

Fernanda Beatriz Bordoni de Godoy Datti

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL À
DEXAMETASONA E AO LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS)
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR
ALÉRGICA DA PROLE ADULTA**

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2010

Fernanda Beatriz Bordoni de Godoy Datti

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL À
DEXAMETASONA E AO LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS)
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR
ALÉRGICA DA PROLE ADULTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D262e Datti, Fernanda Beatriz Bordoni de Godoy
 Efeito da exposição pré-natal à dexametasona e ao lipopolissacáride
 (LPS) na resposta inflamatória pulmonar alérgica da prole adulta /
 Fernanda Beatriz Bordoni da Godoy Datti. Campinas, SP : [s.n.],
 2010.

Orientador: Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Desametasona. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Gravidez. 4.
Gestação. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effect of perinatal exposure to dexamethasone and
lipopolysaccharide (LPS) in pulmonary allergic inflammatory response of
adult offspring**

Keywords: • Desamethasone
 • Lipopolysaccharides
 • Pregnancy

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Edson Antunes
Prof. Dr. Carmen Sylvia Passos Lima
Prof. Dr. Sisi Marcondes Paschoal
Profa. Dra. Alessandra Gambero
Profa. Dra. Silvana Chiavegatto**

Data da defesa: 30-08-2010

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Fernanda Beatriz Bordoni de Godoy Datti

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes
Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Passos Lima
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal
Professor (a) Doutor (a) Alessandra Gambero
Professor (a) Doutor (a) Silvana Chiavegatto

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2010

Dedicatória

A Deus e todos os seres de luz por terem
guiado e iluminado meus passos até o final
de mais uma jornada.

À minha filha Gabriela, minha razão de viver,
pela compreensão e paciência nos
momentos que não pude ser integralmente
mãe para ser integralmente profissional.
Agradeço todos os dias o privilégio de ser
sua mãe. Te amo!

Ao meu esposo, Marcelo, meu companheiro,
namorado, colega de trabalho, conselheiro,
ombro amigo, cúmplice... Te amo!

Aos meus pais Tati e René, pelo incentivo e
apoio constante durante minha formação.
Amo vocês!

Agradecimento especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson
Antunes, pela oportunidade, paciência,
sabedoria, exemplo de profissional e de ser
humano. Tenho orgulho de ser sua aluna,
você contribuiu muito para minha evolução!

Agradecimentos

Ao Marcelo Datti pela parceria e grande colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira, minha orientadora de mestrado, pelo carinho e ensinamentos que permitiram que seguisse trabalhando com estudo pré-natal.

Às Profas. Dras. Sisi Marcondes, Elen Landucci e Angelina Zanesco, pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração e amizade.

Aos colegas dos laboratórios de inflamação, cascata e células, em especial Camila Mendes, Camila Moraes, Carla Penteado, Cristiane Freitas, Dalize Squebola, Enilton Camargo, Fabíola Mônica, Fernanda Privero, Fernando Bau, Fran, Gláucia Coelho de Mello, Haroldo Flores, Ivani de Souza, Juliana Baracat, Letícia Lintomen, Lineu Baldissera, Luís Gustavo Souza, Márcia Cardoso, Maria Andréia Delbin, Marina Calixto, Mário Ângelo Claudino, Nádia Mariano, Priscila Monteiro, Rafael Annovazi, Rafael Prada, Tatiane Ferreira pela colaboração na realização dos experimentos e pelos momentos de descontração.

À Profa. Dra. Alessandra Gambero, ao Prof. Dr. Stephen Hyslop e ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, pela participação no exame de qualificação, no qual puderam apresentar valiosas sugestões para revisão deste trabalho.

Aos meus familiares, Papas, Lelê, Pedro, Bife, Cris, Ivan, vó Therezinha, vô Renê, Tita, Juju, Bá, Mário, Tata, Fran, Dé, Rafa, Rô, Beto, Sala, vó Didi, Orlando, Berlina, Orlandinho, Dani, Elisa, Luis, Eladia, Rick, Dê, Guto, Si, Nando, Dani, Juju, Mary, Alê, Ellen, Edy e Rafa por toda amizade, apoio e carinho.

À família Guimarães Guilherme, em especial minha amiga Cris, por toda amizade e carinho, tenho saudades de vocês!

Aos docentes e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do depto de farmacologia da UNICAMP, Fran, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adílson e Toninho, pela convivência e serviços prestados.

Ao Sr. Miguel, Marcos e Denise pela dedicação e carinho com os animais utilizados neste trabalho.

Aos animais, que com a vida colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

“É na experiência da vida que o homem evolui.”

Harvey Spencer Lewis

Sumário



SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE MATERIAIS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
LISTA DE TABELAS.....	xxv
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxx
1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1 Glicocorticóides.....	37
1.2 LPS.....	39
1.3 Teoria da higiene.....	43
1.4 Asma alérgica.....	45
OBJETIVOS.....	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Animais.....	54
2.2 Acasalamento e prenhez.....	54
2.3 Exposição pré-natal à dexametasona.....	55
2.4 Exposição pré-natal ao lipopolissacáride (LPS).....	55
2.5 Modelo de reação inflamatória alérgica pulmonar.....	56
2.5.1 Sensibilização e provocação antigênica.....	56
2.5.2 Lavado broncoalveolar (LBA)	57
2.5.3 Definição dos grupos experimentais.....	58
2.6 Contagem de células da medula óssea e do sangue.....	58
2.7 Reação inflamatória pulmonar com LPS.....	59
2.8 Determinação da concentração de corticosterona plasmática.....	60
2.9 Determinação dos níveis de TNF- α em LBA.....	60
2.10 Análise estatística.....	60
3. RESULTADOS	
3.1 Exposição pré-natal à dexametasona.....	62
3.1.1 Determinação do peso corpóreo dos descendentes ao	

nascer e desmame.....	62
3.1.2 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em fêmeas adultas expostas no período pré-natal à dexametasona.....	64
3.1.3 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em descendentes fêmeas.....	66
3.1.4 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em fêmeas expostas à dexametasona no período pré-natal.....	68
3.1.5 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em machos.....	70
3.1.6 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em machos.....	72
3.1.7 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em machos adultos expostos à dexametasona no período pré-natal.....	74
3.2 Exposição pré-natal ao LPS.....	76
3.2.1 Determinação do peso corpóreo dos descendentes ao nascer e desmame.....	76
3.2.2 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em fêmeas adultas expostas ao LPS no período pré-natal.....	78
3.2.3 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em fêmeas adultas expostas ao LPS no período pré-natal.....	80
3.2.4 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em fêmeas adultas expostas ao LPS no período pré-natal.....	82
3.2.5 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal.....	84
3.2.6 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal.....	87
3.2.7 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal.....	89

3.2.8 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após injeção intratraqueal de LPS em fêmeas e machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal.....	91
3.2.9 Níveis de corticosterona plasmática.....	94
3.3 Níveis de TNF- α no LBA.....	97
4. DISCUSSÃO.....	98
5. CONCLUSÕES.....	107
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXO	

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina
AG	Aminoguanidina
ANOVA	Análise de variância
AVP	Arginina vasopressina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DEX	Dexametasona
DIC	Coagulação disseminada intravascular
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPO	Peroxidase do eosinófilo
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclico
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IgE	Imunoglobulina E
IKB	Quinases inibitórias
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK	Quinase associada ao receptor da IL-1
LBA	Lavado broncoalveolar

LBP	Proteína ligante de LPS
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica principal
MMP-9	Metaloproteinase do tipo 9
NF-κB	Fator nuclear κB
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Tampão fosfato salina
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
SAL	Salina
TGF-β	Fator transformador de crescimento-β
Th1	Células T-helper 1
Th2	Células T-helper 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Fator alfa de necrose tumoral
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Materiais



LISTA DE MATERIAIS

Substância	Procedência
Ácido acético	Merck (Alemanha)
Azul de metileno	Sigma (St. Louis, EUA)
Corante Diff-Quick	Behring Ag (Düdingen, Switzerland)
Dexametasona	Prodome Química e Farmacêutica (Brasil)
Halotano	Cristália (Brasil)
Heparina	Eurofarma (Brasil)
Hidróxido de alumínio	Sanofi (Brasil)
KCl	Merck (RJ, Brasil)
KH_2PO_4	Merck (RJ, Brasil)
Kit para dosagem de corticosterona	R&D Systems (EUA)
Kit para dosagem de $\text{TNF-}\alpha$	R&D Systems (EUA)
LPS	Sigma (St. Louis, EUA)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Nuclear (Brasil)
NaCl 0.9% Estéril	Fresenius (SP, Brasil)
NaCl	Merck (RJ, Brasil)
Ovalbumina	Sigma (St. Louis, EUA)
Pentobarbital sódico	Cristália (Brasil)

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; SAL4) ou dexametasona (DEX). 65

Figura 2. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de fêmeas expostas à salina (controle; SAL4) ou dexametasona (DEX) no período pré-natal. 67

Figura 3. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). 69

Figura 4. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). 71

Figura 5. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX) pré-natal. 73

Figura 6. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e

imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). 75

Figura 7. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 79

Figura 8. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 81

Figura 9. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 83

Figura 10. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no LBA de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo

bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 86

Figura 11. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 88

Figura 12. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). 90

Figura 13. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; colunas vazias) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; colunas cheias). 92

Figura 14. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (controle; colunas vazias) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; colunas

cheias).

93

Figura 15. Concentração de corticosterona em fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; SAL1) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

95

Figura 16. Concentração de corticosterona em machos adultos expostos no período pré-natal à salina (controle; SAL1) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

96

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso corpóreo (g) dos descendentes fêmeas controle (Sal 4) ou expostos a dexametasona pré-natal (DEX) ao nascer e desmame. 63
- Tabela 2.** Peso corpóreo (g) dos descendentes machos controle (Sal 4) ou expostos a dexametasona pré-natal (DEX) ao nascer e desmame. 63
- Tabela 3.** Peso corpóreo (g) no nascimento e desmame dos descendentes fêmeas expostos ao LPS no período pré-natal ou grupo controle exposto à salina no período pré-natal (SAL1) 77
- Tabela 4.** Peso corpóreo (g) no nascimento e desmame dos descendentes machos expostos ao LPS no período pré-natal ou grupo controle exposto à salina no período pré-natal (SAL1) 77

Resumo

RESUMO

Estudos conduzidos em animais de experimentação e em humanos mostram que o período pré-natal é de suma importância para o desenvolvimento da prole. Estressores de qualquer natureza, se aplicados nesse período, podem promover alterações como baixo peso ao nascer, risco de intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemias e asma. O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto da exposição de ratas prenhes a “estressores” que alteram a programação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA), como corticóides exógenos e endotoxina, sobre a resposta pulmonar alérgica. Para tanto, ratas Wistar prenhes foram submetidas à administração de dexametasona (0.1 mg/Kg, via s.c.; do 17º ao 20º dia gestacional) ou à administração de lipopolissacarídeo (LPS; 7 µg/Kg, via i.p.; no 17º dia gestacional). A injeção de LPS foi realizada na ausência e na presença de tratamento com aminoguanidina (inibidor da sintase induzível de óxido nítrico; iNOS), oferecida na ingesta hídrica (50 mg/dia) a partir do 13º dia gestacional. Os descendentes adultos foram sensibilizados com ovalbumina (OVA; 200 µg). Quatorze dias após a sensibilização, todos os animais foram desafiados com OVA (injeção intratraqueal contendo 2,5 mg/ml em 0,4 ml). Os lavados broncoalveolares (LBA), medula óssea e o sangue foram coletados 48 h após o desafio antigênico com OVA. Nossos resultados mostraram que a exposição pré-natal à dexametasona não altera o peso corpóreo dos descendentes fêmeas e machos ao nascer; porém, no desmame, fêmeas e machos apresentaram redução significativa no peso corpóreo (10,5% e 7,1% de redução, respectivamente). No

LBA de fêmeas e machos observamos uma exacerbação de aproximadamente 120% e 128%, respectivamente, do influxo eosinofílico nos animais expostos prenatalmente à dexametasona e desafiados com OVA em comparação ao grupo controle. Nos protocolos de exposição pré-natal ao LPS, notamos um aumento do peso dos descendentes fêmeas e machos ao nascer, de aproximadamente 10,5% e 9,6%, respectivamente, em comparação com o controle. Este aumento foi ainda maior no desmame, quando fêmeas e machos prenatalmente expostos ao LPS estavam 19% e 22,5% mais pesados que os animais controle. Os animais prenatalmente expostos ao LPS, tanto fêmeas quanto machos, apresentaram redução significativa do influxo eosinofílico (aproximadamente 66,5% e 66,7%, respectivamente) no LBA dos animais desafiados com OVA em relação aos animais controle. O tratamento pré-natal com aminoguanidina restaurou o influxo eosinofílico, mantendo-o igual aos valores do grupo controle. No conjunto, nossos dados mostram que a exposição pré-natal à corticóides exógenos ou LPS são capazes de promover alterações na resposta inflamatória alérgica pulmonar na prole adulta, possivelmente por alterações na programação do eixo HPA.

Abstract

ABSTRACT

Studies in experimental animals and in humans have showed that the prenatal period is critical for the development of the offspring; stress of any kind, if applied during this period, promotes definitive changes in late life. The aim of this study was to investigate the impact of exposure of pregnant rats to challenges that can alter the programming of the hypothalamic pituitary adrenal axis (HPA), such as exogenous steroids or endotoxin, on the pulmonary allergic inflammatory reaction to ovalbumin (OVA) challenge. Pregnant Wistar rats were submitted to administration of either dexamethasone (0.1 mg / kg, sc; from 17th to 20th day of gestation) or lipopolysaccharide (LPS; 7 mg / kg, via ip; on the 17th gestation day). The LPS injection was performed in the absence and in the presence of treatment with aminoguanidine, given in tap water (50 mg / day) from the 13th gestation day. The adult offspring were sensitized by subcutaneous injection (0.15 ml) of a solution containing 200 µg OVA adsorbed in aluminum hydroxide. Fourteen days after sensitization, all animals were challenged with an intratracheal injection of 0.4 ml saline containing OVA (2.5 mg/ml). The bronchoalveolar lavage (BAL), bone marrow and blood were collected 48 h after OVA challenge. Our data showed that prenatal exposure to dexamethasone did not alter the body weight of female and male offspring at birth, but at weaning, both sexes showed a significant litter weight reduction (10.5% and 7.1% reduction, respectively). In BAL fluid collected from females and males offspring, we observed an exacerbation (120% and 128%, respectively) of eosinophil influx in animals challenged with OVA and exposed

prenatally to dexamethasone in comparison with control animals. The prenatal exposure to LPS caused an increase of body weight in male and female offspring at birth, approximately 10.5% and 9.6% respectively, in comparison with saline controls. This increase was higher at weaning, when females and males prenatally exposed to LPS were approximately 19% and 22.5% heavier than control animals. Animals prenatally exposed to LPS, both females and males, showed significant reductions of eosinophil influx (66.5% and 66.7% respectively) in the BAL fluid of animals challenged with OVA compared with control animals. Prenatal treatment with the nitric oxide synthesis inhibitor, aminoguanidine, restored the eosinophil influx to control values. Taken together, our data show that prenatal exposure to either exogenous corticoids or LPS are able to promote changes in the pulmonary allergic inflammatory response in adult offspring, possibly due to changes in HPA axis.

1. INTRODUÇÃO

É incontestável que o atentado terrorista de 11 de setembro de 2001 ao *World Trade Center* deixou diversas seqüelas para a sociedade americana, e, ainda hoje, a mídia divulga conseqüências sociais e políticas deste evento. Mas que impacto teria este evento sobre o desenvolvimento das crianças que estavam no período gestacional durante o atentado? Um estudo de 2004 avaliou os descendentes de 300 mulheres não-fumantes que estavam grávidas durante o atentado; estas mulheres foram expostas ao estresse psicológico, poeira, alérgenos e fumaça decorrentes do evento. Os resultados deste estudo mostraram que, em comparação com filhos nascidos de mães não expostas ao evento, os filhos gerados pelas mães que viveram a tragédia do *World Trade Center* apresentaram diminuição de peso, de estatura e de circunferência craniana¹.

Eventos externos vivenciados pelas mães durante a gestação parecem ter habilidade de modificar a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) dos descendentes provocando, inclusive, alterações tardias, que podem se estender até a idade adulta. A primeira observação deste fenômeno foi feita por Levine há mais de 50 anos².

Estudos epidemiológicos têm mostrado que tanto o ambiente pré-natal, quanto o pós-parto influenciam a susceptibilidade a doenças³. Aparentemente, níveis elevados de corticosteróides no plasma materno estão relacionados com o baixo peso ao nascer, risco de intolerância à glicose, hipertensão arterial e síndrome metabólica⁴⁻⁶, além de alterações comportamentais⁷. São exemplos de manipulação no período perinatal o estresse pré-natal, restrição nutricional,

manipulação neonatal, privação aos cuidados maternos, exposição aos glicocorticóides e a infecções³. Alteração no peso da prole é observada em ratos expostos ao estresse pré-natal⁷⁻⁹ ou à dexametasona na última metade da fase intra-uterina¹⁰. Sugere-se que a mudança de peso dos descendentes pode ser explicada pela alteração da programação fetal do eixo HPA, processo em que um estímulo (ou estressor), aplicado em um período crítico do desenvolvimento, resulta em uma adaptação permanente da fisiologia do organismo⁶. Além disso, animais submetidos a estresse pré-natal, desnutrição ou exposição a glicocorticóides na gestação dão origem a descendentes com hipertensão arterial ou intolerância à glicose, e podem também, apresentar hiperatividade do eixo HPA¹¹⁻¹³.

Além de estressores físicos e psicológicos, o desafio imune também tem habilidade de estimular a atividade do eixo HPA. Um exemplo disto é a capacidade do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em promover a liberação de citocinas, como interleucina (IL)-1, fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-2 e interferon-gama. Estas citocinas, por sua vez, podem estimular o eixo HPA, através da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que ativa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina (ACTH), seguido pela liberação de cortisol¹⁴. Tendo em vista o exposto acima, a exposição a agentes inflamatórios é potencialmente capaz de promover alterações na prole.

Estudos que expuseram ratas prenhes ao estresse psicológico e avaliaram a resposta imunológica na prole adulta apresentam resultados controversos. Em alguns deles, a resposta está aumentada, e em outros, até deprimida^{9,15,16}. Estas

discrepâncias podem, talvez, ser explicadas pelos diferentes parâmetros avaliados e os diferentes protocolos de estresse aplicados.

Deve-se considerar que o efeito dos estressores pré-natais sobre a resposta imune/inflamatória depende do tipo, do tempo e da intensidade do estressor, bem como do sexo, da idade e da espécie animal. Os estressores podem também ter um efeito bidirecional sobre a função imune/inflamatória, no qual em algumas condições poderia haver exacerbação e em outras supressão desta função^{9,15}.

