestinal ischemia/reperfusion injury by promoting ERK1/2 phosphorylation and the NO signaling pathway. **The Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 72, n. 1, p. 143–149, jan. 2012.

DENG, Z.-H. et al. Localized leptin release may be an important mechanism of curcumin action after acute ischemic injuries. **The Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 74, n. 4, p. 1044–1051, abr. 2013.

DO, B. et al. Perfusion lung injury. **Journal Pneumology**, v. 2525, n. 22, p. 124–136, 1999.

DO, T. T. H. et al. Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 6, p. 668-680, mar. 2014.

DOUCET, D. et al. Estrogen receptor hormone agonists limit trauma hemorrhage shock-induced gut and lung injury in rats. **PloS One**, v. 5, n. 2, p. 9421, fev. 2010.

EALEY, K. N.; ARCHER, M. C. Elevated circulating adiponectin and elevated insulin sensitivity in adiponectin transgenic mice are not associated with reduced susceptibility to colon carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 9, p. 2226–2230, mai. 2009.

ELMQUIST, J. K.; SCHERER, P. E. The cover. Neuroendocrine and endocrine pathways of obesity. **Jama**, v. 308, n. 11, p. 1070–1071, set. 2012.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1391–1401, nov. 2011.

EVORA, P. R. B. et al. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos patológicos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.54, n.4, p. 239-245, 1996.

FANTOZZI, E. T. **Hormônios sexuais femininos como moduladores da geração de mediadores inflamatórios em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal**. 2013. 116f. Tese (Mestrado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

FANTOZZI, E. T. et al. Estradiol mediates the long-lasting lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion. 2017. **Manuscrito em andamento.**

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 4, p. 408–414, out. 2007.

FINK, M. P.; DELUDE, R. L. Epithelial Barrier Dysfunction: A Unifying Theme to Explain the Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction at the Cellular Level. **Critical Care Clinics**, v. 21, n. 2, p. 177–196, 2005.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 737–744, set. 2008.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. **Jama**, v. 303, n. 3, p. 235–241, jan. 2010.

FOSCHINI, D. et al. Plaqueta e leptina em adolescentes com obesidade. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 6, p. 516–521, dez. 2008.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575–584, dez. 2010.

FRENETTE, P. S. et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 8, p. 1413–1422, 17 abr. 2000.

FRINK, M. et al. 17beta-Estradiol inhibits keratinocyte-derived chemokine production following trauma-hemorrhage. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 2, p. 585–591, out. 2006.

FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; KIHARA, S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. **International Congress Series.** v.1262, p.368-371, 2004.

GE, X. N. et al. High-fat diet promotes lung fibrosis and attenuates airway eosinophilia after exposure to cockroach allergen in mice. **Experimental Lung Research**, v. 39, n. 9, p. 365–378, nov. 2013.

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

GORDEEVA, A. E. et al. Vascular Pathology of Ischemia/Reperfusion Injury of Rat Small Intestine. **Cells, tissues, organs**, mar. 2017.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **The British Journal of Surgery**, v. 81, n. 5, p. 637–647, maio 1994.

GRANJA, T. et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes--A new assay suitable for bench and bedside conditions. **Thrombosis Research**, v. 136, n. 4, p. 786–796, out. 2015.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, maio 2008.

GUZMÁN-DE LA GARZA, F. J. et al. Temporal relationship of serum markers and tissue damage during acute intestinal ischemia/reperfusion. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 7, p. 1034–1038, jul. 2013.

HARWOOD, H. J. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 57–75, jul. 2012.

HE, G. et al. [Impact of glutamine and ω-3 polyunsaturated fatty acids on intestinal permeability and lung cell apoptosis during intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model]. **Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 15, n. 5, p. 484–489, mai. 2012.

HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12729–12734, nov. 2000.

HEREK, O. et al. The effects of intestinal ischemia on the levels of serum immunoglobulin A in rats. **Pediatric Surgery International**, v. 19, n. 8, p. 601–604, out. 2003.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803–811, dez. 2004.