O embasamento teórico da resposta biológica ao estresse é muito bem estabelecido. Podemos especular que esta resposta biológica, quando evocada prenatalmente, promova alterações nos descendentes de modo a torná-los aptos a se adaptarem melhor ao ambiente hostil, promovendo um aumento da possibilidade de sobrevivência após o nascimento. Em nosso laboratório já foi observado que a exposição a um modelo de estresse crônico, que incluía períodos de privação de água e alimentação, iluminação ambiental contínua, inclinação da gaiola, agrupamento de animais, gaiola úmida, exposição a sala resfriada, barulho intermitente de 85 db, luz estroboscópica, garrafas vazias após privação de água, acesso restrito a alimentação, odor novo e objetos estranhos na gaiola (pedaços de madeira/vidro), por um período de quatorze dias consecutivos, durante as duas últimas semanas de gestação, produz ratos adultos mais susceptíveis ao desenvolvimento de asma alérgica induzido por OVA (ovalbumina)¹⁶.

1.1 Glicocorticóides

Os glicocorticóides são secretados pelo córtex da glândula adrenal a partir do colesterol. O principal glicocorticóide humano é o cortisol, e em ratos a corticosterona. Os glicocorticóides recebem estes nome devido à sua capacidade de promover a conversão de proteínas e lipídios em glicose; isto se dá em resposta ao estresse. Além disto, regulam a função imunológica, a resposta inflamatória, a embriogênese, o comportamento e a proliferação celular¹⁷.

Os glicocorticóides regulam sua própria secreção através de retroalimentação negativa que ocorre ao nível do hipotálamo e da hipófise com a inibição da síntese e/ou liberação do CRH, arginina vasopressina (AVP), proopiomelanocortina (POMC) e ACTH³.

O cérebro é sensível a uma série de agentes conhecidos pela capacidade de afetar o seu desenvolvimento, como fatores de crescimento, fatores de transcrição e nutrientes. Os esteróides, em particular, possuem grande capacidade de programar o desenvolvimento fetal. O eixo HPA medeia a liberação de corticosteróides, regulando o ritmo circadiano em resposta ao estresse, e é suscetível à programação no período perinatal¹⁸.

A maturação do eixo HPA está relacionada ao desenvolvimento cerebral¹⁹. Algumas espécies animais, como ovelhas, primatas e cobaias desenvolvem o crescimento cerebral máximo e a maior parte da maturação neuroendócrina *in útero*; já os ratos, os coelhos e os camundongos apresentam grande parte do seu desenvolvimento neuroendócrino nos primeiros dias após o nascimento. Assim, a

manipulação pré-natal e pós-natal podem ter impacto em diferentes estágios do desenvolvimento, dependendo da espécie estudada^{20,21}.

O tratamento pré-natal com dexametasona (DEX) em ratos, seja na terceira semana gestacional ou durante toda a gestação, resulta em níveis plasmáticos elevados de corticosterona em descendentes machos adultos^{12,18}. Este aumento parece estar associado a aumento da pressão arterial na idade adulta. Outro elucidativo estudo mostrou que o tratamento com glicocorticóides sintéticos no 17º, 18º e 19º dias de gestação dá origem a descendentes machos mais capazes para responder a um estressor; ou seja, estes animais produzem uma quantidade maior de corticosterona quando expostos a fatores estressantes na vida adulta²².

Os mecanismos que promovem a programação do eixo HPA em adultos dependem da dose e do tempo de exposição¹⁸. Ratos adultos que foram expostos a glicocorticóides sintéticos na última semana de gestação apresentaram redução na expressão de receptores de mineralocorticóides e de glicocorticóides no hipocampo, mas não no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). Esta redução hipocampal na sensibilidade aos corticóides aumenta a atividade do eixo HPA³.

A administração de glicocorticóides às gestantes portadoras de doenças auto-imunes é prática clínica comum²³. Além disso, os glicocorticóides são administrados a neonatos para tratar a síndrome do estresse respiratório, e em mulheres grávidas para terapia ante natal e indução do parto²⁴. Isto nos faz refletir sobre o impacto destes fármacos sobre os descendentes. O presente trabalho é o primeiro a relacionar a exposição pré-natal aos glicocorticóides com o desenvolvimento de asma na prole adulta.

1.2 LPS

Apesar estar bem estabelecido que os sistemas nervoso, endócrino e imunológico são anatomicamente e funcionalmente interconectados, expressando e respondendo a um grande número de moléculas regulatórias em comum, o impacto de desafios à homeostase materna sobre a resposta imune/inflamatória dos descendentes adultos ainda não é bem compreendida.

O LPS tem sido usado como uma valiosa ferramenta em estudos neuroendócrino-imunes. O LPS é um potente ativador do eixo HPA^{25,26}; além disso, induz ao comportamento doente característico de situações de infecção²⁷.

O LPS, maior componente da membrana celular externa de bactérias gram negativas, é constituído por três regiões principais: a região polissacarídea O, a qual caracteriza a bactéria do ponto de vista imunológico; a região polissacarídea central, formada pelo ácido 3-deoxi-D-mano-octo-2-ulosônico (Kdo), que é comum à maioria das bactérias, e a região lipídica (lipídeo A)^{28,29}. O lipídeo A de *Escherichia coli* (*E. coli*) possui dois grupamentos fosfato e duas porções acil-oxi-acil necessários para desencadear os efeitos da endotoxina em células humanas^{30,31}.

Na literatura está estabelecido que a endotoxina desencadeia a maioria dos fenômenos fisiopatológicos observados em infecções causadas por esse tipo de bactérias³². Huang e colaboradores³³ demonstraram que 466 genes são regulados positivamente (*up-regulation*) nas células dendríticas após exposição à *E. coli*, sendo que aproximadamente 88% dos genes são transcritos após exposição ao LPS purificado.

O LPS liberado na circulação pode ser o responsável pelo choque séptico e síndromes relacionadas, como coagulação disseminada intravascular (DIC) e insuficiência múltipla de órgãos³⁴. Estudos clínicos têm associado níveis elevados de LPS com risco maior de mortalidade, que parece ser independente da natureza da bactéria gram-negativa responsável pelo episódio séptico³⁵.

A estimulação celular com LPS, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, promove a liberação de várias substâncias, incluindo citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), ânion superóxido e fatores pró-coagulantes³⁶⁻³⁹. Normalmente, o reconhecimento de componentes da parede de bactérias pelo hospedeiro é feito de maneira específica. Inicialmente, os agregados de LPS são dissociados pela proteína ligante de LPS (LBP) formando complexos LPS/LBP, que são transferidos para a glicoproteína de membrana CD14 presente em células monocíticas ou para a CD14 solúvel presente no sangue^{40,41}. O complexo da LBP solúvel e LPS pode se ligar a células negativas para CD14, como as células endoteliais e epiteliais^{42,43}. Entretanto, a glicoproteína CD14 não pode iniciar a sinalização intracelular uma vez que está localizada na porção extracelular da membrana e não possui um segmento transmembrana.

O *Toll-like receptor 4* (TLR4) tem sido descrito como o receptor responsável pela transdução de sinal iniciada pelo LPS ou pelo complexo LPS/CD14⁴⁴⁻⁴⁶. Os receptores *Toll* foram descobertos inicialmente em *Drosophila* e depois identificados em outras espécies como camundongos e humanos. Estes receptores pertencem à família de receptores de imunidade inata, que possuem um grande domínio extracelular contendo resíduos repetidos de leucina, um único segmento trans-membrana e uma pequena porção citoplasmática que está ligada

à proteína adaptadora MyD88²⁹. Atualmente, mais de 10 tipos de TLR foram descritos em humanos, mas o TLR4 parece ser o mais importante na sinalização de efeitos desencadeados pelo LPS⁴⁷. A sinalização via TLR4 ocorre através do recrutamento seqüencial da molécula adaptadora MyD88 e da quinase associada ao receptor da IL-1 (IRAK)⁴⁸. Logo em seguida, a IRAK se dissocia do receptor e interage com o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), que resulta na ativação celular através do fator nuclear kB (NF-kB) ou da quinase do N-terminal da Jun/proteína quinase (JNK/SAP), que são sistemas envolvidos na ativação de inúmeros genes inflamatórios⁴⁹. A presença do receptor TLR4 já foi descrita em várias células como em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células epiteliais do túbulo renal⁵⁰⁻⁵³.

O LPS é um potente indutor da óxido nítrico sintase induzível (iNOS)⁵⁴. O NO é um gás produzido por vários tipos celulares⁵⁵ e exerce papel chave na regulação de múltiplas funções biológicas^{56,57}. Muitas de suas ações são mediadas pela ativação da guanilil ciclase solúvel e conseqüente aumento da concentração de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nas células-alvo^{58,59}.

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas coletivamente conhecidas como NO sintases. Atualmente são conhecidas três NOS. Duas delas, a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial ou NOS III) e a nNOS (óxido nítrico sintase neuronal ou NOS I) são expressas constitutivamente e são assim chamadas porque expressam o nome dos tecidos onde foram primeiramente identificadas. Ambas são reguladas pelo complexo Ca^{+2} /Calmodulina, produzem pequenas quantidades de NO por curtíssimos períodos de tempo (de segundos a alguns minutos) e desempenham funções

regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A terceira isoenzima é a iNOS (óxido nítrico sintase induzível ou NOS II) e é assim chamada por poder ser induzida por LPS e certas citocinas. Esta isoforma é independente de Ca^{+2} e pode produzir maiores quantidade de NO por períodos de tempo mais longos^{60,59}.

As NOS são ativas na forma de homodímeros de pesos moleculares entre 250-300 kDa^{61,62}. A ligação da calmodulina aumenta a transferência de elétrons no domínio redutase e permite a redução do grupamento heme com conseqüente atividade da NOS^{63,64}. Todas as isoformas da NOS podem ser inibidas, em graus variáveis, por análogos da L-arginina substituídos no grupamento guanidino (N^ω)^{65,66}, como o N^ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)^{65,66} e a aminoguanidina (AG), esta última apresenta seletividade para iNOS^{67,68}.

Fibras nervosas produtoras de NO estão presentes em útero não-grávido de ratas⁶⁹. Durante a gravidez, o NO apresenta funções como inibição da agregação plaquetária na circulação materno-fetal, aumento do fluxo sanguíneo placentário e supressão da contratilidade do miométrio (para revisão, veja Norman e Cameron⁷⁰).

Outros mediadores vasodilatadores como cininas, prostaciclina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também controlam a hemodinâmica útero-placenta e feto-placenta durante a gravidez. A multiplicidade de componentes que conduzem à vasodilatação durante a gravidez parece ser reflexo de funções compensatórias em decorrência das mudanças hormonais que ocorrem neste período⁷¹.

Por outro lado, a infecção materna está associada ao aborto, mortalidade perinatal e reabsorção fetal⁷². A infecção do trato urinário durante a gravidez é de ocorrência bastante comum⁷³. Estudos epidemiológicos apontam que entre 2% a 10% das mulheres grávidas desenvolverão bacteriúria assintomática⁷⁴, sendo os microorganismos mais comuns a *Klebsiella* e *E. coli*⁷⁵. Recente estudo avaliando a frequência, fatores de risco e padrão de queixas urinárias durante a gravidez revelou que nas infecções por *E. coli* os sintomas mais comuns foram padrão miccional anormal seguido por sintomas irritativos. A história pessoal de infecção de trato urinário, a atividade sexual, bem como menor grupo socioeconômico foram fatores de risco para tal infecção⁷⁶.

O impacto da endotoxemia pré-natal sobre a prole é pouco conhecido. Sabe-se que a exposição neonatal ao LPS provoca aumento na atividade do eixo HPA e alteração de mecanismos imunoregulatórios em resposta a um estressor⁷⁷, além de alterações comportamentais⁷⁸. Camundongos expostos durante toda a fase intra-uterina ao LPS deixam de responder à sensibilização e desafio pulmonar à OVA⁷⁹, dados compatíveis com a teoria da higiene.

1.3 Teoria da higiene

A teoria da higiene é conhecida por tentar explicar a etiologia da asma e outras doenças alérgicas. Esta teoria é fundamentada na distribuição irregular de casos de doenças alérgicas nas regiões rurais e regiões urbanas. As regiões urbanas são significativamente mais afetadas pela asma do que as regiões

rurais^{80,81}. Esta relação pode estar relacionada a uma mudança no balanço entre as células T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2), na ausência da exposição a patógenos em fase prematura do desenvolvimento⁸².

Estudos epidemiológicos sobre a exposição a compostos de origem microbiana e prevalência de alergias indicam uma relação inversa entre a presença de LPS microbiano e o desenvolvimento de asma em crianças^{83,84}. Ou seja, a exposição pré-natal a ambientes rurais pode proteger as crianças dos sintomas da asma, e, se a exposição continuar durante a vida, a proteção é mantida⁸⁵. Por outro lado, a exposição a certos patógenos como vírus influenza, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* pode promover asma ou exacerbar a asma já existente^{86,87}.

A inibição do desenvolvimento de doenças alérgicas através da exposição a compostos microbianos necessita ser mais profundamente compreendida uma vez que alguns estudos reportam que a exposição ao LPS aumenta a incidência e gravidade de doenças atópicas^{88,89}.

Trabalho recente avaliando a produção de citocinas em sangue de cordão umbilical de crianças descendentes de mães expostas ao ambiente rural mostrou níveis elevados de interferon-gama e de TNF- α em comparação com crianças de áreas urbanas. Isto mostra que a exposição materna às atividades agrícolas durante a gravidez modula padrões de produção destas citocinas da prole no nascimento⁹⁰.

Peters e colaboradores⁹¹ apresentaram evidências de que as substâncias que proporcionam proteção contra o desenvolvimento de doenças alérgicas podem ser extraídas de poeira coletada em estábulos. Camundongos BALB-c que

inalaram esta poeira apresentaram redução da hiperreatividade brônquica e do aumento do número de eosinófilos nas vias aéreas após o desafio com OVA.

1.4 Asma alérgica

A asma é uma doença crônica bastante comum, tanto em adultos quanto em crianças, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade⁹². Estima-se que nos Estados Unidos 20 milhões de pessoas têm asma, sendo 6,2 milhões de crianças e 13,8 milhões de adultos⁹³. Anualmente, ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo SUS (2,3% do total) e a terceira causa entre crianças e adultos jovens⁹⁴.

A asma é uma condição caracterizada por resposta inflamatória crônica das vias aéreas que resulta em broncoespasmo devido à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios espasmogênicos provenientes de macrófagos alveolares, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos⁹⁵⁻⁹⁷. O desenvolvimento da asma envolve interações entre fatores externos (poluição, infecções virais, exposição à alérgenos), genéticos (histórico familiar de atopia) e estilo de vida (fumo, dieta e uso de antibióticos), e tem como características clínicas crises de dispnéia, tosse e sibilos. É uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos^{98,99}.

A asma pode ser dividida em dois principais tipos: asma intrínseca e extrínseca. A asma intrínseca apresenta história negativa para alergia e níveis séricos normais de imunoglobulina E (IgE). Neste caso, os pacientes desenvolvem

os sintomas típicos de asma (sibilo e dispnéia) após a exposição das vias aéreas a certos estímulos como infecções virais e/ou bacterianas, ar frio, inalantes irritantes (ex: dióxido de enxofre), drogas (ex: aspirina), estresse emocional e exercício físico^{100,101}. A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica (colonização brônquica com *Aspergillus*, seguida pelo desenvolvimento de anticorpos IgE)^{100,101}. A asma alérgica é a mais comum, sendo desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, determinados alimentos, dentre outros. É freqüentemente associada a histórico familiar de atopia. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas, como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos inalados, níveis elevados de IgE no soro, e/ou respostas positivas a testes de provocação os quais envolvem a inalação de antígeno específico^{100,101}.

A asma alérgica pode ser dividida em basicamente 3 fases: fase de indução da reação alérgica, fase imediata e fase tardia. Na fase de indução (ou sensibilização), o alérgeno inalado é englobado e processado por células apresentadoras de antígeno distribuídas por todo o trato respiratório, desde a mucosa nasal até a pleura. Essas células migram para o linfonodo onde processam o alérgeno e o apresentam para linfócitos T. A ativação dos linfócitos T auxiliares do tipo 2 leva a produção de várias citocinas, sendo IL -4, -5, -9 e -13 as mais importantes para o desenvolvimento da asma. A IL-4 e -13 ativam os linfócitos B que por sua vez realizam o “switch” de classe de imunoglobulina

passando a produzir e secretar IgE. Essas duas citocinas, junto com IL-9, são importantes para a ativação de mastócitos, o aumento na produção de muco e na hiperreatividade das vias aéreas. Uma vez sintetizada, IgE circula no sangue antes de se ligar ao seu receptor de alta afinidade FcεRI, presente na superfície de mastócitos e basófilos. Após a re-exposição ao alérgeno, o mesmo se liga a IgE específica que se encontra ligada ao seu receptor na membrana dos mastócitos; a ligação cruzada entre o antígeno e duas IgE adjacentes ativa vias de membrana e citosólicas que subsequentemente desencadeiam a secreção de mediadores pré-formados, como a histamina, estimula a síntese de prostaglandinas, cisteínil leucotrienos e citocinas pelos mastócitos. Esses mediadores causam a denominada fase imediata da reação asmática que é caracterizada por contração das células musculares lisas das vias aéreas, extravasamento vascular, produção de muco, hiperreatividade das vias aéreas e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e eosinófilos). Essa fase dura cerca de 30-60 minutos. Cerca de 4-6 horas após, a crise entra em sua fase tardia. Por sua vez, a fase tardia é caracterizada por inflamação excessiva das vias aéreas, resultando em mudanças estruturais que incluem espessamento da parede das vias aéreas, fibrose subepitelial, hiperplasia das células secretoras de muco, hiperplasia dos miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas e hipertrofia do epitélio. Esse processo de remodelamento que ocorre na fase tardia é resultante da ação de mediadores inflamatórios produzidos e secretados por células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos e linfócitos) e células estruturais (endotélio e epitélio pulmonar) ativadas. Dentre esses mediadores destacam-se as metaloproteínases (principalmente MMP-9), citocinas

(IL-9 e, principalmente, o fator transformador de crescimento β (TGF- β), quimiocinas (CCL2, CCL7 e CCL22) e mediadores lipídicos (cisteínil leucotrienos; prostaglandinas D2 e E2)^{99,102}. Várias espécies animais têm sido usadas como modelos de asma, incluindo cobaias, cães, camundongos e ratos^{95,103-107}. Entretanto, a complexidade da doença humana não tem sido totalmente reproduzida em animais, existindo apenas modelos de inflamação alérgica que reproduzem algumas características da doença, como broncoconstrição, hipersecreção de muco e inflamação crônica com infiltração de leucócitos⁹⁸. O procedimento experimental mais frequentemente utilizado é a indução de um estado alérgico, que é caracterizado por uma hipersensibilidade do tipo imediata ou anafilática a um antígeno conhecido. Isto pode ser obtido através da sensibilização à ovalbumina, normalmente associada ao hidróxido de alumínio, que resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos (principalmente a IgE), dependente de células T (no caso, células Th2). Após 14 dias da sensibilização, a resposta inflamatória alérgica pode ser observada nos animais após a provocação intranasal ou intratraqueal com o alérgeno^{103,108-111}.