HIERHOLZER, C. et al. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. **Transplantation**, v. 68, n. 9, p. 1244–1254, nov. 1999.

HILDEBRAND, F. et al. Effects of 17beta-estradiol and flutamide on inflammatory response and distant organ damage following trauma-hemorrhage in metestrus females. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 4, p. 759–765, out. 2006.

HONG, J. et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, p. 11, fev. 2009.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.

HSIEH, Y.-H. et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury leads to inflammatory changes in the brain. **Shock**, v. 36, n. 4, p. 424–430, out. 2011.

IGNACIO, D. L. et al. [Body mass regulation by estrogen and physical activity]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 3, p. 310–317, abr. 2009.

IWASA, T. et al. The effects of ovariectomy and LPS-induced endotoxemia on resistin levels in female rats. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 558–560, dez. 2015.

JAMES, I. A. O. et al. HB-EGF protects the lungs after intestinal ischemia/reperfusion injury. **The Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 1, p. 86–95, set. 2010.

JUNG, C. et al. Alterations in systemic levels of Th1, Th2, and Th17 cytokines in overweight adolescents and obese mice. **Pediatric Diabetes**, set. 2016.

KAPUR, R. et al. C-reactive protein enhances murine antibody-mediated transfusion-related acute lung injury. **Blood**, v. 126, n. 25, p. 2747–2751, dez. 2015.

KENNEDY, A. et al. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 4, p. 1293–1300, abr. 1997.

KIM, J. H.; CHO, H. T.; KIM, Y. J. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine Journal**, v. 61, n. 11, p. 1055–1067, 2014.

KOH, H. et al. Protective role of vascular endothelial growth factor in endotoxin-

induced acute lung injury in mice. **Respiratory Research**, v. 8, n. 1, p. 60, dez. 2007.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–643, abr. 2000.

KORDONOWY, L. L. et al. Obesity is associated with neutrophil dysfunction and attenuation of murine acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 120–127, jul. 2012.

KRETSCHMER, B. D. et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, v. 76, n. 14, p. 1553–1573, fev. 2005.

KURYSZKO, J.; SŁAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 2, p. 441–446, jan. 2016.

KUZU, M. A. et al. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. **American Journal of Surgery**, v. 183, n. 1, p. 70–74, jan. 2002.

LAM, Q. L. K.; LU, L. Role of leptin in immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1–13, fev. 2007.

LAPCHAK, P. H. et al. Platelets orchestrate remote tissue damage after mesenteric ischemia-reperfusion. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 8, p. 888-897, abr. 2012.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **General Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1145–1147, out. 1996.

LEITE, L. D. et al. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciências & Saúde**, v.2, n.2, p.85-95, 2009.

LI, Y. et al. Inhibition of Rho kinase by fasudil hydrochloride attenuates lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion. **Life Sciences**, v. 88, n. 1–2, p. 104–109, 3 jan. 2011.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–126, fev. 2000.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A. et al. Differential effects of female sex hormones on cellular recruitment and tracheal reactivity after formaldehyde exposure. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 3, p. 327–335, set. 2011.

LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 757461, 2014.

LOMBA, A. et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a

nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 101, n. 2–3, p. 273–278, out. 2010.

LORD, G. M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897–901, ago. 1998.

LU, Y.-Z. et al. Tumor Necrosis Factor α-Dependent Neutrophil Priming Prevents Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Bacterial Translocation. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 1–13, jan. 2017.

MARKEL, T. A. et al. Human mesenchymal stromal cells decrease mortality after intestinal ischemia and reperfusion injury. **The Journal of Surgical Research**, v. 199, n. 1, p. 56–66, nov. 2015.

MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. **Trends in endocrinology and Metabolism: TEM**, v. 22, n. 1, p. 24–33, jan. 2011.

MCCALLISTER, J. W.; ADKINS, E. J.; O'BRIEN, J. M. Obesity and acute lung injury. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 3, p. 495–508, set. 2009.