Dados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos experimentais de asma mostram que os eosinófilos desempenham papel importante nesta doença. O acúmulo seletivo e a ativação destas células na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese desta doença¹¹². Pacientes asmáticos apresentam número elevado de eosinófilos no sangue e no LBA, e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos^{100,113}. A importância dos eosinófilos na asma tem sido enfatizada pelos achados que correlacionam o grau

de eosinofilia no sangue (e no LBA) com o grau de hiperreatividade brônquica e a gravidade da doença^{102, 113,114}.

Os eosinófilos correspondem a 2% dos leucócitos presentes no sangue humano. Possuem, em geral, núcleo bilobado com cromatina altamente condensada e citoplasma contendo dois tipos principais de grânulos, o específico (ou secundário) e o primário. O grânulo específico tem uma aparência ultraestrutural distinta contendo basicamente duas regiões, uma região eletrondensa que contém proteína básica principal (MBP) -1 e -2 e é denominada de cristal central; a outra região, denominada de matriz, contém as proteínas tóxicas (proteína catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN). Os grânulos primários são similares àqueles encontrados em outros tipos de granulócitos e são formados na fase inicial do desenvolvimento de eosinófilos. Os eosinófilos também contêm corpos lipídicos que são importantes para a síntese de eicosanóides. O retículo endoplasmático, as mitocôndrias e o aparelho de Golgi são pouco desenvolvidos nestas células^{59,115,116}. Esses granulócitos expressam várias moléculas de superfície, incluindo receptores para IL-3, IL-5 e para fator estimulante de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF); receptores para quimiocinas (CCR1 e CCR3); FcγRII (CD32- receptor para IgG); FcαRI (receptor para IgA secretória); receptores para fatores do sistema complemento (C3aR, CD88 e CD35) e moléculas de adesão (VLA-4 e integrina α4β7). Exibe ainda uma mínima expressão intracitoplasmática de FcεRI cuja significância funcional ainda não é clara¹¹⁶.

A eosinopoiese ocorre na medula óssea onde os eosinófilos se diferenciam a partir de células progenitoras hematopoiéticas que possuem em sua superfície a

molécula CD34, uma glicoproteína específica de precursores hematopoiéticos, sendo, portanto denominadas de células CD34⁺¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Eosinófilos maduros saem da medula óssea para a circulação sangüínea e são recrutados para os sítios de inflamação alérgica pela ação de fatores pró-inflamatórios produzidos por células endoteliais e epiteliais ativadas em resposta ao estímulo alérgico¹²⁰. O recrutamento de eosinófilos para o tecido inflamado é complexo, sendo regulado por vários fatores, incluindo a IL-4, IL-5 e IL-13, eotaxinas, RANTES, MIP-1 α , NO e moléculas de adesão (integrinas β 1, β 2 e β 7)¹¹⁸⁻¹²¹. Entre esses fatores, somente a IL-5 e as eotaxinas seletivamente regulam o influxo de eosinófilos para o foco de inflamação, havendo uma cooperação entre ambas na promoção de eosinofilia tecidual¹²².

Uma vez no tecido inflamado, os eosinófilos tornam-se ativados e liberam substâncias citotóxicas, como radicais livres de oxigênio e proteínas granulares tóxicas (MBP, ECP e EPO), bem como sintetizam e liberam mediadores inflamatórios, incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-16, TGF- β , RANTES, eotaxina, mediadores lipídicos (PAF e LTC₄) os quais podem intensificar a resposta inflamatória^{59,117-119,123,124}. A liberação das proteínas granulares tóxicas se dá pelo processo denominado de desgranulação, podendo esta ocorrer via três mecanismos: exocitose clássica (grânulo secundário se funde diretamente com a membrana plasmática liberando completamente o conteúdo granular para o meio extracelular), desgranulação gradativa (pequenas vesículas se formam a partir do grânulo secundário e transportam pequenas quantidades de proteínas granulares para a superfície celular, resultando em perda progressiva do conteúdo granular) e citólise (processo de morte celular altamente organizado em que a membrana

celular perde sua integridade resultando e secreção do conteúdo granular). O conteúdo granular acarreta danos ao epitélio da vias aéreas e à matriz extracelular, bem como exposição de terminações nervosas que gera hiperreatividade das vias aéreas, contração das células musculares lisas das vias aéreas e aumento da permeabilidade vascular ^{125,126}.

Tendo em vista que, eventos vivenciados pela mãe no período pré-natal são capazes de promover alterações duradouras na prole, aqui utilizamos ferramentas experimentais que mimetizam eventos estressores, tais como a administração de corticóides exógenos e a exposição à endotoxina, na fase final da gestação, período fundamental para o desenvolvimento neuro-endócrino-imune. A prole adulta foi submetida a um modelo experimental de asma alérgica induzida por OVA. Assim, neste trabalho, buscamos determinar a influência destes eventos pré-natais sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

O principal objetivo deste projeto foi avaliar o perfil da resposta inflamatória pulmonar alérgica em descendentes adultos, machos e fêmeas, expostos prenatalmente à dexametasona e ao LPS.

Objetivos específicos

Em ratos adultos previamente imunizados e desafiados com ovalbumina (OVA), expostos na fase pré-natal à dexametasona ou LPS, avaliar:

- O conteúdo celular (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) na medula óssea, sangue circulante e lavado broncoalveolar, na idade adulta, de animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- Os níveis de corticosterona plasmática.

Materials e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, com idade variando entre 60 e 75 dias provenientes do acasalamento de ratos machos e fêmeas fornecidos pelo CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica UNICAMP) e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UNICAMP. Os animais foram mantidos sob cuidados rotineiros, ou seja, com ração e água *ad libitum*, mantendo-se ciclo de 12h claro/ 12h escuro e temperatura de 26 ± 3 graus Celsius.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - CEEA-IB-UNICAMP sob protocolo número 567-1 em 04/07/2003, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Acasalamento e prenhez

Para o acasalamento, duas fêmeas Wistar (12-16 semanas) nulíparas foram colocadas com um macho (12-16 semanas) por noite. Na manhã seguinte foi determinado o dia 0 gestacional através da presença de plug vaginal.

As ratas prenhes foram mantidas isoladas em gaiolas, sob os cuidados rotineiros e, em determinado momento da gestação, expostas aos procedimentos experimentais pré-natais. Em ratos, o período gestacional é de 21 dias.

2.3 Exposição pré-natal à dexametasona

As fêmeas prenhes foram submetidas a injeção subcutânea diária de 0,1 mg/kg de dexametasona (DEX) no 17º, 18º, 19º e 20º dias de gestação, conforme metodologia adaptada de Bakker e colaboradores¹²⁷. As ratas controle foram submetidas, no mesmo período, a injeção de salina.

Após o nascimento, os animais foram pesados e mantidos na proporção de 4 machos e 4 fêmeas por ninhada, o gênero foi determinado pela distância anu-genital. Estes animais foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias), quando foram novamente pesados e posteriormente separados por sexo. Foram mantidos sob os cuidados rotineiros até que completassem idade ideal para a experimentação (entre 60 e 75 dias de vida).

2.4 Exposição pré-natal ao LPS

As fêmeas prenhes foram submetidas a administração intraperitoneal de LPS (7 µg/Kg), administrado no 17º dia gestacional. Outro grupo de fêmeas recebeu aminoguanidina, na dose de 50 mg/rato/dia na água de beber, oferecida a partir do 13º dia gestacional¹²⁸. Um terceiro grupo de fêmeas recebeu aminoguanidina (50 mg/rato/dia na água de beber, oferecida a partir do 13º dia

gestacional) e no 17º dia gestacional injeção intraperitoneal de LPS (7 µg/Kg). Doses superiores de LPS foram testadas (350 µg/Kg; 100 µg/Kg; 30 µg/Kg; 10 µg/Kg), porém provocaram aborto e/ou morte materna.

Após o nascimento, os animais foram pesados e mantidos na proporção de 4 machos e 4 fêmeas por ninhada. Estes animais foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias), quando foram novamente pesados e posteriormente separados por sexo. Foram mantidos sob os cuidados rotineiros até que completassem idade ideal para experimentação (entre 60 e 75 dias de vida).

2.5 Modelo de reação inflamatória alérgica pulmonar

2.5.1 Sensibilização e provocação antigênica

Os animais expostos prenatalmente expostos à DEX ou ao LPS (e/ou AG) foram sensibilizados, na fase adulta, através de injeção subcutânea no dorso (0.15 ml) de uma solução contendo 200 µg de ovoalbumina (OVA – grau III, Sigma) adsorvida em 8 mg de hidróxido de alumínio, preparada em solução fisiológica. Os animais não sensibilizados receberam, em vez de OVA, igual volume de hidróxido de alumínio. Quatorze dias após a sensibilização, todos os animais receberam o desafio antigênico. Para isto, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.) e submetidos a uma incisão no pescoço para que recebessem a injeção intratraqueal de 0.4 ml de solução fisiológica contendo OVA (2.5 mg/ml). As incisões foram suturadas imediatamente e os animais, após recuperados da anestesia, tiveram acesso à água e à comida.

2.5.2 Lavado broncoalveolar

Os lavados broncoalveolares (LBA) foram realizados 48 horas após o desafio antigênico com OVA. Os animais foram anestesiados com halotano, a cavidade peritoneal exposta e a artéria abdominal transeccionada para exsanguinação. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com o auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro interno). O LBA foi realizado com 25 ml de tampão fosfato salina (PBS) à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado em 4 alíquotas, sendo a primeira de 10 ml e as demais de 5 ml. O material recolhido foi centrifugado a 400 g, por 10 min à 20° C e o resíduo celular ressuspenso em 2ml de solução PBS.

A contagem do número total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer, através da diluição de uma alíquota de 20 µl do lavado diluída em solução de Turk (1:20). A análise diferencial dos tipos celulares foi realizada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem de no mínimo 200 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan – Instrumentos Científicos, Brasil) e corado com Diff-Quick® (hematoxilina-eosina). Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são mostrados como número de células x 10⁶/LBA. As contagens celulares sempre foram realizadas pelo mesmo experimentador.

2.5.3 Definição dos grupos experimentais

Após a provocação antigênica formaram-se os seguintes sub-grupos experimentais:

- Protocolo de exposição pré-natal à DEX: Controle-Não sensibilizado (SAL4-NS); Controle-Sensibilizado (SAL4-OVA); DEX-Não sensibilizado (DEX-NS); DEX-Sensibilizado (DEX-OVA).
- Protocolo de exposição pré-natal ao LPS: Controle-Não sensibilizado (SAL1-NS); Controle-sensibilizado (SAL1-OVA); LPS-Não sensibilizado (LPS-NS); LPS-Sensibilizado (LPS-OVA); AG-Não sensibilizado (AG-NS); AG-Sensibilizado (AG-OVA); AG+LPS-Não sensibilizado (AGLPS-NS); AG+LPS-Sensibilizado (AGLPS-OVA).

2.6 Contagem de células da medula óssea e do sangue

Os animais foram anestesiados com halotano e amostras de sangue circulante coletadas através da artéria abdominal em tubos contendo heparina. Para determinação do número de células da medula, os animais foram sacrificados e o fêmur direito removido; em seguida, a medula óssea foi suavemente eluída com 2,5 ml de PBS contendo heparina (20 UI/ml). A contagem total dos leucócitos foi realizada como descrito acima. A contagem diferencial do sangue foi realizada em lâminas de esfregaço e a da medula em lâminas preparadas em citocentrífuga, coradas com Diff-Quick®.

Os valores da contagem do sangue foram expressos como número de células ($\times 10^6$) por ml. Os dados da medula foram representados como número de células ($\times 10^6$) por fêmur.

2.7 Reação inflamatória pulmonar induzida pelo LPS

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.) e submetidos a uma incisão no pescoço para que recebessem uma injeção intratraqueal de 0.4 ml de solução fisiológica contendo LPS (750 μ g/cavidade). As incisões foram suturadas imediatamente. Após 4 h, os animais foram anestesiados com halotano; a cavidade peritoneal exposta e a artéria abdominal transeccionada para exsanguinação. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com o auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro interno). O LBA foi realizado com 25 ml de PBS à temperatura ambiente. O material recolhido foi centrifugado a 400g, por 10 min à 20° C e o resíduo celular ressuspenso em 2 ml de solução PBS. A contagem do número total de leucócitos foi feita em câmara de Newbauer, através da diluição de uma alíquota de 20 μ l do lavado diluída em solução de Turk (1:20). A análise diferencial dos tipos celulares foi realizada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem de no mínimo 200 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan – Instrumentos Científicos, Brasil) e corado com Diff-Quick®. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são mostrados como número de células $\times 10^6$ /LBA.

2.8 Determinação da concentração de corticosterona plasmática

Os animais foram sacrificados 48 h após a injeção intratraqueal de OVA, o sangue coletado e o plasma separado. O material foi armazenado à – 20°C. A dosagem de corticosterona foi realizada através de kit comercial da R&D Systems (EUA).

2.9 Determinação dos níveis de TNF- α no LBA

Os animais foram sacrificados 48 h após a injeção intratraqueal de OVA, e o LBA coletado. Os níveis de TNF- α foram medidos utilizando-se ensaio de imunoadsorção (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA).

2.10 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido teste de Bonferroni ou teste “t” Student, quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Exposição pré-natal à dexametasona

3.1.1 Determinação do peso corpóreo dos descendentes ao nascer e desmame

Avaliamos o efeito da exposição pré-natal à dexametasona sobre o peso corpóreo dos descendentes ao nascer e no desmame (Tabelas 1 e 2).

A exposição pré-natal à dexametasona não alterou o peso dos descendentes fêmeas ao nascer. No desmame, notamos que a exposição pré-natal à dexametasona levou à redução discreta, porém significativa, no peso da ninhada (aproximadamente 10,5%) (Tabela 1).

Em descendentes machos, a exposição pré-natal à dexametasona não alterou o peso ao nascer. No desmame, notamos que a exposição pré-natal à dexametasona levou à redução significativa no peso da ninhada (aproximadamente 7,1%) (Tabela 2).

Tabela 1. *Peso corpóreo (g) dos descendentes fêmeas controle (Sal 4) ou expostos a dexametasona pré-natal (DEX) ao nascer e desmame.*

	NASCIMENTO	DESMAME
SAL4	6,0 ± 0,1	47,6 ± 0,5
DEX	5,7 ± 0,3	42,6 ± 1,2 *

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. de 6-15 animais; * p < 0,05 quando comparado ao controle.

Tabela 2. *Peso corpóreo (g) dos descendentes machos controle (Sal 4) ou expostos a dexametasona pré-natal (DEX) ao nascer e desmame.*

	NASCIMENTO	DESMAME
SAL4	6,2 ± 0,1	50,5 ± 1,2
DEX	6,1 ± 0,2	46,9 ± 1,1 *

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. de 7-10 animais; * p < 0,05 quando comparado ao controle.

3.1.2 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em fêmeas adultas expostas no período pré-natal à dexametasona

Os dados de leucócitos totais no LBA de fêmeas estão apresentados na figura 1A. Nesta figura mostramos que não há diferença significativa entre os grupos estudados.

Em relação aos neutrófilos, observamos que a quantidade destas células no LBA em 48 horas é muito pequena, como esperado para o tempo de obtenção do LBA. Não observamos diferença entre os grupos controle e expostos à dexametasona pré-natal (Figura 1B).

Na figura 1C podemos observar que o número de eosinófilos no LBA dos animais sensibilizados e desafiados com OVA é significativamente maior em relação ao grupo de animais não sensibilizados, demonstrando a eficiência do protocolo de sensibilização. Notamos exacerbação do influxo eosinofílico no LBA dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e expostos prenatalmente à dexametasona (aumento de 120%) em relação aos animais controle desafiados com OVA não-expostos à dexametasona.

O número de células mononucleares não foi diferente nos quatro grupos investigados (Figura 1D).

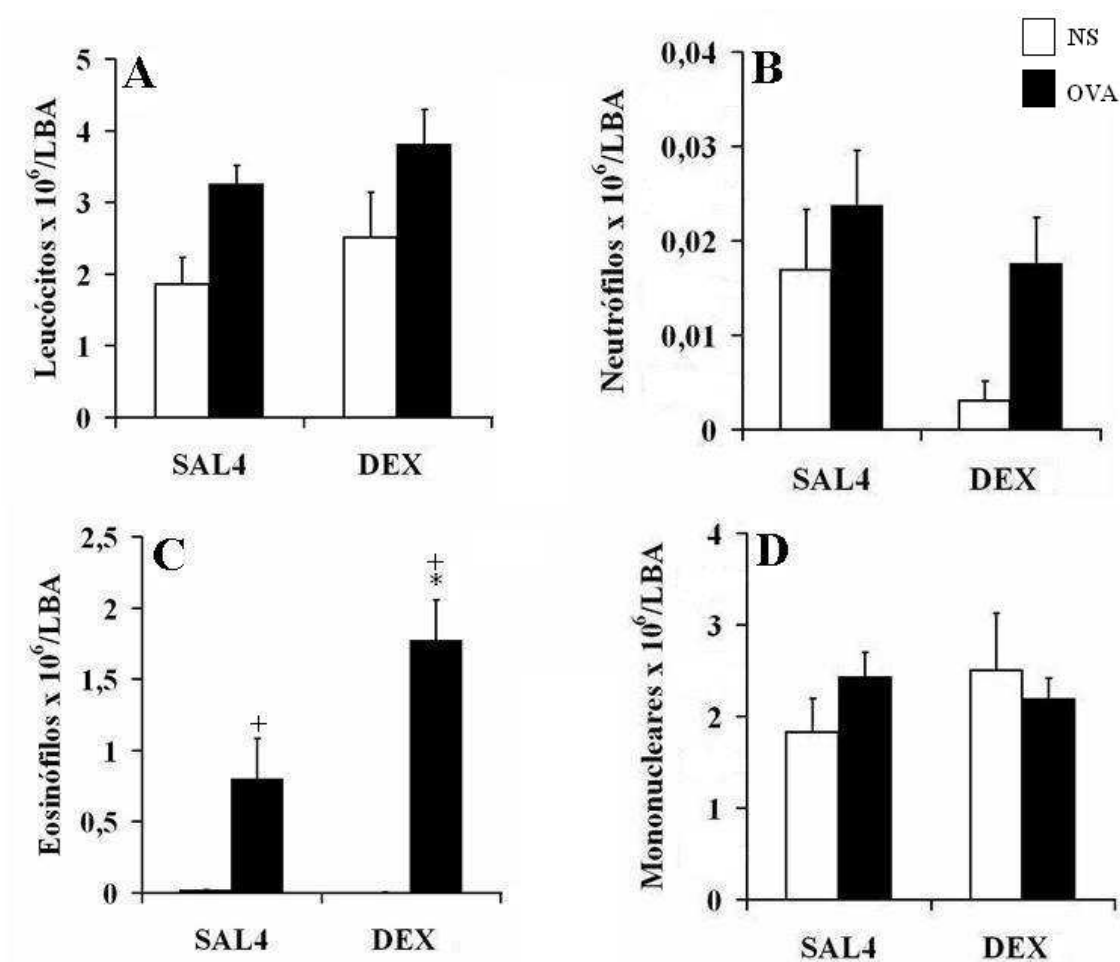


Figura 1. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; SAL4) ou dexametasona (DEX). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-9 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (SAL4); + $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo NS.

3.1.3 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em descendentes fêmeas

O número de leucócitos totais no sangue de animais sensibilizados e desafiados com OVA não se mostrou diferente dos respectivos controle não sensibilizados. Também não notamos diferenças entre os animais expostos prenatalmente à dexametasona sensibilizados e desafiados com OVA em relação aos respectivos controles (Figura 2A). O número de neutrófilos no sangue foi bastante reduzido e não houve diferença entre os grupos.

Na figura 2B mostramos o número de eosinófilos presentes no sangue, que não diferiu entre os grupos estudados.

A contagem de células mononucleares no sangue circulante não foi diferente entre os grupos estudados.

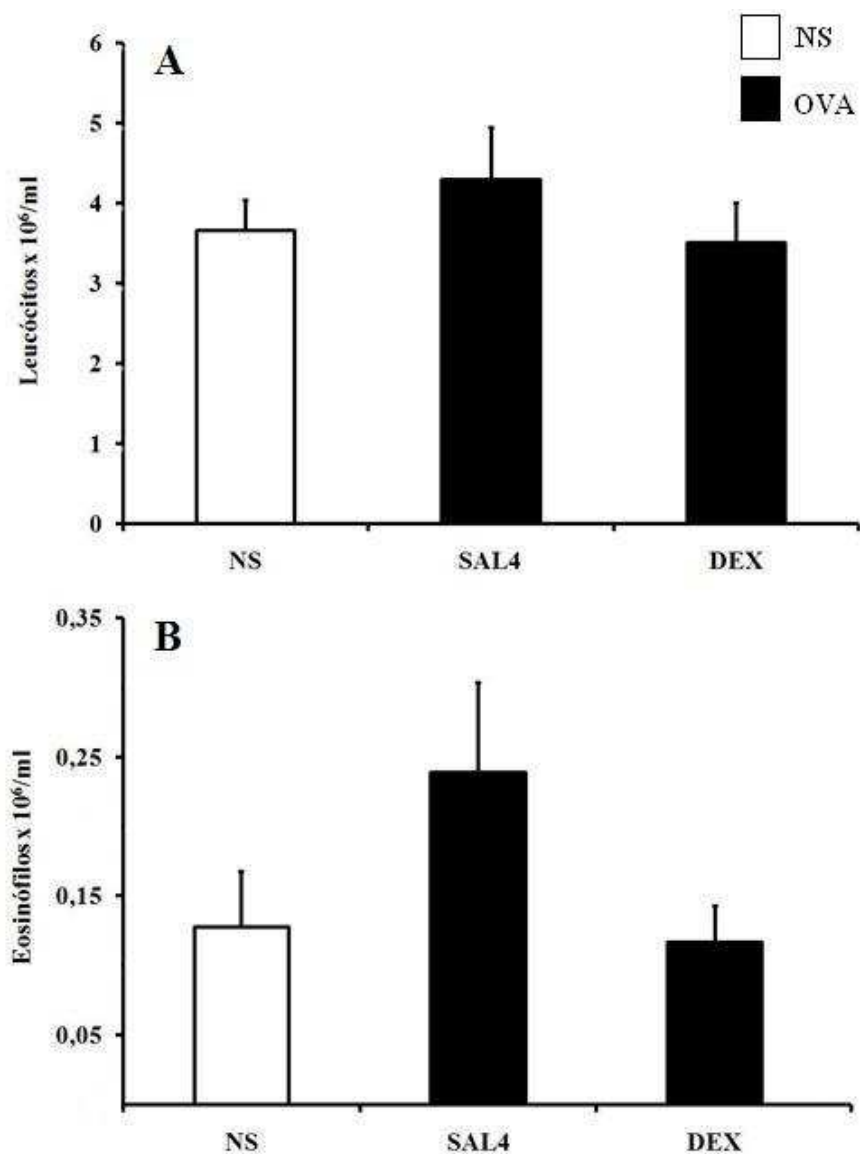


Figura 2. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de fêmeas expostas à salina (controle; SAL4) ou dexametasona (DEX) no período pré-natal. O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-11 animais.

3.1.4 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em fêmeas expostas à dexametasona no período pré-natal

O número leucócitos totais (Figura 3A), neutrófilos maduros e imaturos (Figura 3B), eosinófilos maduros e imaturos (Figura 3C) e outras células (Figura 3D) não foi diferente entre os grupos não-sensibilizados (NS) controle ou expostos prenatalmente à dexametasona.

Na figura 3A mostramos que o número de leucócitos totais nos animais expostos prenatalmente à dexametasona (DEX) não é diferente dos animais controle (SAL4) após desafio com OVA.

O número de neutrófilos maduros e imaturos (Figura 3B) nos animais expostos prenatalmente à dexametasona (DEX) não é diferente dos animais controle (SAL 4) desafiados com OVA. Resultado semelhante foi obtido para os eosinófilos maduros e imaturos (Figura 3C), e outros tipos celulares (Figura 3D).

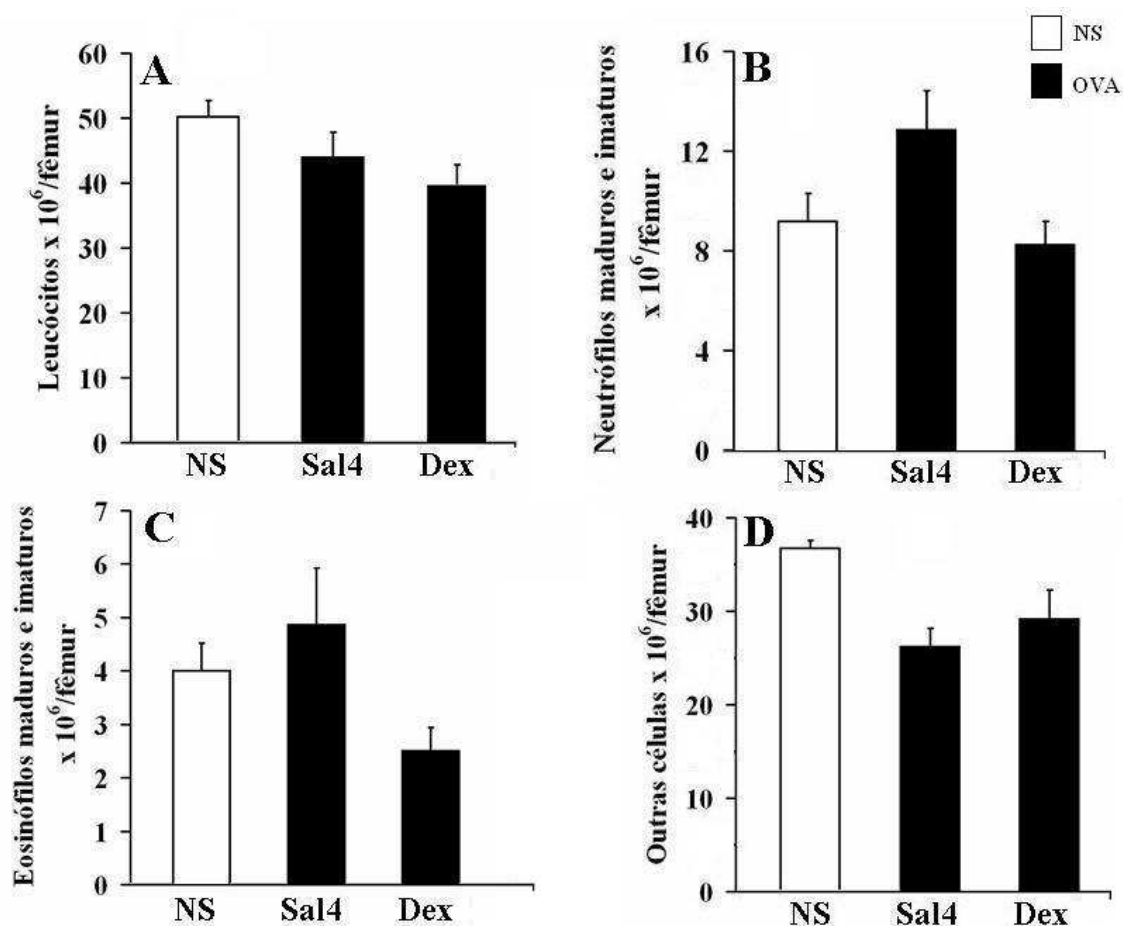


Figura 3. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-11 animais.

3.1.5 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em machos

Os dados de leucócitos totais no LBA de machos adultos expostos à dexametasona no período pré-natal estão apresentados na figura 4A. Nesta figura, mostramos que, entre os animais desafiados com OVA, aqueles expostos prenatalmente à dexametasona apresentaram um maior influxo de leucócitos totais ($p < 0,05$) para o LBA. Estes animais também apresentaram um influxo significativamente maior ($p < 0,01$) quando comparado ao respectivo controle não sensibilizado, o que não foi observado entre os grupos salina.

Em relação aos neutrófilos, observamos que a quantidade destas células no LBA em 48 horas é muito pequena, como esperado para o tempo de obtenção do LBA. Não observamos diferenças entre os grupos controle e expostos à dexametasona pré-natal (Figura 4B).

Na figura 4C podemos observar que número de eosinófilos no LBA dos animais desafiados com OVA aumentou significativamente em relação ao grupo de animais não sensibilizados, demonstrando a eficácia do protocolo de sensibilização. Encontramos exacerbação do influxo eosinofílico no LBA dos animais desafiados com OVA e expostos prenatalmente à dexametasona, que estão 128% ($p < 0,05$) maior em relação aos animais controle desafiados com OVA.

O número de células mononucleares não foi diferente nos quatro grupos investigados (Figura 4D).

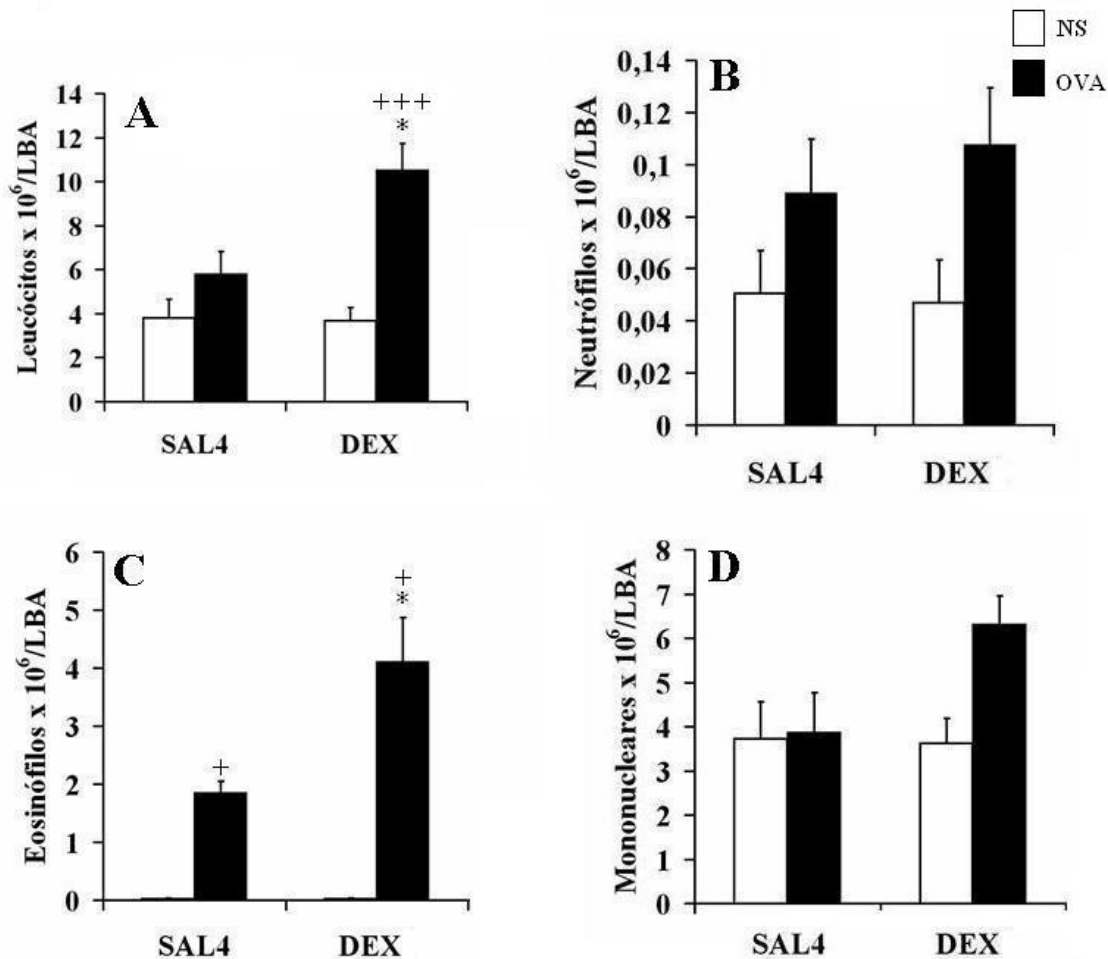


Figura 4. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-7 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; + $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo NS; +++ $p < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo NS.

3.1.6 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em machos

O número de leucócitos totais no sangue de animais desafiados com OVA não se mostrou diferente dos respectivos controle não sensibilizados (NS). Também não notamos diferenças entre os animais expostos prenatalmente à dexametasona desafiados com OVA em relação ao respectivo controle (Figura 5A). O número de neutrófilos no sangue foi bastante reduzido e não houve diferença entre os grupos.

Na figura 5B mostramos o número de eosinófilos presentes no sangue circulante. Os animais expostos à dexametasona pré-natal apresentaram redução significativa deste tipo celular em relação ao grupo controle (salina).

A contagem de células mononucleares no sangue circulante não foi diferente entre os grupos estudados.

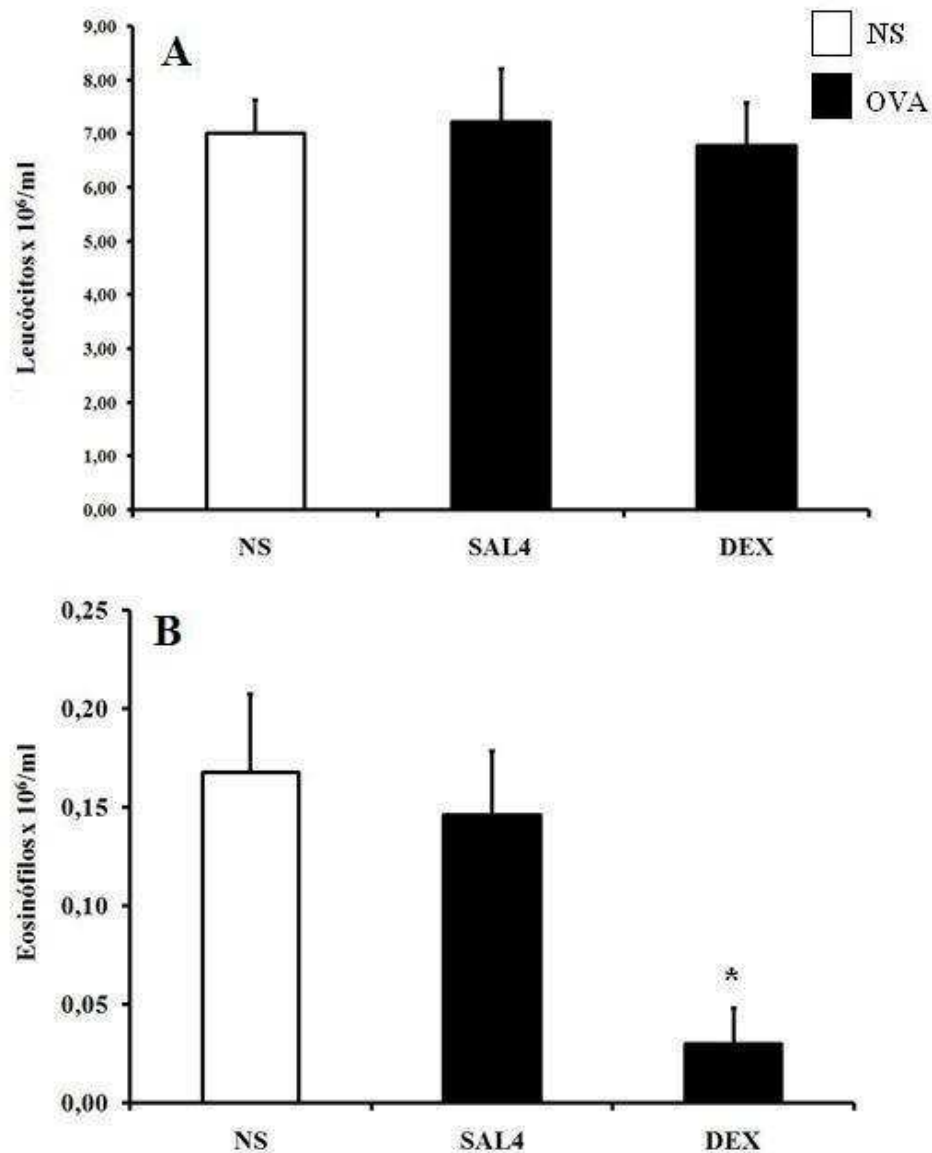


Figura 5. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX) pré-natal. O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-11 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

3.1.7 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em machos adultos expostos à dexametasona no período pré-natal

O número leucócitos totais (Figura 6A), neutrófilos maduros e imaturos (Figura 6B), eosinófilos maduros e imaturos (Figura 6C) e outras células (Figura 6D) não foi diferente entre os grupos não sensibilizados, controle (SAL4) ou expostos prenatalmente à dexametasona.