MCCORD, J. M.; MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 159–163, jan. 1985.

MCGUIRE, T. R. et al. Inflammation associated with obesity: relationship with blood and bone marrow endothelial cells. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 11, p. 2130–2136, nov. 2011.

MEES, S. T. et al. Influence of sex and age on morphological organ damage after hemorrhagic shock. **Shock**, v. 29, n. 6, p. 670–674, jun. 2008.

MELDRUM, D. R. Estrogen increases protective proteins following trauma and hemorrhage. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. 809-811, mar. 2006.

MOEINPOUR, F. et al. 17 Beta-estradiol normalizes Toll receptor 4, mitogen activated protein kinases and inflammatory response in epidermal keratinocytes following trauma-hemorrhage. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 13, p. 3317–3323, jul. 2007.

MORAES, L. B. et al. Gut ischemia/reperfusion induced acute lung injury is an alveolar macrophage dependent event. **The Journal of Trauma**, v. 64, n. 5, p. 1196-1200–1, mai. 2008.

MOSELEY, T. A. et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 2, p. 155–174, abr. 2003.

NAGASAWA, A. et al. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with

CD45 gating as a novel platelet activation marker. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, n. 5, p. 534–541, out. 2013.

NAIMARK, A.; CHERNIACK, R. M. Compliance of the respiratory system and its components in health and obesity. **Journal of Applied Physiology**, v. 15, p. 377–382, maio 1960.

NEELS, J. G. et al. Keratinocyte-derived Chemokine in Obesity: Expression, regulation, and role in adipose macrophage infiltration and glucose homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20692–20698, jul. 2009.

NG, K. Y.; YONG, J.; CHAKRABORTY, T. R. Estrous cycle in ob/ob and ovariectomized female mice and its relation with estrogen and leptin. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 1, p. 125–130, jan. 2010.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, ago. 2014.

NIJHUIS, J. et al. Neutrophil Activation in Morbid Obesity, Chronic Activation of Acute Inflammation. **Obesity**, v. 17, n. 11, p. 2014–2018, nov. 2009.

NISHIDA, M. et al. Interleukin-10 associates with adiponectin predominantly in subjects with metabolic syndrome. **Circulation Journal : Official Journal of The Japanese Circulation Society**, v. 71, n. 8, p. 1234–1238, ago. 2007.

NOLAN, D. J. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. **Genes & Development**, v. 21, n. 12, p. 1546–1558, jun. 2007.

NUMATA, M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 6, p. 3031–3037, mar. 1998.

NÜSSLER, N. C. ET AL. IL-10 increases tissue injury after selective intestinal ischemia/reperfusion. **Annals of Surgery**, v. 238, n. 1, p. 49–58, jul. 2003.

O'DONNELL, C. P. et al. Leptin prevents respiratory depression in obesity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 5, p. 1477–1484, mai. 1999.

OKUDA, M. et al. Role of extracellular Ca2+ in ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. **Circulatory Shock**, v. 37, n. 3, p. 209–219, jul. 1992.

OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260–265, abr. 2011.

OSTERMAN, C. et al. Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. **The American Journal of Sports**

Medicine, v. 43, n. 6, p. 1474–1484, jun. 2015.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473–2476, 1999.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011.

PAGE, C.; PITCHFORD, S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1176–1184, 2013.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **The American Journal of Physiology**, v. 250, n. 6, p. 749-753, jun. 1986.

PEARSON, L. et al. A rapid flow cytometric technique for the detection of platelet-monocyte complexes, activated platelets and platelet-derived microparticles. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 31, n. 4, p. 430–439, ago. 2009.

PLACKETT, T. P. et al. Effects of Estrogen on Bacterial Clearance and Neutrophil Response After Combined Burn Injury and Wound Infection. **Journal of Burn Care & Research : Official Publication of The American Burn Association**, v. 37, n. 5, p. 328–333, 2016.

PRADO, W. L. DO et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378–383, out. 2009.

QU, Y. et al. Interleukin-17A Differentially Induces Inflammatory and Metabolic Gene Expression in the Adipose Tissues of Lean and Obese Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 522, abr. 2016.

RICARDO-DA-SILVA, F. Y. et al. Estradiol Modulates Local Gut Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in Male Rats. **Shock**, p. 1, mar. 2017.

REILLY, P. M.; SCHILLER, H. J.; BULKLEY, G. B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **American Journal of Surgery**, v. 161, n. 4, p. 488–503, abr. 1991.

RIO, J. J. et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury in horses: pathophysiology and therapeutics. v. 30, n. 6, p. 1083–1093, 2000.

ROMBOUTS, M. et al. Linking CD11b (+) Dendritic Cells and Natural Killer T Cells to Plaque Inflammation in Atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

SARSU, S. B. et al. Effects of Leptin on Intestinal Ischemia–Reperfusion Injury. **Indian Journal of Surgery**, v. 77, n. S2, p. 351–355, dez. 2015.

S WHITE, P. A. et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, n. 5, 2013.

SENGER PATRÍCIA FIORINO APOIO, N.; MACKENZIE RESUMO, P. Estudo da morfometria de adipócitos em ratos recém-desmamados submetidos a uma dieta hiperlipídica. VII Jornada de iniciação científica, 2011.

SHARAWY, N. et al. Estradiol receptors agonists induced effects in rat intestinal microcirculation during sepsis. **Microvascular Research**, v. 85, p. 118–127, jan. 2013.

SHEN, M.; KUMAR, S. P. D. S.; SHI, H. Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 17, n. 2, p. 99–107, fev. 2014.

SHIGEOKA, A. A. et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 10, p. 6252–62588, mai. 2007.

SIFRI, Z. C. et al. Sex hormones affect bone marrow dysfunction after trauma and hemorrhagic shock. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 3, p. 864–869, mar. 2007.

SILVEIRA, M. R. Correlação entre a obesidade, adipocinas e sistema imunológico. **Revista Cineantropom e Desempenho Humano**, v.11, n.3, p.466-472, 2009.

SIPPEL, C. et al. Inflammatory processes of obesity. **Revista de Atenção à Saúde,** v. 12, n. 42, p. 48-56, 2014.

SOARES, A. L. et al. Tumor necrosis factor is not associated with intestinal ischemia/reperfusion-induced lung inflammation. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 306–313, set. 2010.

SOO, A. et al. Pre-operative determination of an individual's neutrophil response: a potential predictor of early cardiac transplant cellular rejection. **The Journal of Heart and Lung Transplantation :The Official Publication of The International Society for Heart Transplantation**, v. 28, n. 11, p. 1198–1205, nov. 2009.

SÖZEN, S. et al. The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **Hippokratia**, v. 15, n. 2, p. 161–166, abr. 2011.

SPAGNUOLO, M. I. et al. Relationship between severe obesity and gut inflammation in children: what's next? **Italian Journal of Pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 66, out. 2010.

SPERRY, J. L. et al. Characterization of the gender dimorphism after injury and hemorrhagic shock: are hormonal differences responsible? **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 6, p. 1838–1845, jun. 2008.

SPEYER, C. L. et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in

mice. **AJP: Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. 881–890, dez. 2004.

SPITE, M. et al. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 4, p. 1942–1949, ago. 2011.

SREERAMKUMAR, V. et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6214, p. 1234–1238, dez. 2014.

STANGL, V.; BAUMANN, G.; STANGL, K. Coronary atherogenic risk factors in women. **European Heart Journal**, v. 23, n. 22, p. 1738–1752, nov. 2002.

STAPLETON, R. D. et al. The association between BMI and plasma cytokine levels in patients with acute lung injury. **Chest**, v. 138, n. 3, p. 568–577, set. 2010.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307–312, jan. 2001.

STUBBINS, R. E. et al. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 58–66, jan. 2012.

STUDD, J. Prophylactic oophorectomy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 96, n. 5, p. 506–509, mai. 1989.

SUMARAC-DUMANOVIC, M. et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 33, n. 1, p. 151–156, jan. 2009.