Na figura 6A mostramos que o número de leucócitos totais não é diferente entre os animais expostos prenatalmente à dexametasona e os animais controle, ambos desafiados com OVA.

O número de neutrófilos maduros e imaturos (Figura 6B) também não é diferente entre os animais expostos prenatalmente à dexametasona e os animais controle, ambos desafiados com OVA. Perfil semelhante de resultado foi encontrado para os eosinófilos maduros e imaturos (Figura 6C) e outros tipos celulares (Figura 6D).

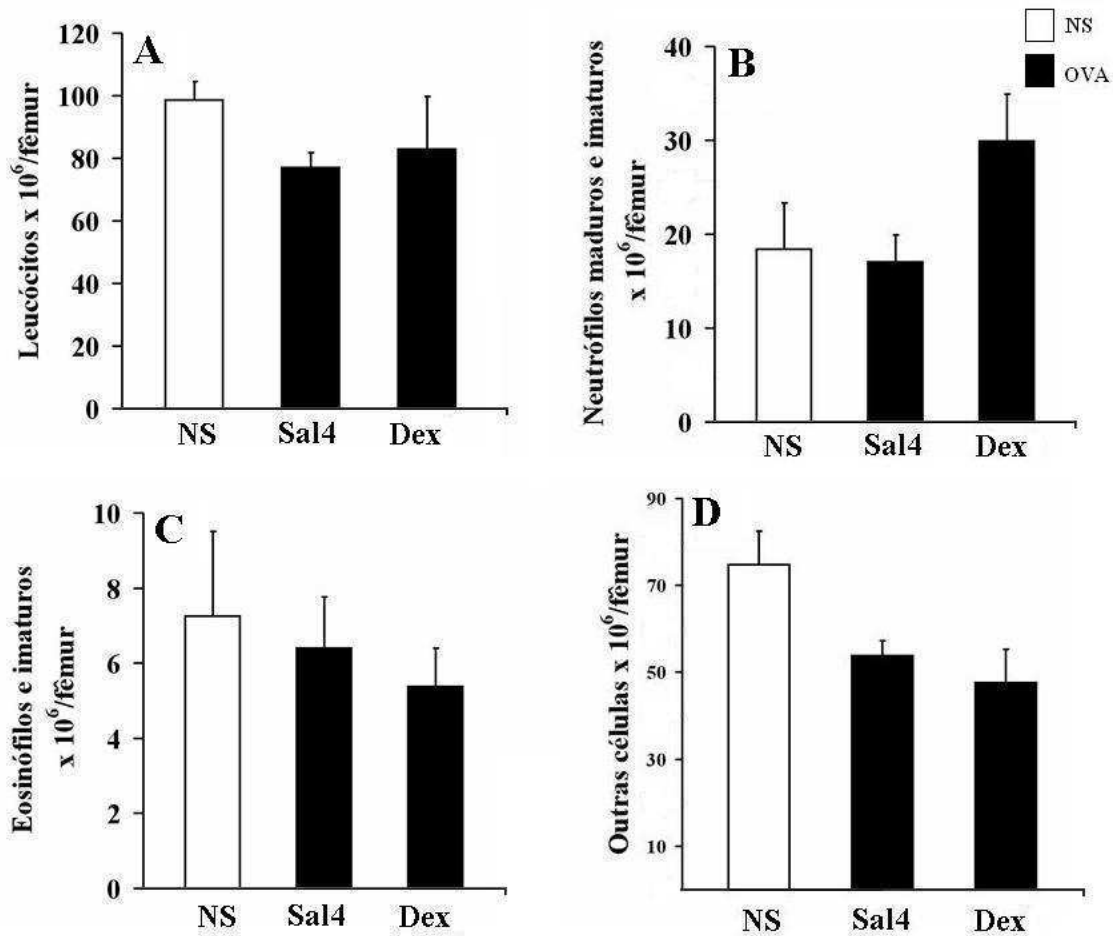


Figura 6. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL4) ou dexametasona (DEX). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-11 animais.

3.2 Exposição pré-natal ao LPS

3.2.1 Determinação do peso corpóreo dos descendentes ao nascer e desmame

Avaliamos o efeito da exposição pré-natal ao LPS sobre o peso corpóreo dos descendentes ao nascer e no desmame (Tabelas 3 e 4). A exposição pré-natal ao LPS promoveu um aumento de 10,5% do peso corpóreo dos descendentes fêmeas ao nascer. Este aumento de peso corpóreo foi ainda mais pronunciado no desmame (aumento de 19%; Tabela 3).

Em machos, a exposição pré-natal ao LPS promoveu um aumento significativo (9,6%) do peso corpóreo dos descendentes ao nascer. No desmame, este aumento de peso corpóreo foi ainda mais pronunciado (22,5%; Tabela 4).

Tabela 3. *Peso corpóreo (g) no nascimento e desmame dos descendentes fêmeas expostos ao LPS no período pré-natal ou grupo controle exposto à salina no período pré-natal (SAL1)*

	NASCIMENTO	DESMAME
SAL1	5,7 ± 0,1	41,9 ± 1,5
LPS	6,3 ± 0,1 *	50,0 ± 0,7 *

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. de 11-12 animais; * p < 0,05 quando comparado ao controle.

Tabela 4. *Peso corpóreo (g) no nascimento e desmame dos descendentes machos expostos ao LPS no período pré-natal ou grupo controle exposto à salina no período pré-natal (SAL1)*

	NASCIMENTO	DESMAME
SAL1	6,0 ± 0,1	43,3 ± 1,0
LPS	6,6 ± 0,1 *	53,1 ± 1,0 *

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. de 11-12 animais; * p < 0,05 quando comparado ao controle.

3.2.2 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em fêmeas adultas expostos ao LPS no período pré-natal

Os dados de leucócitos totais no LBA estão apresentados na figura 7A. Nesta figura mostramos que não há diferenças entre os grupos estudados.

Em relação aos neutrófilos, observamos que a quantidade destas células no LBA em 48 h é muito pequena, como esperado para o tempo de obtenção do LBA. Não observamos diferenças entre os grupos estudados (Figura 7B).

Na figura 7C podemos observar que número de eosinófilos no LBA dos animais desafiados com OVA aumentou significativamente em relação aos respectivos grupos de animais não sensibilizados, demonstrando a eficácia do protocolo de sensibilização. Tal diferença não ocorreu nos animais expostos prenatalmente ao LPS. Encontramos uma redução significativa do influxo eosinofílico, de 66,5%, no LBA dos animais desafiados com OVA e expostos prenatalmente ao LPS em relação aos animais controle. O pré-tratamento com aminoguanidina (AG) preveniu tal redução, mantendo o influxo eosinofílico igual aos valores controles (grupo AGLPS).

O número de células mononucleares não foi diferente nos grupos investigados (Figura 7D).

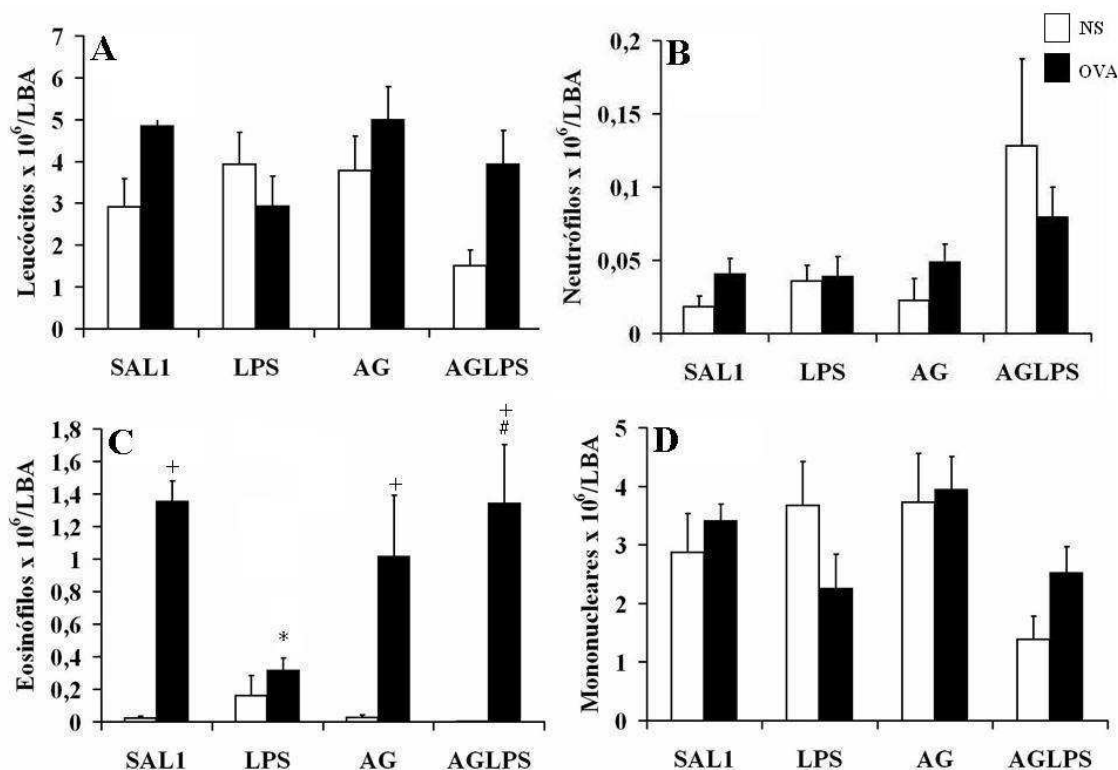


Figura 7. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-11 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL1 OVA, # $p < 0,05$ quando comparado aos animais LPS; + $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo NS.

3.2.3 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em fêmeas adultas expostas ao LPS no período pré-natal

O número de leucócitos totais no sangue de animais sensibilizados e desafiados com OVA não se mostrou diferente dos respectivos controle não sensibilizados. Também não notamos diferenças entre os animais expostos prenatalmente ao LPS desafiados com OVA em relação aos outros grupos estudados (Figura 8A). O número de neutrófilos no sangue foi bastante reduzido e não houve diferença entre os grupos.

Na figura 8B mostramos o número de eosinófilos presentes no sangue circulante. O desafio com OVA no grupo salina aumentou o número de eosinófilos no sangue circulante em relação aos animais não-sensibilizados (NS). Já nos animais sensibilizados e prenatalmente expostos ao LPS que receberam pré-tratamento com aminoguanidina (AGLPS) houve uma redução no número de eosinófilos quando comparado aos animais desafiados SAL, LPS ou AG.

A contagem de células mononucleares no sangue circulante não foi diferente entre os grupos estudados.

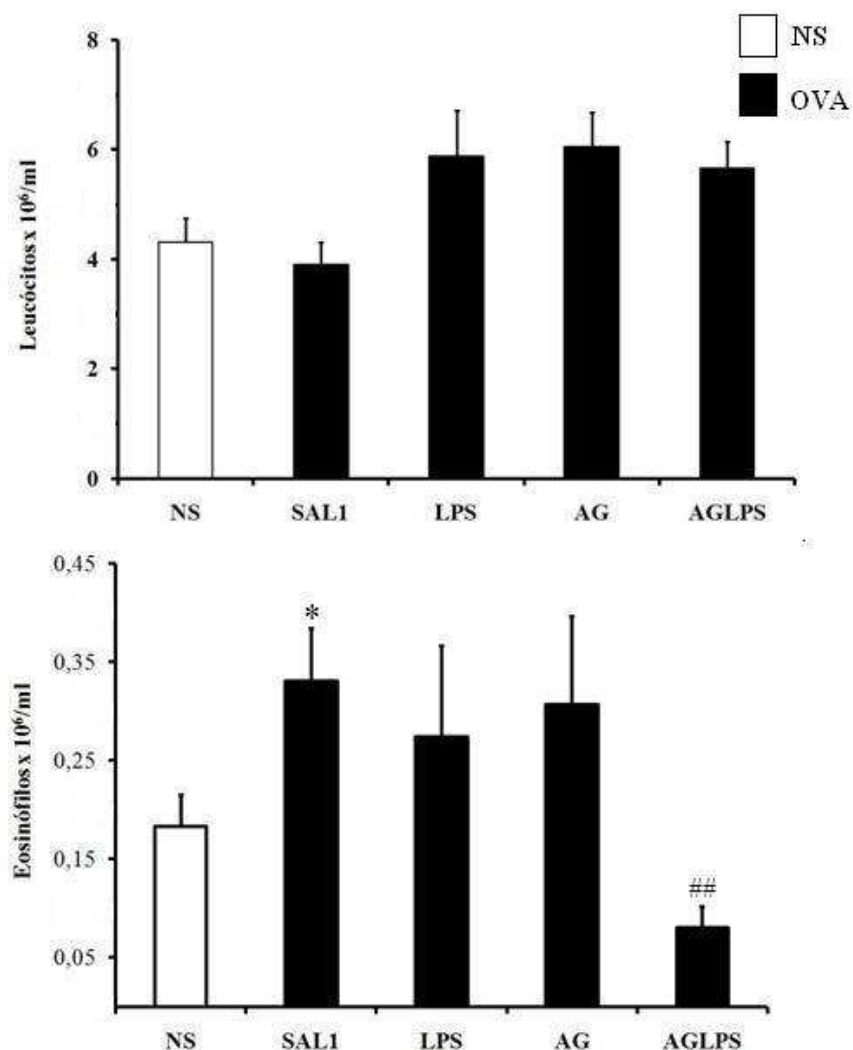


Figura 8. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-20 animais; * $p < 0,05$ quando comparado aos animais NS e ## $p < 0,01$ quando comparado aos animais SAL, LPS ou AG.

3.2.4 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em fêmeas adultas expostas ao LPS no período pré-natal

O número leucócitos totais (Figura 9A), neutrófilos maduros e imaturos (Figura 9B), eosinófilos maduros e imaturos (Figura 9C) e outras células (Figura 9D) não foi diferente entre os grupos não sensibilizados, controle e expostos prenatalmente ao LPS.

Na figura 9A mostramos que o número de leucócitos totais não é diferente entre os animais desafiados com OVA expostos prenatalmente ao LPS ou salina. O pré-tratamento com aminoguanidina também não alterou o número de leucócitos totais na medula óssea.

O número de neutrófilos maduros e imaturos (Figura 9B) mostrou-se maior nos animais desafiados com OVA prenatalmente expostos à aminoguanidina e LPS (grupo AGLPS) em relação ao grupo controle. O número destas células não foi diferente nos outros grupos estudados.

Na figura 9C mostramos que o número de eosinófilos (maduros e imaturos) está reduzido nos animais desafiados com OVA prenatalmente expostos ao LPS em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com aminoguanidina não preveniu as alterações provocadas pelo LPS. O tratamento pré-natal com aminoguanidina não modificou o número de eosinófilos em relação ao controle (SAL1).

Nenhuma diferença significativa foi observada em relação a outros tipos celulares (Figura 9D).

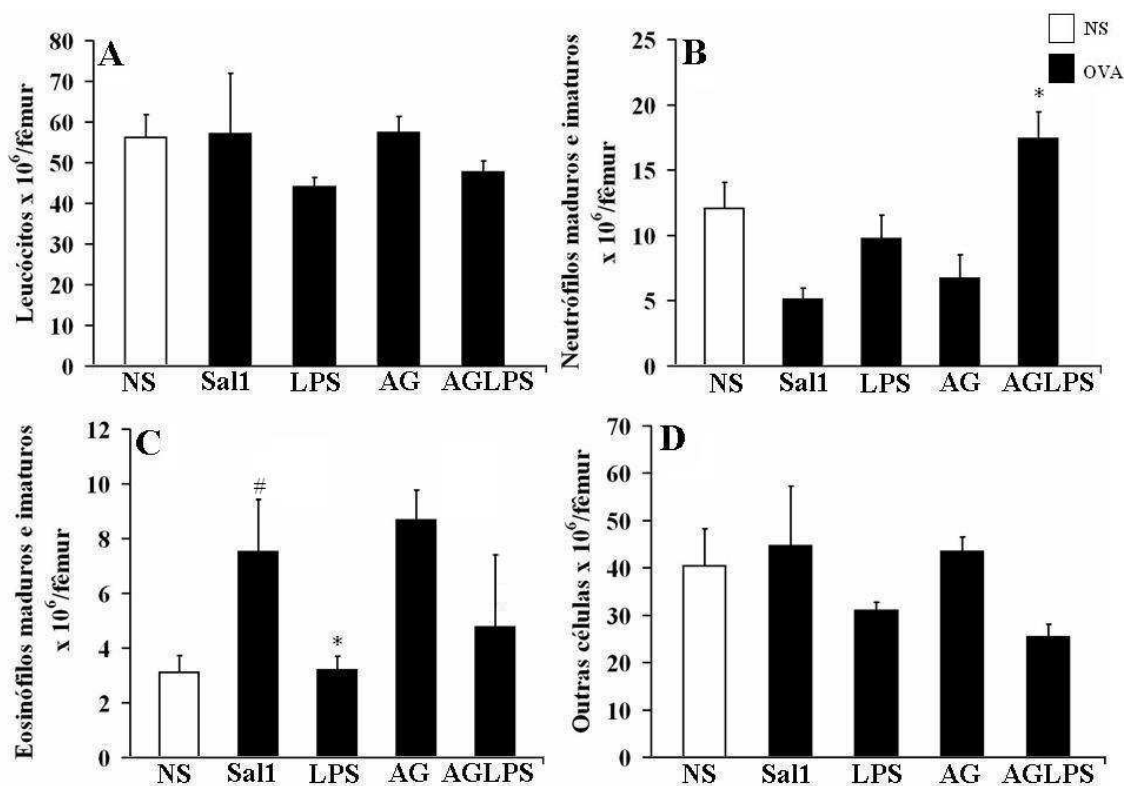


Figura 9. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-20 animais; # $p < 0,05$ quando comparado aos animais NS, * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

3.2.5 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal

Os dados de leucócitos totais no LBA estão apresentados na figura 10A. Nesta figura mostramos que a exposição pré-natal ao LPS reduz o influxo de leucócitos totais para o LBA em animais desafiados com OVA, e que o pré-tratamento com aminoguanidina previne tal redução.

Em relação aos neutrófilos, observamos que a quantidade destas células no LBA em 48 horas é muito pequena. Observamos apenas um aumento significativo desta célula no grupo desafiado com OVA exposto prenatalmente ao LPS e pré-tratado com aminoguanidina (Figura 10B).

Na figura 10C podemos observar que número de eosinófilos no LBA dos animais desafiados com OVA aumentou significativamente em relação aos respectivos grupos de animais não sensibilizados. Encontramos uma redução significativa do influxo eosinofílico (de 66,7%) no LBA dos animais desafiados com OVA e expostos prenatalmente ao LPS em relação aos animais controle. O pré-tratamento com aminoguanidina preveniu tal redução, mantendo o influxo eosinofílico igual aos valores de controle no grupo AGLPS. O tratamento pré-natal com aminoguanidina não modificou o número de eosinófilos em relação ao controle (SAL1).

O número de células mononucleares foi menor nos animais desafiados com OVA expostos prenatalmente ao LPS quando comparado ao controle. O pré-tratamento com aminoguanidina não preveniu as alterações provocadas pelo LPS.

O tratamento pré-natal com aminoguanidina não modificou o número de células mononucleares em relação ao controle (SAL1) (Figura 10D).

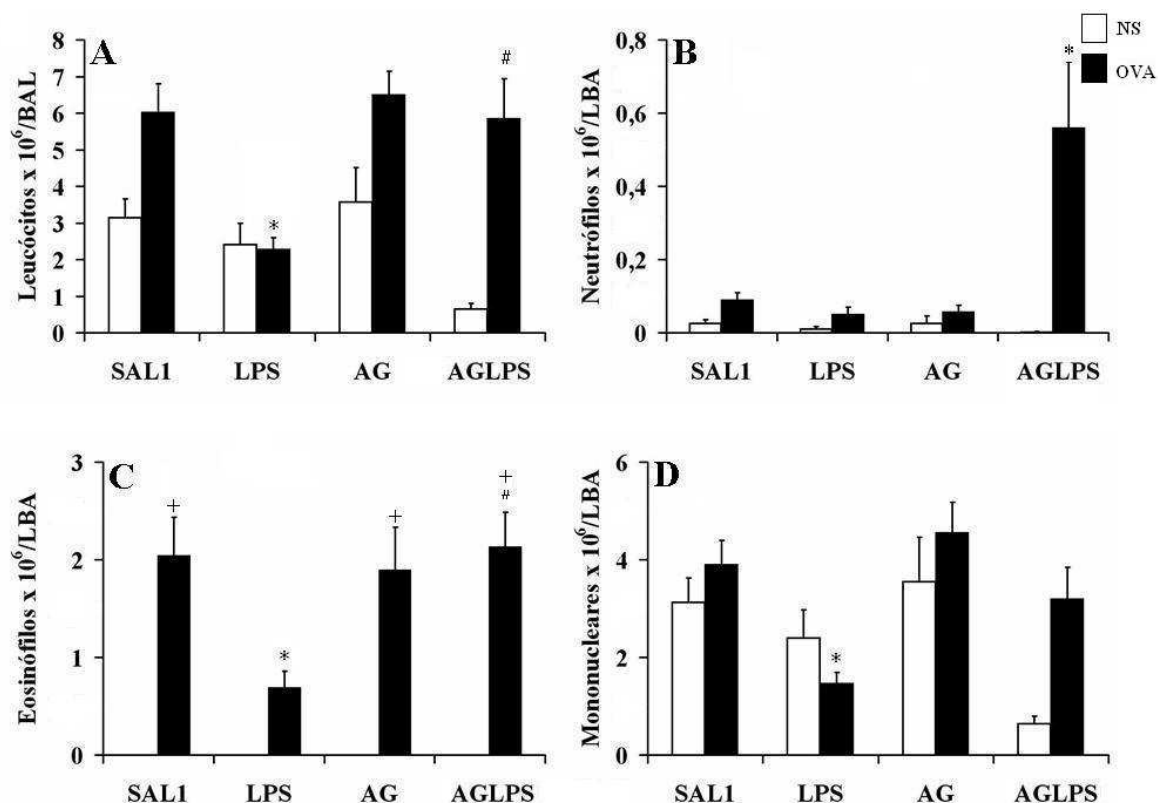


Figura 10. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no LBA de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-12 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL1 OVA, # $p < 0,05$ quando comparado aos animais LPS; + $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo NS.

3.2.6 População de leucócitos totais e eosinófilos no sangue circulante após desafio com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal

O número de leucócitos totais no sangue de animais sensibilizados e desafiados com OVA não se mostrou diferente dos respectivos controle não sensibilizados. Também não notamos diferenças entre os animais expostos prenatalmente ao LPS desafiados com OVA em relação aos outros grupos estudados (Figura 11A). O número de neutrófilos no sangue foi bastante reduzido e não houve diferença entre os grupos.

Na figura 11B mostramos o número de eosinófilos presentes no sangue circulante. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos estudados.

A contagem de células mononucleares no sangue circulante não foi diferente entre os grupos estudados.

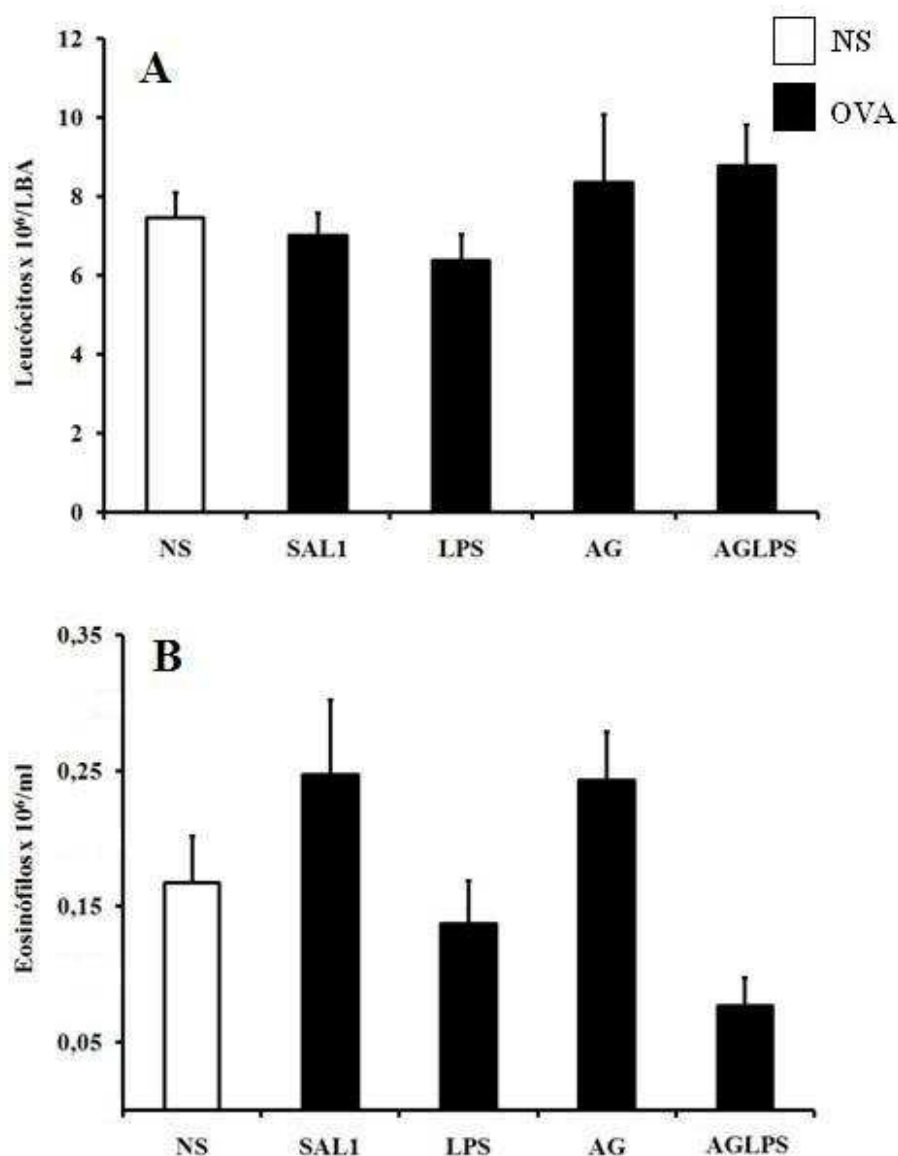


Figura 11. Número de leucócitos totais (Painel A) e eosinófilos (Painel B) no sangue circulante de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-22 animais.

3.2.7 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA em machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal

O número de leucócitos totais (Figura 12A), neutrófilos maduros e imaturos (Figura 12B), eosinófilos maduros e imaturos (Figura 12C) e outras células (Figura 12D) não foi diferente entre os grupos não sensibilizados, controle e expostos prenatalmente ao LPS.

Na figura 12A mostramos que o número de leucócitos totais não é diferente entre os animais expostos prenatalmente ao LPS e os animais controle, ambos desafiados com OVA.

O número de neutrófilos maduros e imaturos (Figura 12B) também não foi diferente entre os animais expostos prenatalmente ao LPS e os animais controle, ambos desafiados com OVA. O mesmo vale para os eosinófilos maduros e imaturos (Figura 12C) e outros tipos celulares (Figura 12D).

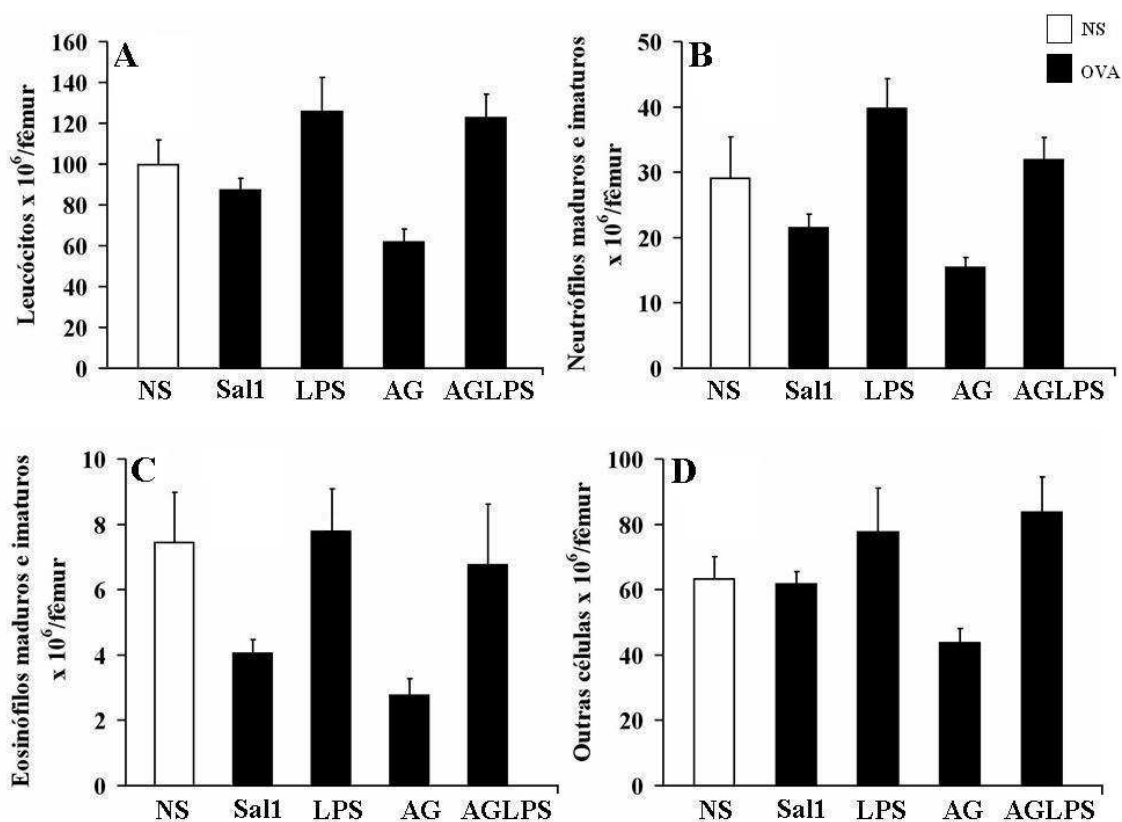


Figura 12. Número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos maduros e imaturos (Painel B), eosinófilos maduros e imaturos (Painel C) e outros tipos celulares (Painel D) na medula óssea de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (SAL1), ou ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à aminoguanidina (AG), ou pré-tratamento com aminoguanidina e após LPS (AGLPS). O número de leucócitos foi avaliado 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5-22 animais.

3.2.8 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após injeção intratraqueal de LPS em fêmeas e machos adultos expostos ao LPS no período pré-natal

A figura 13A mostra que não há diferença no número de leucócitos totais entre as fêmeas prenatalmente expostas ao LPS, quando comparado ao controle, avaliado 4 h após a injeção intratraqueal de LPS.

O número de neutrófilos (o principal tipo celular encontrado neste protocolo) não diferiu entre os animais prenatalmente expostos ao LPS e controle (Figura 13B).

O número de eosinófilos (Figura 13C) e células mononucleares (Figura 13D) também não foi diferente entre os grupos de fêmeas estudados.

Em machos, não houve diferenças no número de leucócitos totais entre os animais prenatalmente expostos ao LPS quando comparado ao controle 4 h após a injeção intratraqueal de LPS (Figura 14A).

Não houve diferenças no número de neutrófilos (Figura 14B), eosinófilos (Figura 14C) e células mononucleares (Figura 14D) entre os grupos de machos estudados.

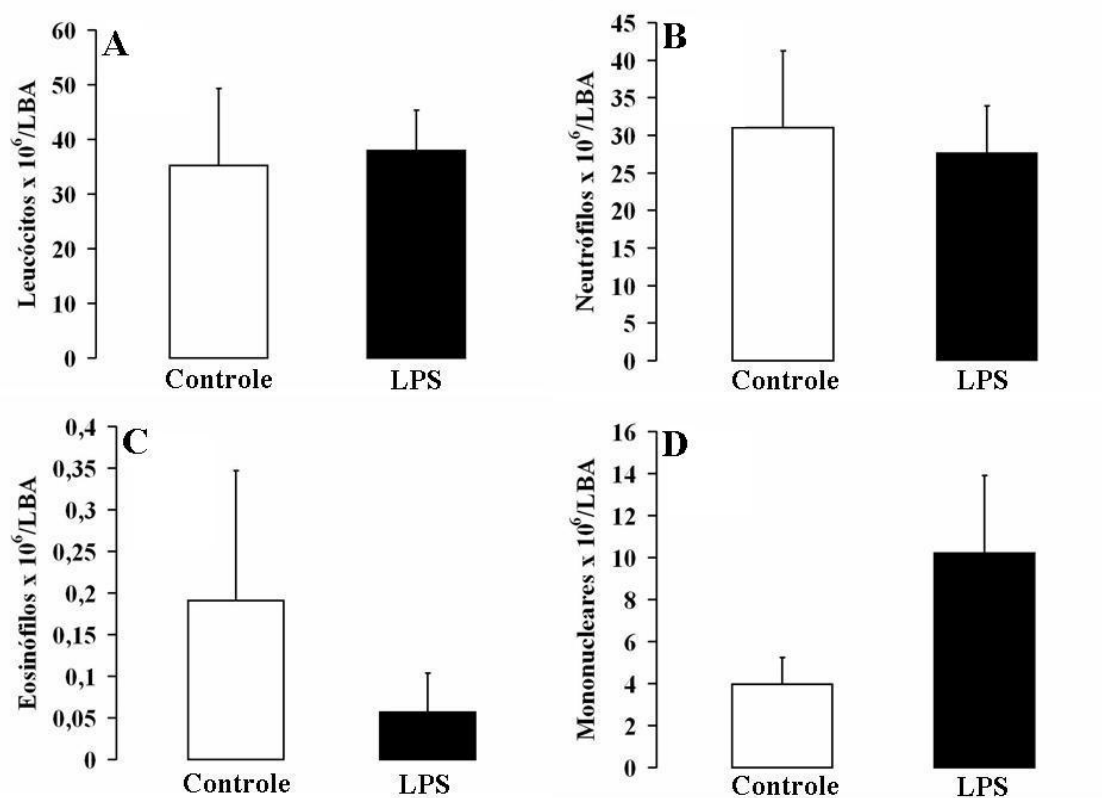


Figura 13. Efeito da injeção intratraqueal de LPS sobre o número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; colunas vazias) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; colunas cheias). O número de leucócitos foi avaliado 4 h após a injeção intratraqueal de LPS. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5 animais.

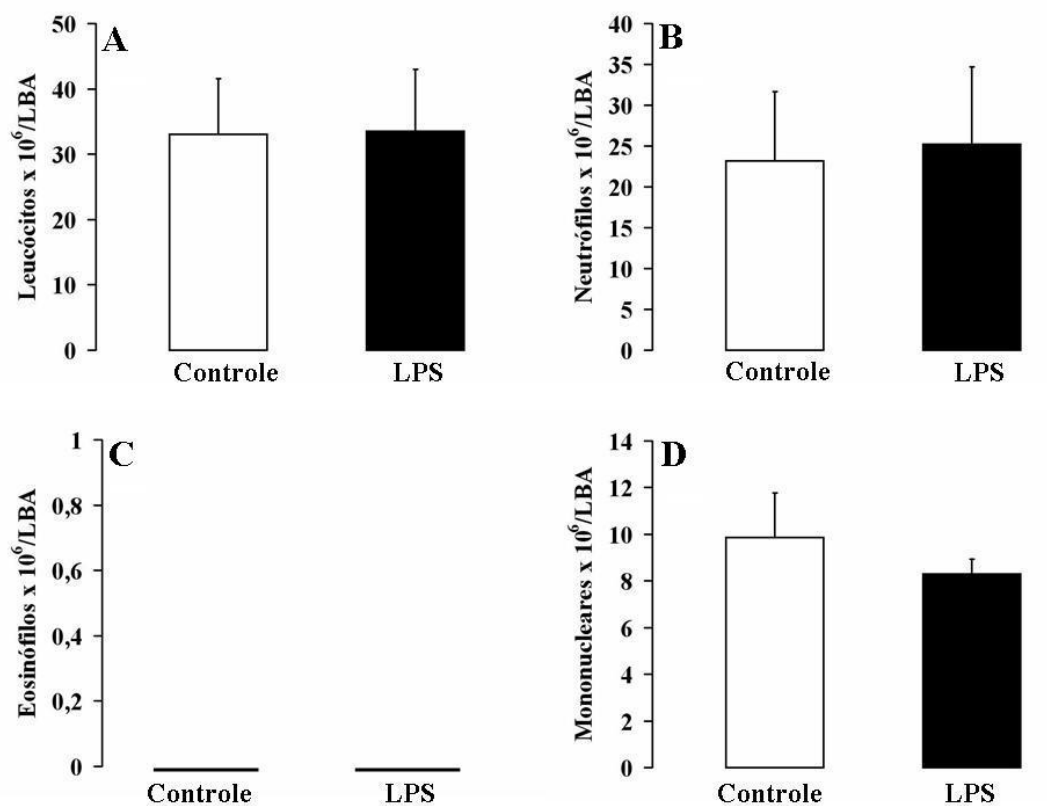


Figura 14. Efeito da injeção intratraqueal de LPS sobre o número de leucócitos totais (Painel A), neutrófilos (Painel B), eosinófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de machos adultos expostos no período pré-natal à salina (controle; colunas vazias) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; colunas cheias). O número de leucócitos foi avaliado 4 h após a injeção intratraqueal de LPS. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5 animais.