SURWIT, R. S. et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 44, n. 5, p. 645–651, mai. 1995.

TAM, A. et al. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. **BMC Women's Health**, v. 11, n. 1, p. 24, dez. 2011.

TAVAF-MOTAMEN, H. et al. Nitric oxide mediates acute lung injury by modulation of inflammation. **Journal of surgical research**, v. 78, p. 137-142, aug. 1998.

TEKE, Z. et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on local and remote organ injuries caused by intestinal ischemia/reperfusion in rats. **The Journal of Surgical Research**, v. 149, n. 2, p. 259–271, out. 2008.

THOMAS, S. KARNIK, S. BALASUBRAMANIAN. K. A. Surgical manipulation of the small intestine and its effect on the lung. **Journal of Surgical Research**, v. 106, p. 145-156, jul. 2002.

THOMPSON, J. S.; BRAGG, L. E.; WEST, W. W. Serum enzyme levels during intestinal ischemia. **Annals of Surgery**, v. 211, n. 3, p. 369–373, mar. 1990.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 22 out. 2006.

TONG, F. et al. Simvastatin nanoparticles attenuated intestinal ischemia/reperfusion injury by downregulating BMP4/COX-2 pathway in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2477–2488, mar. 2017.

TORPY, D. J.; BORNSTEIN, S. R.; CHROUSOS, G. P. Leptin and interleukin-6 in sepsis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 30, n. 12, p. 726–729, dez. 1998.

TURNAGE, R. H. et al. Intestinal reperfusion-induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. **Surgery**, v.124, p. 457-462, aug. 1998.

TYAGI, A. M. et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. 44552, 10 set. 2012.

UBAGS, N. D. et al. The role of leptin in the development of pulmonary neutrophilia in infection and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 2, p. 143-151, fev. 2014.

VAN DER POLL, T. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 11, p. 5397–5401, dez. 1995.

VAN NOORD, D. et al. Serum markers and intestinal mucosal injury in chronic gastrointestinal ischemia. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 2, p. 506–512, fev. 2011.

VASCONCELLUS, L. S. et al. Influencia da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. **Arquivos Brasileiros de Endocrionologia e Metabologia**, v.48, n.2, p.229-304, 2004.

VIGITEL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília - DF, 2012.

VIGITEL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília - DF, 2014.

VIRLOS, I. T. et al. Differential expression of pulmonary nitric oxide synthase isoforms after intestinal ischemia-reperfusion. **Hepato-Gastroenterology**, v. 50, n. 49, p. 31–36, 2003.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, n. 1, p. 13–29, jan. 2011.

WATSON, M. J. et al. Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury Triggers Activation of

Innate Toll-Like Receptor 4 and Adaptive Chemokine Programs. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 10, p. 3339–3341, dez. 2008.

WAXMAN, K. Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. **New Horizons (Baltimore, Md.)**, v. 4, n. 2, p. 153–160, maio 1996.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**, v. 9, n. 6, p. 365-376, fev. 1989.

WINER, S. et al. Obesity predisposes to Th17 bias. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 9, p. 2629–2635, set. 2009.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, dez. 2003.

YU, Y. et al. Increased inflammatory reaction to intestinal ischemia-reperfusion in neonatal versus adult mice. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 25, n. 1, p. 46–50, fev. 2015.

ZHAI, Y. et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 12, p. 7115–7119, dez. 2004.

ZHU, Q. et al. Down-regulation of toll-like receptor 4 alleviates intestinal ischemia reperfusion injury and acute lung injury in mice. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 13678–13689, fev. 2017.

ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Mechanisms of reperfusion injury. **The American Journal of The Medical Sciences**, v. 307, n. 4, p. 284–292, abr. 1994.

ZÚÑIGA, L. A. et al. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 11, p. 6947–6959, dez. 2010.

WHO.<http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/>. Acesso em: abril de 2016.

WHO.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Disponível em janeiro de 2015. Acesso em: abril de 2016.