3.2.9 Níveis de corticosterona plasmática

Quantificamos as concentrações de corticosterona de ratos controle e prenatalmente expostos ao LPS, 48 h após a administração intratraqueal de OVA.

Em fêmeas, nossos dados revelaram uma redução nos níveis de corticosterona no grupo de animais desafiados com OVA e prenatalmente expostos ao LPS quando comparado ao controle.

Já em machos, observamos uma diferença estatisticamente significativa na concentração de corticosterona dos animais controle desafiados com OVA em relação aos animais não sensibilizados. A exposição pré-natal ao LPS aboliu tal diferença, reforçando o papel do LPS pré-natal em modificar os níveis de corticosterona frente a um desafio.

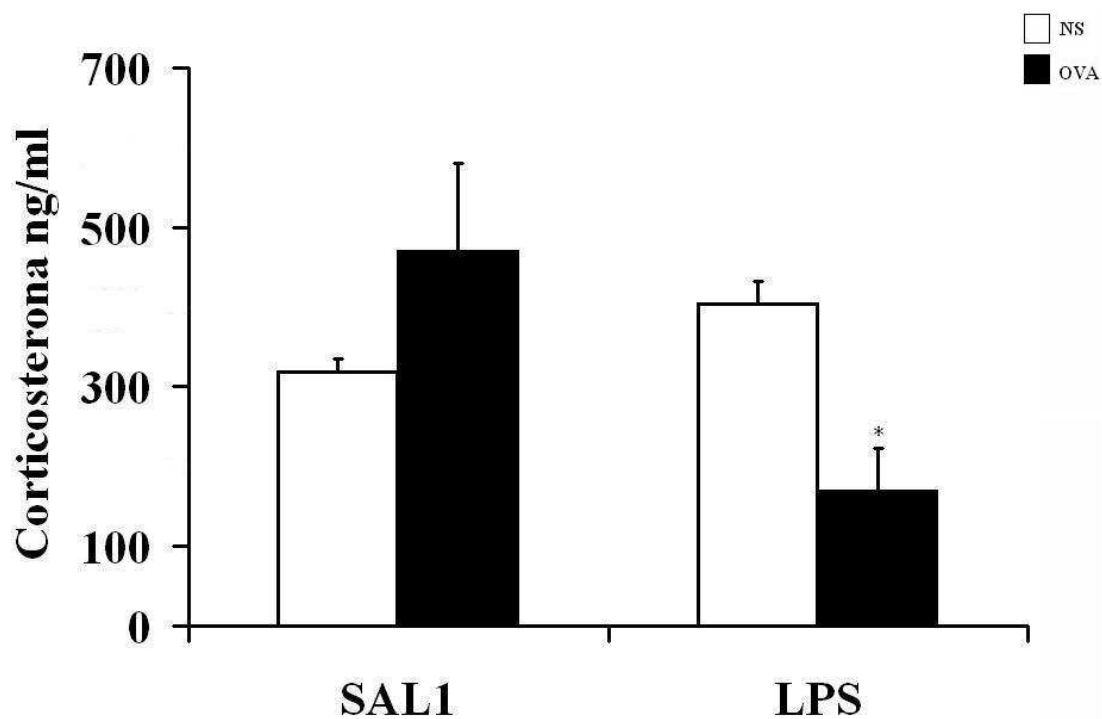


Figura 15. *Concentração de corticosterona em fêmeas adultas expostas no período pré-natal à salina (controle; SAL1) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Os níveis de corticosterona foram determinados em amostras plasma obtidos 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5 animais; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.*

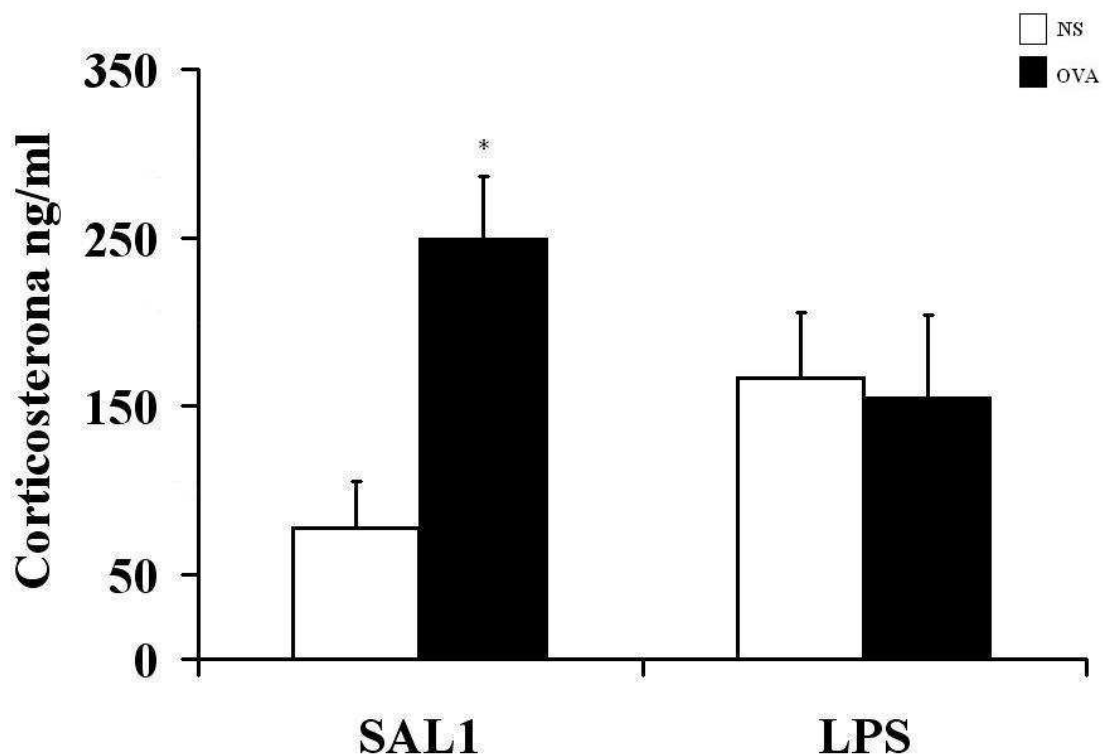


Figura 16. *Concentração de corticosterona em machos adultos expostos no período pré-natal à salina (controle; SAL1) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Os níveis de corticosterona foram determinados em amostras plasma obtidos 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) nos respectivos animais não sensibilizados (NS; colunas vazias) e sensibilizados (OVA; colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 5 animais; * $p < 0,05$ quando comparado aos animais não sensibilizados.*

3.3 Níveis de TNF- α no LBA

Quantificamos os níveis de TNF- α de ratos machos e fêmeas controle (SAL4 ou SAL1) e prenatalmente expostos à dexametasona, ao LPS ou submetidos ao pré-tratamento com aminoguanidina e expostos ao LPS (AGLPS), 48 h após a administração intratraqueal de OVA.

Os níveis desta citocina foram muito baixos ou não detectáveis em todos os grupos, tanto em machos quanto em fêmeas.

Discussão

IV. Discussão

No presente estudo, expusemos ratas prenhes a dois diferentes “estressores” no período pré-natal, dexametasona ou LPS, e observamos a resposta alérgica pulmonar durante a vida adulta da prole.

A terceira fase da gestação em ratos (14 a 21 dias de gestação) é aceita como um período crítico no qual a exposição a “estressores” químicos e físicos podem produzir desordens nos descendentes adultos^{21,129}. Neste estudo, a prole de fêmeas e machos que foi exposta ao LPS no período intra-uterino, exibiu uma elevação no peso corpóreo, tanto ao nascer quanto no desmame. Estes dados são compatíveis com aqueles observados por Nilsson e colaboradores¹³⁰. O aumento do peso corpóreo pode ser reflexo da liberação de mediadores vasodilatadores que aumentam o fluxo sanguíneo na placenta, aumentando a oferta de nutrientes e oxigênio. Por outro lado, a exposição pré-natal à dexametasona promoveu, tanto machos quanto em fêmeas, uma redução significativa do peso corpóreo no momento do desmame (aos 21 dias de vida pós-natal), sendo que esta tendência de redução de peso corpóreo já havia sido percebida ao nascimento; porém, não de maneira significativa. A redução de peso programada pela exposição pré-natal à dexametasona já foi relatada tanto em animais quanto em humanos^{131,132}.

O modelo de inflamação alérgica das vias aéreas (modelo de asma) é obtido pela sensibilização do animal com injeção subcutânea de OVA adsorvida em Al(OH)₃, que promove um aumento na produção de anticorpos IgE para este alérgeno. Assim, nos ratos previamente sensibilizados com OVA, o desafio com

este alérgeno produz um recrutamento inicial de neutrófilos, que é seguido de um influxo tardio de eosinófilos; isto é rotineiramente observado entre 24 e 48 horas após o desafio com OVA em ratos^{133,134}. Este perfil de resposta celular foi observado no presente estudo, no qual a prole adulta sensibilizada com OVA e exposta à salina na fase intra-uterina (grupo controle) apresentou uma grande quantidade de eosinófilos no LBA 48 h após o desafio com OVA.

Estudos prévios têm mostrado a capacidade da dexametasona em programar alterações tanto endócrinas quanto imunes na prole de roedores, quando administrada durante a última semana de gestação. Em nosso estudo, utilizamos um protocolo consistindo de injeções i.p. de 0.1 mg/kg de DEX no 17º, 18º, 19º e 20º dias de gestação (adaptado de Bakker e colaboradores¹²⁷). A contagem diferencial no LBA revelou que os animais desafiados com OVA exibiram um influxo de eosinófilos bastante exacerbado em relação aos controles não sensibilizados. Esta resposta foi amplificada nos animais expostos prenatalmente à DEX, tanto em machos como em fêmeas, sugerindo que a dexametasona é capaz de produzir alterações na fase intra-uterina, que repercutem na idade adulta. Nossos achados são compatíveis com trabalhos prévios relatando que a asma pode ser programada pelo estresse pré-natal, uma vez que o estresse é um potente estimulante de produção de corticóides endógenos^{16,135}. A contagem de células mononucleares no LBA também foi maior em machos, sendo que este aumento acabou impactando de maneira também significativa a contagem total de leucócitos. O infiltrado neutrofílico em resposta ao desafio com OVA não foi alterado pela exposição pré-natal à DEX. Entretanto,

devemos enfatizar que o tempo de 48 h após o desafio com OVA não é ideal para avaliação deste tipo celular.

É amplamente reconhecido que o desafio antigênico também ativa a resposta imune sistêmica que provoca a produção de células inflamatórias pela medula óssea¹³⁶. Os eosinófilos são recrutados da medula óssea, onde as células progenitoras se proliferam e se diferenciam dentro do microambiente em resposta a ativação realizada pelas citocinas¹³⁷. Porém, o mecanismo molecular que promove a mobilização dos eosinófilos maduros da medula óssea para o sangue periférico e a sequência de eventos desde sua ativação até o recrutamento para o tecido inflamado ainda é pouco compreendido.

Avaliamos, assim, o perfil de leucócitos no sangue circulante e na medula óssea. Os animais tratados prenatalmente durante 4 dias com salina (controles do grupo DEX) sensibilizados com OVA na vida adulta não apresentaram diferenças significativas na contagem de células tanto no sangue como na medula óssea, quando comparado ao controle não sensibilizado.

Observamos também que os machos expostos à DEX pré-natal, sensibilizados e desafiados com OVA, apresentaram uma redução significativa do número de eosinófilos no sangue circulante, em comparação aos animais expostos à salina pré-natal. Na medula óssea destes machos, a produção de eosinófilos não foi afetada pela exposição pré-natal à DEX. Em fêmeas, não houve diferenças no perfil celular tanto em sangue quanto na medula óssea. Estes dados de sangue e de medula óssea contrastam com o perfil do LBA, tanto para machos quanto para fêmeas. Esta alteração na distribuição de eosinófilos entre os compartimentos ainda precisa ser compreendida.

Outro fenômeno demonstrado por nós é que a exposição materna ao LPS reduziu a infiltração de eosinófilos induzida por alérgeno nas vias aéreas na prole adulta, sendo este fenômeno prevenido pelo pré-tratamento das ratas prenhes com o inibidor da iNOS, aminoguanidina. Para esta parte do trabalho, foi utilizada uma única dose de LPS (7 µg/Kg), administrada por via intraperitoneal no 17º. dia de gestação. Doses maiores de LPS (>10 µg/Kg) foram testadas, mas induziram ao aborto e/ou reabsorção fetal, e por isso não foram empregadas para os estudos subseqüentes. É interessante observar que o aborto causado por LPS em camundongos é prevenido pelo pré-tratamento com aminoguanidina, indicando que a administração materna de LPS exerce efeito direto sobre os trofoblastos, estimulando a indução de iNOS e aumentando a produção de NO, sendo este processo diretamente relacionado com a morte embrionária¹³⁸. Um estudo mais recente também mostrou que a administração intraperitoneal de LPS ou do doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicillamina, em fêmeas prenhes de camundongo provocou 100% de reabsorção embrionária, sendo este efeito significativamente revertido com aminoguanidina¹³⁹.

O resultado da contagem de células no LBA mostrou que o aumento na infiltração de eosinófilos nas vias aéreas nos animais sensibilizados foi marcadamente atenuado na prole exposta ao LPS no período pré-natal. Além disso, o pré-tratamento das ratas no período gestacional com aminoguanidina preveniu os efeitos do LPS sobre o número de eosinófilos no LBA dos descendentes. Isto sugere que a redução na infiltração eosinofílica pela exposição materna ao LPS depende da ativação da iNOS. É bastante provável que a exposição acentuada ao NO no período pré-natal influencia o recrutamento de

eosinófilos nas vias aéreas nos filhotes adultos desafiados com alérgeno. Além dos eosinófilos, o tratamento pré-natal com LPS reduziu (porém, em menor magnitude) o número de células mononucleares no LBA, sendo esta redução não significativamente prevenida pelo tratamento materno com aminoguanidina. As contagens de neutrófilos não foram significativamente afetadas pela exposição materna ao LPS, embora o tempo de 48 h após o desafio com OVA não seja o ideal para avaliar neutrófilos. Já há relato na literatura que a exposição ao LPS no período perinatal é capaz de reduzir a resposta inflamatória na vida adulta⁷⁹. De maneira geral, nossos dados de LBA sugerem que o NO derivado da iNOS durante a gestação atua regulando preferencialmente o tráfego de eosinófilos na prole adulta.

Em humanos, a exposição ao LPS previne a asma alérgica. Braun-Fahrlander e colaboradores, em 2002⁸⁴ observaram, em crianças com idade variando entre 6 e 13 anos, uma relação inversa entre os níveis de LPS e asma; crianças que dormiam em colchões com altos níveis de endotoxina apresentaram menores índices desta patologia. Estes resultados levam a reflexão sobre a necessidade do uso de procedimentos domésticos de limpeza cada vez mais agressivos.

O presente estudo revelou que na prole fêmea a medula óssea dos animais do grupo não desafiado prenatalmente e sensibilizados com OVA mostrou um aumento no número de eosinófilos 48 h após o desafio, aumento este que foi acompanhado por significativa eosinofilia. Este aumento no número de eosinófilos na medula óssea e no sangue é compatível com estudo prévio que utilizou ratos sensibilizados com OVA¹¹¹. Em acordo com os resultados do LBA, o aumento no

número de eosinófilos na medula óssea também foi bastante atenuado na prole de ratas expostas ao LPS durante a gestação. Contrastando com os dados de LBA, o pré-tratamento com aminoguanidina nas ratas prenhes não reverteu a supressão eosinofílica causada pelo LPS, tanto na medula óssea quanto no sangue. Isto sugere que a ativação da iNOS e a conseqüente produção de NO pela exposição materna ao LPS modula o tráfego de eosinófilos nos filhotes ao nível das vias aéreas, sem o envolvimento de outros compartimentos como medula óssea e sangue circulante. Já em machos, este perfil de resposta celular, tanto em medula óssea quanto em sangue não foi reproduzido; isto se deve, provavelmente, às diferenças existentes entre os gêneros^{140,141}.

O papel dos hormônios sexuais na asma ainda não é bem compreendido. Hayashi e colaboradores¹⁴² observaram uma redução da inflamação brônquica e influxo eosinofílico em camundongos BALB-C machos em comparação com fêmeas, em modelo de inflamação tardia de vias aéreas induzido por OVA. Tais dados são corroborados com os achados de Melgert e colaboradores¹⁴³, que observaram, também em camundongos BALB-C, uma maior resposta ao desafio com OVA em fêmeas em comparação a machos, com um maior influxo eosinofílico, células CD4 (+) células T, células B, e níveis de IL-4, IL-13, interferon-gama e IgE. Por outro lado, o estrógeno reduziu a hiperreatividade brônquica em camundongos BALB-C sensibilizados com OVA e desafiados por 10 dias consecutivos com este mesmo alérgeno¹⁴⁴.

O LPS é conhecido por ativar a resposta imune e estimular monócitos/macrófagos a liberar uma variedade de citocinas inflamatórias como TNF- α ¹⁴⁵. Desta forma, levantamos a hipótese que a produção de TNF- α após o

desafio com OVA poderia estar alterada em animais submetidos à exposição pré-natal. Apesar disto, os níveis de TNF- α no LBA 48 h após o desafio com OVA foram muito baixos, não sendo observadas diferenças entre os grupos. Isto sugere que o TNF- α não participa do mecanismo responsável pela redução do infiltrado eosinofílico observada em animais expostos ao LPS no período pré-natal. Porém, deve-se ressaltar que, na maioria dos sistemas, 48 h não é o tempo ideal para a dosagem de TNF- α após o desafio alérgico. O TNF- α é normalmente detectado em aproximadamente 3 h após o desafio com OVA¹⁴⁶. Este tempo não pôde ser empregado no presente trabalho.

Em um estudo de 2000, Shanks e colaboradores⁷⁷ mostraram que a exposição perinatal à endotoxina bacteriana gram negativa de *Salmonella enteritidis* promoveu alterações, tanto endócrinas sobre o eixo HPA, quanto imunes. É amplamente estabelecido que citocinas inflamatórias estimulam a produção de corticóides endógenos^{14,147}. Em nosso trabalho, avaliamos a concentração plasmática de corticosterona nos animais expostos ao LPS pré-natal. Como esperado, os animais machos desafiados com OVA apresentaram uma concentração basal de corticosterona aumentada em comparação aos não sensibilizados. As fêmeas controle apresentaram o mesmo perfil de resposta, porém não significativo. Ainda em fêmeas, a exposição pré-natal ao LPS reduziu, de maneira significativa, os níveis de corticosterona plasmática nos animais desafiados com OVA, sugerindo que esta exposição pode promover alterações neuroendócrinas na prole adulta. Estes resultados não foram observados em machos.

Outro protocolo experimental utilizado foi o de expor os animais prenatalmente expostos ao LPS (ou salina) à injeção intratraqueal pelo próprio LPS, com o objetivo de avaliar se a resposta a estímulo não-alérgico também é modificada pela estimulação imune pré-natal. A injeção intratraqueal de LPS (750 µg/cavidade) induziu, após 4 horas, um maciço influxo celular, especialmente de neutrófilos, tanto nos animais expostos prenatalmente ao LPS quanto nos controles. Este influxo neutrofílico após a injeção intratraqueal de LPS é compatível com estudos prévios^{148,149}. Neste protocolo não foram observadas diferenças entre os grupos no que se refere ao tratamento pré-natal; porém, deve-se salientar que as alterações produzidas pela exposição pré-natal ao LPS frente ao estímulo alérgico foram observadas 48 h após o desafio antigênico. Assim, seria também adequado observar, futuramente, o comportamento destas células no LBA em uma reposta mais tardia para que se possa afirmar que o desafio imune pré-natal reduz apenas a resposta alérgica.

Conclusões

V. Conclusões

- A exposição pré-natal à dexametasona produziu redução no peso dos animais, no desmame, tanto em machos quanto em fêmeas.
- A exposição pré-natal à dexametasona exacerbou o infiltrado eosinofílico na resposta inflamatória celular alérgica tanto em machos quanto em fêmeas.
- A exposição pré-natal ao LPS promoveu aumento do peso da prole ao nascer e no desmame.
- A exposição pré-natal ao LPS provocou redução na produção de corticosterona em resposta a inflamação alérgica, sugerindo hipoatividade do eixo HPA.
- A exposição pré-natal ao LPS reduziu o influxo de células no LBA, que foi revertido pelo tratamento com AG.

Em resumo, nossos resultados mostram que a exposição pré-natal à dexametasona promove exacerbação da resposta inflamatória alérgica em ratos adultos, ao passo que a exposição pré-natal ao LPS reduz esta resposta através de mecanismo dependente de óxido nítrico oriundo de iNOS.

A exposição a desafios pré-natais promove alterações na inflamação pulmonar alérgica; porém, as características do desafio produzem resultados diferentes.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lederman SA, Rauh V, Weiss L, Stein JL, Hoepner LA, Becker M, Perera FP. The effects of the World Trade Center event on birth outcomes among term deliveries at three lower Manhattan hospitals. *Environmental Health Perspectives*. 2004; 112:1772-8.
2. Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*. 1967; 156:258-60.
3. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews M H, Matthews SG. Fetal Programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*. 2006; 572(Pt 1):31-44.
4. Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young South African adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4611-8.
5. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13:364-8.
6. Ward AM, Syddall HE, Wood PJ, Chrousos GP, Phillips DI. Fetal programming of the hypothalamic-pituitaryadrenal (HPA) axis: low birth weight and central HPA regulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(3):1227-33.
Ward AM, Syddall HE, Wood PJ, Chrousos GP, Phillips DI. Fetal programming of the hypothalamic-pituitaryadrenal (HPA) axis: low birth weight and central HPA regulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(3):1227-33.
7. Secoli SR, Teixeira NA. Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. *Stress*. 1998; 2(4):273-80.

8. Dahlof LG, Hard E, Larsson K. Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system. *Physiology and Behavior*. 1978; 20:193-5.
9. Klein SL, Rager DR. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev Psychobiol*. 1995; 28(6):321-36.
10. Welberg LAM, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroids receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behavior. *Neuroscience*. 2001; 104(1):71-9.
11. Langley-Evans SC, Gardner DS, Jacksno AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Nutrition*. 1996; 126:1578-85.
12. Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offsprings of rats. *Neuroendocrinology*. 1996; 64:412-8.
13. Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offsprings. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101:2174-81.
14. Rettori V, Fernandez-Solari J, Mohn C, Zubilete MAZ, De La Cal C, Prestifilippo JP, De Laurentiis A. Nitric Oxide at the Crossroad of Immunoneuroendocrine Interactions. *Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2009; 1153:35-47.

15. Kay G, Tarcic N, Poltyrev T, Weinstock M. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav.* 1998; 63:397-402.
16. Nogueira PJ, Ferreira HHA, Antunes E, Teixeira NA. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. *Med Inflamm.* 1999; 8:119-22.
17. Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19(9):331-9.
18. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 2001; 13:113-28.
19. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979; 3:79-83.
20. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 2000; 21: 514-50.
21. Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13(9):373-80.
22. Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol.* 1997; 273:1669–75.
23. Motta M, Tincani A, Meroni PL, Cimaz R. Follow-up of children exposed antenatally to immunosuppressive drugs. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47Suppl 3:iii32-4.

24. Crane J, Armson A, Brunner M, De La Ronde S, Farine D, Keenan-Lindsay L, Leduc L, Schneider C, Van Aerde J. Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *J Obstet Gynaecol Can.* 2003; 25:67-79.
25. Linthorst AC, Flachskamn C, Holsboer F, Reul JM. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity. *European Journal of Neuroscience.* 1995; 7(12):2418-30.
26. Besedovski HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; 17: 64-102.
27. Dantzer R, Bluthner RM, Layne S, Bret-Dibat JL, Parnet P, Kelley KW. Cytokines and sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:586-90.
28. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992; 267:54-61.
29. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:635-700.
30. Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem.* 1991; 266:19490-98.
31. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7:167-202.
32. Morrison DC, Ulevitch R.J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol.* 1978; 93:526-617.

33. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, Hacohen N. The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Scienc.* 2001; 294(5543):870-75.
34. Levi MMD, Jonge EMD, van der Poll TMD. Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* 2003; 16(1/2):43-47.
35. Opal SM. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res.* 2002; 8(6):473-76.
36. Raji L, Keane WF, Michael AF. Unilateral Schwartzman reaction: cortical necrosis in one kidney following in vivo perfusion with endotoxin. *Kidney Int.* 1977; 12(2):91-95.
37. Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The generation of superoxide anion in blood platelets in response to different forms of proteus mirabilis lipopolysaccharide: effectes of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb Research.* 2001; 103:149-55.
38. Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002a; 282(3):H1111-17.
39. Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002b; 284:H535-41.
40. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249:1431-33.

41. Gutschmann T, Haberer N, Carroll SF, Seydel U, Wiese A. Interaction between Lipopolysaccharide (LPS), LPS-Binding Protein (LBP), and Planar Membranes. *Biol Chem.* 2001; 382:425-34.
42. Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *PNAS.* 1993; 90:2744-48.
43. Schumann RR, Rietschel ET, Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol.* 1994; 183:279-97.
44. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388:394-97.
45. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274:10689-92.
46. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2 Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J Exp Med.* 1999; 189:1777-82.
47. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12:20-26.
48. Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human Toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation

upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*. 1998; 187:2097-101.

49. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. 2002; 323:59-72.

50. Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol*. 2001; 166:574-81.

51. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*. 2002; 168:4701-10.

52. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*. 2002; 169:2026-33.

53. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res*. 2002; 56:126-34.

54. Igarashi K, Akira S, Imaki J, Takeshita T. Systemic endotoxin induces gene expression of inducible nitric oxide synthase in fetal rat brain. *J Nippon Med Sch*. 2009; 76(5):232-9.

55. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6:3051-64.

56. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-42.
57. Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors in an in vivo allergic rat model. *Eur Respir J.* 2000; 15:870-7.
58. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329:2002-12.
59. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm Rev.* 1999; 51:213-340.
60. Ignarro LJ, Murad F (eds), Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology* 1995; 34:516.
61. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J.* 1994; 298:249-58.
62. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 1998; 12:773-90.
63. Matsuoka A, Stuehr DJ, Olson JS, Clark P, Ikeda-Saito M. L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994; 269:20335-9.
64. Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem.* 1994; 269:32047-50.

65. Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 358:127-33.
66. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1015-28.
67. Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316:290-301.
68. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51(4):383-94.
69. Suzuki T, Mori C, Yoshikawa H, Miyazaki Y, Kansaku N, Tanaka K, Morita H, Takizawa T. Changes in nitric oxide production levels and expression of nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus during pregnancy. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(10):2163-6.
70. Norman JE, Cameron IT. Nitric oxide in human uterus. *Rev Reprod.* 1996; 1:61-8.
71. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2009; 7:79.
72. Graeff H, Kuhn W, Zander J. Endotoxin shock in obstetrics. In. Gram-negative bacterial infections and mode of endotoxin actions. Pathophysiological, immunological and clinical aspects. Springer-Verlag Wein, Vienna. 1973; 446-9.

73. Ukachukwu VE, Unger H, Onoka C, Nduka C, Maina S, Ngugi N. Maternal morbidity and mortality in peri-urban Kenya--assessing progress in improving maternal healthcare. *East Afr J Public Health*. 2009; 6(2):112-8.
74. Bint AJ, Hill D. Bacteriuria of pregnancy-an update on significance, diagnosis and management. *J. Antimicrob. Chemother*. 1994; 33:93-7.
75. Dimetry SR, El-Tokhy HM, Abdo NM, Ebrahim MA, Eissa M. Urinary tract infection and adverse outcome of pregnancy. *J Egypt Public Health Assoc*. 2007; 82(3-4):203-18.
76. Haider G, Zehra N, Munir AA, Haider A. Risk factors of urinary tract infection in pregnancy. *J Pak Med Assoc*. 2010; 60(3):213-6.
77. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, Lightman SL. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *PNAS*. 2000; 97(10):5645-50.
78. Cronise K, Kelly JK. Maternal urinary tract infection alters water maze performance in the offspring. *Neurotoxicology and Teratology*. 2001; 23:373-9.
79. Blümer N, Herz U, Wegmann M, Renz H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:397-402.
80. Solé D, Cassol VE, Silva AR, Teche SP, Rizzato TM, Bandim LC, Sarinho ES, Camelo-Nunes IC. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among adolescents living in urban and rural areas in different regions of Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007; 35(6):248-53.

81. Wong GW, Chow CM. Childhood asthma epidemiology: insights from comparative studies of rural and urban populations. *Pediatr Pulmonol*. 2008; 43(2):107-16.
82. von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Björkstén B, Weiland S. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax*. 2000; 55:449–53.
83. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Kline JN, Liu AH. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*. 2000; 355:1680-3.
84. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E, Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002; 347:869-77.
85. Douwes J, Cheng S, Travie N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, Cunningham C, Le Gros G, von Mutius E, Pearce N. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J*. 2008; 32:603-11.
86. Johnston SL, Martin RJ. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172:1078-89.
87. Murray CS, Simpson A, Custovic A. Allergens, viruses, and asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*. 2004; 1:99-104.

88. Eldridge MW, Peden DB. Allergen provocation augments endotoxin-induced nasal inflammation in subjects with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105:475-81.
89. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:322-8.
90. Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, Genuneit J, Hyvärinen A, Hirvonen MR, Lauener R, Pekkanen J, Riedler J, Dalphin JC, Brunekeef B, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Renz H, PASTURE Study Group. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (1):108-15.e1-3.
91. Peters M, Kauth M, Schwarze J, Körner-Rettberg C, Riedler J, Nowak D, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Bufe A, Holst O. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax*. 2006; 61(2):134-9.
92. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008; 31(1):143-78.
93. Spahn JD, Covar R. Clinical assessment of asthma progression in children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(3):548-57; quiz 558-9.
94. III Consenso Brasileiro no manejo da asma. Capítulo I - definição, epidemiologia, patologia e patogenia. *J. Pneumologia*. 2002; 28:S6-9.

95. O'byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy*. 1999; 29 (2):27-32.
96. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 1999; 160:1001-8.
97. Busse WW, Lemanske Jr RF. Asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 344:350-62.
98. Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy*. 1999; 29(1):9-13.
99. Bloemen K, Verstraelen S, Heuvel RVD, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*. 2007; 113:6-18.
100. Miller M, Sung KLP, Muller WA, Cho JY, Roman M, Castaneda D, Nayar J, Condon T, Kim J, Sriramaraio P, Broide DH. Eosinophil tissue recruitment to sites of allergic inflammation in the lung is platelet endothelial cell adhesion molecule independent. *Journal of Immunology*. 2001; 167:2292-7.
101. Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005; 60:23-9.
102. Ying S, Zhang G, GU S, Zhao J. How much do know about atopic asthma: Where are we now? *Cell Mol. Immunol*. 2006; 3 (5):321-32.

103. Petrolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138:1572-8.
104. Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Xavier-Elsas P, Vargaftig BB. Rapid increase in bone marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Amer. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 1997; 17: 404-13.
105. Lintomen L, Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Paula-Neto HA, Vargaftig DJBB, Elsas PX. Allergic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Brit J Pharmacol.* 2002; 135:1315-23.
106. Medeiros MV, Macedo-Soares MF, De-Luca IMS, Hyslop S, Denucci G, Antunes E. Contribution of C-fibres to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in rat. *Eur J Pharmacol.* 2001; 421:133-40.
107. Medeiros MV, De-Luca IMS, Bricola AAO, Zanesco A, Denucci G, Antunes E. Enhanced airways responsiveness in rats depleted of sensory neuropeptides by neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett.* 2003; 341:103-6.
108. Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irbin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 89:1127-38.
109. Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94:1217-24.

110. Egan RW, Athwahl D, Chou CC, Emtage S, Jehn C-H, Kung TT, Mauser PJ, Murgolo NJ, Bodmer MW. Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. *Int. Arch Allergy Immunol.* 1995; 107: 321-22.
111. Ferreira HH, Costa RA, Jacheta JM, Martins AR, Medeiros MV, Macedo-Soares MF, De Luca IM, Antunes E, De Nucci G. Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:631-9.
112. Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J. Immunol.* 2000; 164:3847-54.
113. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am. J. Pathol.* 1999; 155:591-8.
114. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez AC, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 1998; 188:157-67.
115. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999. 427 p.
116. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast cell, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(2): 450-6.
117. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 105:651-63.

118. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24:147-74.
119. Hogan SP, Rosenerg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38:709-50.
120. Rosenbherg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophils trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119:1303-10.
121. Gonglur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res.* 2004; 318:473-82.
122. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today.* 2000; 6: 20-7.
123. Foster PS. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29:12-6.
124. Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 272-8.
125. Clark K, Simson L, Newcombe N, Koskinen AML, Mattes J, Lee N, Lee J, Dent LA, Matthaei KI, Foster PS. Eosinophil degranulation in the lung of mice primarily occurs in the airway lumen. *J. Leukocyte Biology.* 2004; 75:1001-9.
126. Kay AB, Klion AD. Anti-interlukin-5 therapy for asthma and hypereosinophilic syndrome. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2004; 14 (4):645-66.

127. Bakker JM, Schmidt ED, Kroes H, Kavelaars A, Heijnen CJ, Tilders FJ, van Rees EP. Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat. *J Neuroimmunol.* 1995; 63(2):183-91.
128. Pierce RL, Pierce MR, Liu H, Kadowitz PJ, Miller MJS. Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Pediatric Research.* 1995; 38(6):905-11.
129. Meyer K, Zhang L. Fetal programming of cardiac function and disease. *Reprod Sci.* 2007; 14:209-16.
130. Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, Eriksson E, Bjorntorp P, York DA, Holmång A. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology.* 2001; 142(6):2622-30.
131. Hauser J, Feldon J, Pryce CR. Prenatal dexamethasone exposure, postnatal development, and adulthood prepulse inhibition and latent inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res.* 2006; 175(1):51-61.
132. Wang D, Vandermeulen J, Atkinson SA. Early life factors predict abnormal growth and bone accretion at prepuberty in former premature infants with/without neonatal dexamethasone exposure. *Pediatr Res.* 2007; 61(1):111-6.
133. Vianna EO; Garcia-Leme J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:809-14.
134. Ferreira HH, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IM, Zanardo RC, Teixeira CE, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998; 358: 253-9.

135. von Hertzen LC. Maternal stress and T-cell differentiation of the developing immune system: possible implications for the development of asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109(6):923-8.
136. Wood LJ, Inman MD, Watson RM, Foley R, Denburg JA, O'Byrne PM. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:99-105.
137. Fernandez M, Minguell JJ. Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996; 212:313-23.
138. Athanassakis I, Aifantis I, Ranella A, Giouremou K, Vassiliadis S. Inhibition of nitric oxide production rescues LPS-induced fetal abortion in mice. *Nitric Oxide*. 1999; 3:216-24.
139. Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, McCann SM, Rettori V, Franchi AM. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(18):7534-9.
140. Rhodes L, Moorman JE, Redd SC. Sex differences in asthma prevalence and other disease characteristics in eight states. *J Asthma*. 2005; 42(9):777-82.
141. Lim RH, Kobzik L. Sexual tension in the airways: the puzzling duality of estrogen in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008; 38:499-500.
142. Hayashi T, Adachi Y, Hasegawa K, Morimoto M. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c mice. *Scand J Immunol*. 2003; 57(6):562-7.

143. Melgert BN, Postma DS, Kuipers I, Geerlings M, Luinge MA, van der Strate BW, Kerstjens HA, Timens W, Hylkema MN. Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(11):1496-503.
144. Matsubara S, Swasey CH, Loader JE, Dakhama A, Joetham A, Ohnishi H, Balhorn A, Miyahara N, Takeda K, Gelfand EW. Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:501-8.
145. Bultinck J, Brouckaert P, Cauwels A. The in vivo contribution of hematopoietic cells to systemic TNF and IL-6 production during endotoxemia. *Cytokine*. 2006; 36:160-6.
146. Ohkawara Y, Lei XF, Stampfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 16(5):510-20.
147. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987; 238(4826):522-4.
148. Harris JF, Aden J, Lyons CR, Tesfaigzi Y. Resolution of LPS-induced airway inflammation and goblet cell hyperplasia is independent of IL-18. *Respir Res*. 2007; 8(1):24.
149. Xia ZY, Wang XY, Chen X, Xia Z. Effect of NO donor sodium nitroprusside on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats. *Injury*. 2007; 38 (1): 53-9.

Anexo



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **567-1**, sobre "**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR EM RATOS PRENATALMENTE EXPOSTOS AO CHOQUE SÉPTICO**" sob a responsabilidade de **Prof.Dr. Edson Antunes/Fernanda Beatriz Bordoni de Godoy Datti** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de julho de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **567-1**, entitled "**MODULATION OF PULMONAR INFLAMMATORY RESPONSE IN RATS PRENATALY SUBMITTED TO SEPTIC SHOCK**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 4, 2003.

Campinas, 27 de Agosto de 2003.
2ª VIA

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP