

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**BEATRIZ PETRI SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS NO PERÍODO  
PRÉ-NATAL E NA PROLE DE RATAS UTILIZANDO UM  
MODELO DE ASMA MURINO.**

**SÃO PAULO**

**2008**

**BEATRIZ PETRI SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS NO PERÍODO  
PRÉ-NATAL E NA PROLE DE RATAS UTILIZANDO UM  
MODELO DE ASMA MURINO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária apresentado à Universidade Paulista – UNIP.

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Bernardi

**SÃO PAULO**

**2008**

Oliveira, Beatriz Petri Soares de.  
Efeitos da administração do LPS no período pré-natal e na prole de ratas utilizando um modelo de asma murino / Beatriz Petri Soares de Oliveira. – São Paulo, 2008.

70 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2008.

Área de Concentração: Imunopatologia Veterinária.

“Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Martha Bernardi”

1. Ovoalbumina. 2. Linfócito Th2. 3. Ovariectomização. I. Oliveira, Beatriz Petri Soares de. II. Título.

**BEATRIZ PETRI SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PRÉ-NATAL DE LPS NO  
MODELO DE ASMA MURINO DA PROLE DE RATAS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária apresentado à Universidade Paulista – UNIP.

APROVADO EM:

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Martha Bernardi  
Universidade Paulista - UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Lúcia Jamil Abel  
Universidade Paulista - UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Paula Ligeiro  
Universidade de São Paulo

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus tios: Luiz, César, Osmar, Edna, Beth e Gladys. A minha mãe. Aos meus irmãos Fábio e Renato. Aos meus avós e ao Dib.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Martha Bernardi.

Agradeço em primeiro lugar a minha família pelo apoio até aqui.

Agradeço também ao Dib pelo seu apoio, paciência e sem o qual nada teria acontecido.

A Thiago Kirsten, mestrando da FMVZ-USP por todo seu apoio nos experimentos perinatais.

À Priscila De Napoli, minha colega de mestrado, quem tanto me ajudou com seus conhecimentos.

À Andréa Halulli, secretária da pós-graduação.

Aos professores: Lúcia Abel, Leoni Bonamim, Anete Lallo, Eduardo Bondan, Mário Mariano e Sele Dell Aqua.

À professora Sandra Penteado, que mesmo não participando diretamente deste trabalho, exerceu e exerce uma grande influência em minha vida, em todos os sentidos.

“Somos o que fazemos, mas somos  
principalmente o que fazemos para mudar  
o que somos”.

(Eduardo Galeno)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1. Resposta imune a asma.....	15
1.2 Asma.....	16
1.3 Ação do lipopolissacarídeo (LPS).....	19
1.4 Mecanismos de ação do LPS na modulação do comportamento doentio.....	21
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1 Animais.....	25
3.2 Obtenção dos filhotes.....	25
3.3 Parâmetros reprodutivos e gestacionais.....	26
3.4 Formação dos grupos.....	26
3.5 Desenvolvimento físico.....	27
3.6 Ovariectomia (OVx).....	27
3.7 Validação da eficácia da Ovariectomia (OVx).....	27
3.8 Sensibilização e broncoprovocação <i>in vivo</i> .....	28
3.9 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e quantificação celular.....	29
3.10 Leucograma.....	29
3.11 Lavado femural (LF) e quantificação celular.....	30
3.12 Anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	30
3.13 Delineamento experimental geral.....	31
3.14 Análise estatística.....	33
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1 Experimento 1: Efeitos da administração no DG 9,5 de LPS em parâmetros reprodutivos e gestacionais.....	34
4.2 Experimento 2: Efeitos da administração pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no lavado broncoalveolar da prole feminina de ratas.....	37
4.3 Experimento 3: Efeitos da administração pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no leucograma da prole de ratas observadas na idade adulta.....	45

## SUMÁRIO (continuação)

4.4 Experimento 4: Efeitos da administração pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no mielograma da prole de ratas observadas na idade adulta.....	50
4.5 Experimento 5: Efeitos da administração pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS na formação de anticorpos da prole de ratas observadas na idade adulta.....	52
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Delineamento experimental – esquema de tratamento pré-natal e estudos da performance reprodutiva..... 32
- Figura 2 Delineamento experimental – esquema de sensibilização e desafio (Booster) com OVA no modelo de asma experimental..... 32
- Figura 3 Número total de células do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 39
- Figura 4 Número de macrófagos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 41
- Figura 5 Número de neutrófilos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 42

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

- Figura 6 Número de linfócitos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 43
- Figura 7 Número de eosinófilos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 44
- Figura 8 Número total de células obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 47
- Figura 9 Número total de monócitos obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 48

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

- Figura 10 Número total de neutrófilos obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis)..... 49
- Figura 11 Número total de células do lavado femural de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos (ANOVA)..... 51
- Figura 12 Títulos de IgE de animais do grupo BASAL, CONTROLE/OVA e LPS/OVA. A variação dos títulos de IgE dos animais foi nula..... 53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrópico
<b>AP</b>	Affine projection
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DG</b>	Dia gestacional
<b>DPN</b>	Dia pós-natal
<b>HPA</b>	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF</b>	Interferon
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>IRAK</b>	Receptor de interleucina 1 quinase-associado
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LBP</b>	Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
<b>LF</b>	Lavado femural
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTB</b>	Leucotrieno B
<b>MHC de classe II</b>	Complexo de histocompatibilidade maior de classe II
<b>MyD</b>	Fator de diferenciação mielóide
<b>NF- KB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NK</b>	Natural killer (célula exterminadora natural)
<b>OVA</b>	Ovoalbumina
<b>OVx</b>	Ovariectomizadas
<b>PAF</b>	Fator ativador plaquetário
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCA</b>	Teste de anafilaxia cutânea passiva
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TAK</b>	Triticum aestivum quinase
<b>Th</b>	Linfócito T helper (célula T auxiliar)
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRAF</b>	Receptores associados de fator de necrose tumoral

## RESUMO

Estudos epidemiológicos mostram que interferências com a imunidade materna no período perinatal podem afetar a resposta imune dos seus descendentes. Assim, a exposição a endotoxinas e substâncias alergênicas durante a gestação e nos primeiros estágios da vida de um neonato podem modular a resposta imune em períodos mais tardios da vida. O objetivo do presente trabalho foi investigar as conseqüências da administração do lipopolissacarídeo (LPS) no período pré-natal e na prole feminina de ratas utilizando um modelo de asma murino. Para tanto, ratas prenhes receberam no 9,5 dias da gestação 100µg/kg, via intraperitoneal (i.p.), de LPS ou solução salina pela mesma via. As proles femininas dessas ratas ovariectomizadas (procedimento realizado com o intuito de eliminar a variável hormonal do estudo), na idade adulta, foram sensibilizadas e desafiadas com ovoalbumina (OVA). Avaliou-se o número de células do lavado broncoalveolar (LBA), do sangue periférico e da medula óssea. Adicionalmente, o teste de anafilaxia cutânea (PCA) foi realizado. Os resultados mostraram que em comparação com o grupo controle tratado prenatalmente com solução salina, sensibilizado e desafiado com OVA (CONTROLE/OVA) na idade adulta, os animais tratados prenatalmente com LPS (grupo LPS/OVA) apresentaram: 1) redução significativa no número total de células do LBA e na contagem diferencial destas células (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos); 2) aumento significativo no número total de leucócitos circulantes e na análise diferencial de células sanguíneas circulantes (células mononucleares e polimorfonucleares); 3) não foram observadas alterações na celularidade da medula e 4) não foram detectadas diferenças entre os grupos nos títulos de IgE no teste de anafilaxia cutânea passiva. Concluiu-se que a exposição pré-natal ao LPS no 9,5 dias da gestação reduz a resposta à asma experimental mediada por OVA na prole feminina de ratas ovariectomizadas através da diminuição da migração de células imunes do sangue periférico para o pulmão, sem interferência da atividade da medula óssea e na produção de anticorpos.

## **ABSTRACT**

Epidemiological evidence underlines the impact of prenatal environmental factors on the development of postnatal allergies. Exposure to endotoxins, allergens or both, in early life might regulate the development to tolerance to allergens later in life. The present study investigated whether acute LPS prenatal alters subsequent offspring allergen-induced inflammatory response in adult age. For that, pregnant rats received LPS, 100 µg/kg, I.P. at gestation day 9.5 and the female ovariectomized offspring were sensitized and challenged with OVA (LPS/OVA) in adult age. The bronchoalveolar lavage, peripheral blood and bone marrow cells were counted. Additionally, the passive cutaneous anaphylaxis was performed. Results showed that in comparison to Control/OVA group prenatal LPS exposure induced 1) a significant reduction in the BAL total number of cells and in its differential cells count (macrophages, neutrophils, eosinophils and lymphocytes); 2) an increase in the total number of leukocytes circulating and in differential analysis of blood circulating leukocytes, a significant increase in the number of mononuclear and polymorphonuclear cells; 3) no differences were observed in the bone marrow cellularity; 4) no differences in the IgE titers of both groups. We concluded that prenatal LPS exposure attenuated the experimental asthma induced by OVA challenge by a reduction on migration of immune cells from peripheral blood to lung without any interference with the bone marrow cells production.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Resposta Imune a Asma

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é denominada resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Dentre as células que compõem o sistema imunológico destacam-se os linfócitos originários da medula óssea, os quais diferenciam-se por suas funções e produtos protéicos. Os linfócitos são divididos em linfócitos B, linfócitos T, citotóxicos e auxiliares, e células natural killer (NK). As células T representam a maioria dos linfócitos encontrados no trato respiratório de indivíduos normais e apresentam papel essencial na indicação e regulação das respostas inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos T auxiliares, responsáveis pela ativação de células fagocíticas através da secreção de citocinas, subdividem-se em dois tipos celulares, Th1 e Th2, distinguidos entre si pelas citocinas secretadas (MOSMANN apud BIAZE et al, 2003). As células Th1 estão envolvidas na resposta tardia através da produção de INF-gama e IL-12 sendo o principal mediador na defesa fagocítica na resposta mediada por macrófagos. As células Th2 produzem citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Cada uma das referidas citocinas ativam outras células estimulando ou inibindo a produção de outras substâncias. IL-4 e IL-13 induzem a síntese de IgE e IgG4 enquanto IL-5 provoca a diferenciação eosinofílica. IL-10 é produzida por macrófagos, os quais têm como efeito biológico a expressão de moléculas MHC de classe II.

A ativação de células T na asma foi primeiro descrita entre células mononucleares de sangue periférico antes mesmo do advento do balanço Th1/Th2 (MOSMANN apud BIAZE et al, 2003).

As citocinas produzidas pelos linfócitos T têm participação importante na resposta inflamatória crônica da asma.

Na asma o componente Th1 da inflamação está presente e relacionado a hiperreatividade dos brônquios, aumentando em quantidade com a presença de sintomas. Alguns autores relatam citocinas dos linfócitos Th1 nos soro e lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com asma, embora evidenciem a predominância de citocinas Th2.

A asma é decorrente de uma resposta imunológica Th2, sendo que o desequilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 pode ser considerado a principal caracterização da patogênese da asma. No entanto, alguns autores referem que a ativação da resposta Th2 é necessária, mas não o suficiente para explicar a doença uma vez que podemos encontrar células produtoras de INF-gama em pacientes asmáticos. (MOSMANN apud BIAZE et al, 2003).

## **1.2 Asma**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, no mundo, 300 milhões de pessoas são acometidas pela asma que juntamente com outras doenças do trato respiratório representam um grave problema de saúde pública mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2008).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual várias células têm papel fundamental tais como os eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Em indivíduos suscetíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de dispnéia, chiado e tosse. Estes sintomas

estão associados à obstrução brônquica que é parcialmente reversível espontaneamente ou por tratamento farmacológico. Muito embora a asma seja patologia complexa e multimedida, existem diversos fatores já identificados que contribuem para o seu desencadeamento ou para a exacerbação dos seus sintomas (TILLIE-LEBLOND et al, 2005).

O desenvolvimento da asma está relacionado a diversos fatores, dentre eles incluem-se a atopia (predisposição genética de certos indivíduos para a síntese exacerbada de IgE), os fatores causais (exposição de indivíduos a alérgenos ambientais) e os de contribuição (exposição a fumaça, poluição, infecção viral, ciclos hormonais entre outros).

A asma se caracteriza também pelo aumento da expressão de múltiplas proteínas que estão envolvidas na complexa cascata da reação inflamatória. Estas proteínas reguladoras incluem citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios bem como aquelas envolvidas na adesão celular. Na doença inflamatória, fatores de transcrição ativados por estímulos inflamatórios (alérgenos, oxidantes, citocinas e vírus), acionam genes, determinando desta forma, aumento da síntese de proteínas inflamatórias (BOCHNER, 2004). Assim sendo, a ativação celular é passo fundamental para a resposta inflamatória de origem alérgica.

O processo de sensibilização provavelmente representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático. No contexto da apresentação do antígeno as células dendríticas presentes na mucosa brônquica interagem com linfócitos T auxiliares fazendo com que estas células estimulem a produção de imunoglobulinas (IgE) por linfócitos B (OKAYAMA et al, 1997). As IgE liberadas na circulação se ligam a receptores específicos da porção Fc das imunoglobulinas presentes nos mastócitos (PUXEDDU et al, 2003).que quando ativados pelo antígeno, liberam uma gama de mediadores, os quais têm importantes efeitos biológicos sobre a atividade funcional da musculatura lisa e de células inflamatórias (PEACHELL, 2005).

Durante sua fase imediata, observam-se contração da musculatura lisa brônquica, formação local de edema, aumento da secreção de muco e um pequeno

infiltrado celular. O principal fator responsável pela obstrução das vias aéreas nesta fase é a contração da musculatura lisa brônquica.

As reações de fase tardia induzidas por alérgenos persistem por até 24 horas. Os mastócitos liberam grânulos que contêm citocinas (TNF-alfa e IL-4) e mediadores lipídicos (PAF e LTB4) que podem causar aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão. As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície celular que têm como função mediar o contato entre células endoteliais e células inflamatórias, e ainda, participar como sinalizadoras na resposta inflamatória. São divididas em 4 grandes superfamílias: selectinas, integrinas, imunoglobulinas e caderinas, sendo que a seletividade depende dos mediadores e tipos de células envolvidas. Assim, a degranulação mastocitária pode levar à indução de moléculas de adesão nas células do endotélio vascular que promove recrutamento de leucócitos ao tecido. Os leucócitos típicos da reação tardia são os eosinófilos, basófilos e as células Th2, além disso, é freqüente a presença de neutrófilos nessa reação. A resposta tardia pode facilmente se converter em uma resposta inflamatória crônica se o antígeno persistir e estimular as células Th2 alérgeno-específicas as quais, por sua vez, promovem a eosinofilia e a produção subsequente de IgE (BELVISI, 2004)

O remodelamento da arquitetura pulmonar é considerado característico de algumas alterações como por exemplo, a fibrose subepitelial na asma. Todas essas mudanças incluem alterações na matriz extracelular do pulmão e, nesse processo, estão envolvidas as metaloproteinases, que têm a capacidade de clivar proteínas estruturais como as fibras colágenas e elásticas. (AMMIT, 2005; BOUSQUET et al, 2004).

O cenário inflamatório observado para o desencadeamento da asma pode ser caracterizado sinteticamente pela presença pulmonar de mastócitos desgranulados, eosinófilos, ativação de linfócitos predominantemente Th2 e geração de citocinas (BOCHNER et al, 2005).

### 1.3 Ação do Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é um constituinte pertencente às paredes celulares de bactérias gram-negativas, é um lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou core) e de uma série terminal de unidades repetidas. O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada às quais estão ligados vários ácidos graxos de cadeia longa, variando conforme a espécie bacteriana. O núcleo deste polissacarídeo é similar em todas as espécies gram-negativas que possuem LPS porém, cada espécie contém uma unidade de repetição particular. Em geral, as unidades de repetição consistem em trissacarídeos lineares ou em tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS et al, 2000).

As moléculas de LPS de carga negativa são ligadas de forma não covalente por cátions divalentes, tornando a membrana estabilizada e proporcionando uma barreira contra moléculas hidrofóbicas (BROOKS et al, 2000).

O LPS é extremamente tóxico para animais mesmo em concentrações menores que 1 Nn (ADEREM et al, 2000) sendo denominado endotoxina das bactérias gram-negativas, estando firmemente ligado à superfície celular e liberado apenas quando as células são lisadas. A toxicidade de LPS ocorre quando é clivado em lipídio A e polissacarídeo, sendo esta toxicidade (interação imune) associada ao lipídio A. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS et al, 2000).

O LPS liga-se à membrana externa por pontes hidrofóbicas, é sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para sua posição exterior final. A presença do LPS é necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa (BROOKS et al, 2000).

O LPS é utilizado de forma ampla em trabalhos de pesquisa visando entender seus efeitos e os processos inflamatórios que gera, principalmente em estudos

imunológicos. Uma das principais fontes do LPS é a partir da bactéria *Escherichia coli*, através de um processo de extração fenólica (MIMS et al, 1999).

O mecanismo de ação do LPS inicia-se quando de seu contato com o organismo, quer seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do LPS. Ocorre então uma série de respostas no organismo infectado, sendo que a endotoxina pode ativar células como os monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, mas sem dúvida, os macrófagos são as principais estruturas onde o mecanismo de ação do LPS é iniciado. É, portanto, o maior objeto de estudo dos pesquisadores, e na qual a presente revisão da literatura se preocupa em abordar (SALUK-JUSZCZAK et al, 2005).

O LPS liga-se inicialmente às proteínas ligantes do hospedeiro, os LBPs (*lipopolisacharyde binding protein*), produzidas no fígado do animal, a partir deste passo é formado um complexo chamado de LPS-LBP. O complexo entra em contato com o receptor CD14 dos macrófagos, iniciando a ativação celular (ADEREM et al, 2000; MIYAKE, 2003; FENTON et al, 1998). A partir desta etapa passam a atuar os receptores TLR4 (ou receptores toll-like 4), que, com auxílio de outras estruturas como as proteínas MD-2, iniciam a geração do sinal transmembrana. No interior do macrófago ocorrem reações em cascata incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I $\kappa$ B, AP-1 até a ativação da NF- $\kappa$ B, que ativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias (ADEREM et al, 2000; HARJU et al, 2005 e ROMERO et al, 2007).

Portanto, em última instância o LPS age por ativar e liberar citocinas pró-inflamatórias dentre elas estão o TNF-alfa (ou fator de necrose tumoral alfa), IL-1 (Interleucina 1) e IL-6 (Interleucina 6), além de algumas outras (HAVA et al, 2006). Segundo Lin et al a insuficiência funcional de células T regulatórias pode estar relacionada à produção de TNF-alfa, o que explicaria, em parte, a efetividade da terapia anti-TNF-alfa na asma alérgica.

É esta a causa do emprego do LPS como ativador de resposta imune, principalmente na resposta imune inata (inespecífica) com os macrófagos, sendo que a longo prazo atuam também na resposta imune adquirida (ou adaptativa). Estas últimas referem-se a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos

(com atuação dos TLR4, na ativação de membros da família B7, que ativam células T virgens) (ADEREM et al, 2000 e LEVITON et al, 2005).

As citocinas atuam em um organismo a fim de combater diversos patógenos. No sistema imune ela atua no reconhecimento de partículas invasoras, bem como em respostas adaptativas ou reações homeostáticas (ADEREM et al, 2000 e AVITSUR et al, 1999). Ativam o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) estimulando a liberação do fator liberador de corticotrofina do hipotálamo, e hormônio adrenocorticotrofina (ACTH) da glândula pituitária, resultando num aumento de glicocorticóides na corrente sanguínea periférica. Podem também inibir o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, por inibir a secreção de hormônios sexuais (hormônio gonadotrófico, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e esteróides ovarianos), interferindo na modulação do comportamento reprodutivo (AVITSUR et al, 1997 e MEYER et al, 2005). Agem no sistema nervoso central, produzindo comportamento doentio (AVITSUR et al, 1997).

#### **1.4 Mecanismos de Ação do LPS na Modulação do Comportamento Doentio**

O comportamento doentio é ativado quando o organismo sofre um ferimento ou um processo infeccioso. Interfere em diversas esferas (psicológicas, neuroendócrinas e comportamentais), é encontrado nos mais diversos animais e corresponde a uma sintomatologia bastante variada, podendo incluir uma ou várias das seguintes respostas: febre, apatia, anorexia, sonolência, hipofagia, diminuição dos contatos sociais, diminuição da atividade sexual, dentre outros (AVITSUR et al, 1997).

Muitos fatores imunes são liberados e participam no sentido de remover o patógeno invasor, agindo localmente além de orquestrar uma complexa difusão de alterações através de todo o organismo que vem a ajudar no combate deste ferimento ou infecção (AVITSUR et al, 1999). O problema ocorre quando existe liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, que desencadeiam respostas exacerbadas,

se tornando prejudiciais, levando à inflamação sistêmica, associada com o desenvolvimento de sérias complicações patológicas, podendo até mesmo levar à morte do indivíduo (PAVLOV et al, 2004).

Pode ser desencadeado não só pelo LPS, mas também por diversos outros organismos, como *Porphyromonas gingivalis* (uma bactéria gram-negativa), *Mycoplasma fermentans* (uma bactéria gram-positiva), vírus Influenza, vírus Borna, vírus Herpes, etc (COLLINS et al, 1994, YIRMIYA et al, 1999, SHI et al, 2003, PLETNIKOV et al, 2002 e ENGEL et al, 2000).

Não se sabe ainda a totalidade dos fatores que estão envolvidos na indução do comportamento doentio induzido pelo LPS. Esta endotoxina não atravessa a barreira hematoencefálica existindo três hipóteses, não excludentes, para explicar seus efeitos centrais. A primeira delas envolve o nervo vago (que é a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro). Essas citocinas liberadas pelos macrófagos poderiam entrar em contato com alguma terminação de alguma ramificação vagal, as quais possuem receptores para citocinas. A ativação desses receptores iniciaria a transmissão de um impulso nervoso através do nervo vago aferente até sua ligação no encéfalo (no núcleo vagal). Isso provocaria alterações de neurotransmissores, dentre outros efeitos. Experimentos com vagotomia e aplicação de IL-1 mostraram que o comportamento doentio não ocorre nesta situação (DANTZER et al, 1998). Outra hipótese envolve os órgãos circunventriculares. As citocinas liberadas chegariam até a circulação sanguínea atingindo o SNC. Provavelmente, elas penetrariam no cérebro via órgãos circunventriculares, pois estas apresentam “falhas” da barreira, uma vez que as citocinas, por seu tamanho, não penetram no encéfalo. DUNN (2006) dosou citocinas em alguns desses órgãos (área postrema, eminência mediana e órgão vasculoso da lâmina terminal) e observou valores elevados de citocinas em relação a outras áreas do cérebro.

A terceira hipótese propõe que citocinas entrariam em contato com células endoteliais do organismo, que possuem receptores para citocinas. Estes seriam ativados o que iniciaria uma resposta no organismo levando a produção de eicosanóides (mediadores inflamatórios de origem lipídica). Como estes eicosanóides

penetram no SNC, via corrente sanguínea, seriam capazes de induzir processos fisiopatológicos. Neste sentido, já se mostrou que inibidores de eicosanóides impedem a produção dos mediadores, suprimindo o comportamento doentio (DUNN, 2006, XU et al, 2006, SALUK-JUSZCZAK et al, 2005 e CALDER, 2004).

Além disto, o efeito das citocinas poderia ser potencializado quando estas entrassem em contato com a micróglia, que são células residentes do sistema nervoso central as quais funcionam como liberadores endógenos de citocinas (LENT, 2001, MEYER et al, 2005, HAVA et al, 2006 e XU et al, 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da administração de LPS no período pré-natal e na prole feminina de ratas no modelo de asma murino.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Assim, pretendeu-se:

- 1) Avaliar o desempenho reprodutivo de ratas expostas no 9,5 dia da gestação ao LPS por meio do peso corporal e do desenvolvimento de sua prole.
- 2) Avaliar o efeito do LPS administrado no 9,5 dias de gestação em fêmeas ovariectomizadas, sensibilizadas e desafiadas com OVA no 9,5 dia da gestação, por meio da análise de células do lavado broncoalveolar (LBA), leucograma, mielograma e a produção de anticorpos.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar, adultas cedidas pelo Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ–USP). Os animais permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas forradas com maravalha esterilizada e isenta de impurezas. Os animais foram utilizados seguindo-se as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMV-UNIP (protocolo n°. 003/08). As caixas moradia foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h com luz ligada às 7:00 h; água e ração foi fornecida *ad libitum*.

#### **3.2 Obtenção dos Filhotes**

Para obtenção dos filhotes, foram utilizadas 20 ratas Wistar adultas, virgens, as quais foram acasaladas com machos experientes da mesma linhagem. Utilizou-se 3 animais por caixa sendo 2 fêmeas para cada macho. No 9,5 dia de gestação (DG 9,5), as fêmeas receberam uma injeção sc (via subcutânea) de LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e foram separadas dos machos sendo colocadas em caixas individuais onde permaneceram até o desmame dos filhotes, realizado aos 21 dias de idade (DPN 21).

#### **3.3 Parâmetros Reprodutivos e Gestacionais**

Foram avaliados os seguintes parâmetros reprodutivos: duração da gestação, presença de natimortos, abortamentos, presença de mal-formações, peso total da ninhada, número de filhotes e relação de filhotes machos/fêmeas. Ao nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 8 filhotes por mãe, sendo 4 machos e 4 fêmeas e pesadas. Foi feita uma nova pesagem no dia do desmame, sendo toda manipulação dos animais procedida à mesma hora do dia (8:30 às 10:30 h), evitando-se que o ciclo circadiano de liberação de corticosterona atue como um viés. Como unidade de análise tomou-se a ninhada.

### **3.4 Formação dos Grupos**

Todas as fêmeas ao atingirem a idade de desmame, foram separadas para este estudo, sendo os machos utilizados em outros experimentos.

Estas fêmeas foram distribuídas em 2 grupos. Na formação dos grupos, foram alocados um filhote de cada ninhada. Este procedimento pretende evitar variáveis genéticas eventualmente presentes. Os grupos formados foram:

Grupo Controle: fêmeas com 55 a 65 dias de idade cujas mães receberam o veículo do LPS no 9,5 dia da gestação - CONTROLE/OVA

Grupo Experimental: fêmeas com 55 a 65 dias de idade, cujas mães receberam LPS no 9,5 dias da gestação - LPS/OVA.

Tomou-se como grupo BASAL: fêmeas com 55 a 65 dias de idade sem tratamento durante a gestação.

### **3.5 Desenvolvimento Físico**

O desenvolvimento físico foi avaliado por meio do peso corporal ao nascer, ao desmame e aos 55 dias de idade.

### **3.6 Ovariectomia (OVx)**

As fêmeas foram ovariectomizadas para minimizar as variáveis do experimento, pois é sabido que os hormônios sexuais femininos interferem com o curso da inflamação alérgica pulmonar (RIFFO-VASQUEZ et al, 2007).

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia e assepsia da parede abdominal com álcool iodado (3%), foi realizada laparotomia mediana. Identificados os ovários foi realizada a ligadura de seus pedúnculos e em seguida a ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi fechada em dois planos com sutura contínua de fio de nylon 4.0.

### **3.7 Validação da Eficácia da Ovariectomia (OVx)**

A eficácia da ovariectomia foi determinada pela análise do esfregaço vaginal. Para tanto, o padrão morfológico das células presentes no lavado vaginal foi identificado. Assim, por meio de um conta-gotas a solução salina foi introduzida na

vagina e o lavado retirado. Este foi posto sobre lâmina de vidro e corado com azul de metileno (5%) sendo observado em microscopia óptica de luz.

No momento da avaliação da asma experimental, aos 21 dias da cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), e os úteros removidos, sendo seus pesos determinados em balança analítica. O sucesso da ovariectomia foi avaliado pela detecção da redução no peso do útero. Somente fêmeas ovariectomizadas em diestro e com redução da massa uterina foram utilizadas no estudo.

### **3.8 Sensibilização e Broncoprovocação *in vivo***

Decorridos 21 dias da ovariectomia, no DPN 60, grupos de animais foram sensibilizados com uma única injeção de 10 mg de ovoalbumina (OVA, grau V - Sigma<sup>®</sup>) dissolvidas em 0,4 ml de uma solução saturada de hidróxido de alumínio (10 mg/animal) por via intraperitoneal. No DPN 67 os animais receberam por via subcutânea 2 ml de ovoalbumina a 0,1% dissolvida em hidróxido de alumínio (mesma solução da imunização). A broncoprovocação foi feita nos DPN 73 e 74 (13 e 14 dias após a sensibilização primária, ou seja, 21 dias após ovariectomia). Os animais foram expostos a um aerossol contendo ovoalbumina a 1% por meio de um inalador ultrassônico (marca ICEL). Os ratos não sensibilizados foram expostos a solução salina a 0,9% em água destilada para serem empregados como grupo CONTROLE (COLEMAN et al., 1983). A sessão de inalação foi realizada por 15 minutos colocando dois animais por sessão em caixa plástica (18,5 cm X 18,5 cm X 13,5 cm). O período de 14 dias foi escolhido visto que, de acordo com Coleman et al (1983) após a injeção intraperitoneal de ovoalbumina emulsificada em alúmen, os níveis circulantes de imunoglobulinas E (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias.

### **3.9 Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA) e Quantificação Celular**

A coleta do lavado broncoalveolar foi realizada de acordo com Tavares de Lima et al (1998) e Bozinovski et al (2004). Para tanto, os animais foram anestesiados com cetamina (10mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg). A cavidade peritoneal foi exposta e a exsanguinação foi realizada pela aorta abdominal. Após manipulação cirúrgica, a traquéia foi exposta e canulada utilizando uma válvula reguladora com 3 entradas. Na primeira entrada foi acoplada uma cânula de polietileno; à segunda, uma seringa de plástico contendo 20 ml de solução tampão de fosfatos (PBS) e à terceira, uma seringa vazia (para a aspiração do exsudato inflamatório). A cânula foi inserida na traquéia para a lavagem do espaço broncoalveolar.

O LBA obtido foi centrifugado, por 10 minutos a 500 xg, o sobrenadante desprezado e o botão celular re-suspenso em 1 ml de PBS. A contagem do número total de células foi realizada em câmara hemocitométrica de Neubauer e a contagem diferencial foi feita por microscopia óptica e contadas no mínimo 400 células, diferenciando-as segundo o tipo celular (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos). As lâminas obtidas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Guimsa modificado segundo Rosenfeld (1947).

### **3.10 Leucograma**

Alíquotas de sangue (10 $\mu$ l) da aorta abdominal foram coletadas em pipeta automática e adicionadas a 190  $\mu$ l de líquido de Türk a 3%, e processadas para a contagem total em câmara de Neubauer. A contagem diferencial dos leucócitos

circulantes foi realizada e corada pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado segundo Rosenfeld (1947) e a seguir contadas 400 células.

### **3.11 Lavado Femural (LF) e Quantificação Celular**

Os animais foram submetidos à eutanásia como descrito anteriormente. O fêmur esquerdo foi retirado e com o auxílio de uma pinça, este foi mantido sobre um tubo Falcon® (50 ml); em seguida o canal medular foi perfundido com PBS (5 ml) utilizando uma seringa plástica. A suspensão medular obtida foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta automática de 5 ml e centrifugada a 170g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células re-suspensas em 1 ml de PBS.

A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota da amostra (90 µl) foi acrescida de 10 µl de cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%), totalizando, portanto, uma diluição de 1:10. Os resultados foram expressos em número de células x 10<sup>6</sup>/ml.

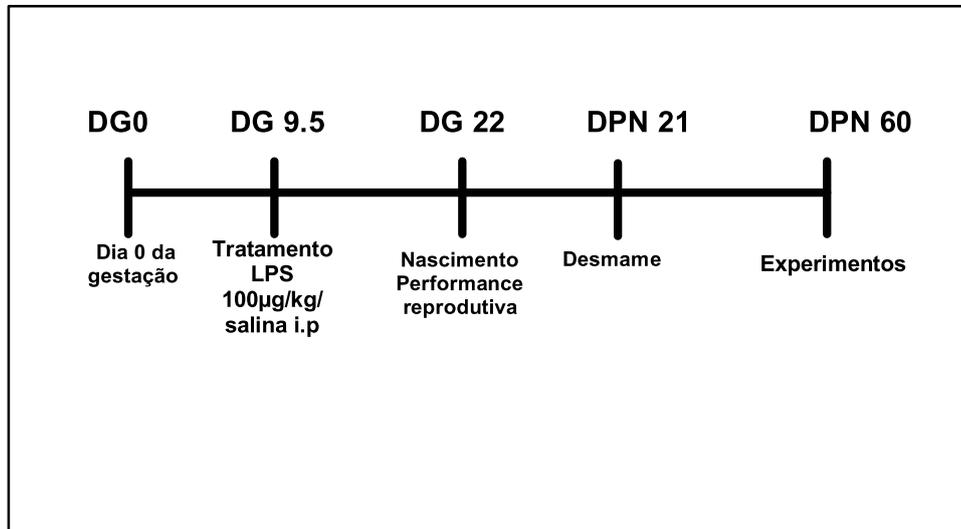
### **3.12 Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)**

Empregou-se a técnica previamente descrita por Mota e Wong (1969). Resumidamente, realizou-se uma diluição seriada em progressão geométrica de 1:1/2 até 1:1/256 de um pool de soros obtidos de animais dos CONTROLE/OVA e LPS/OVA. As diferentes diluições foram então administradas por via intradérmica no dorso de

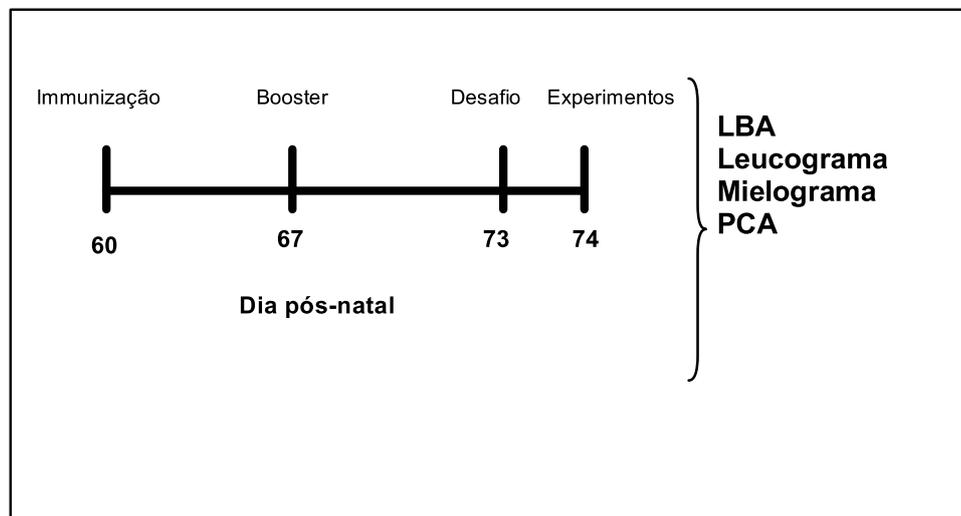
ratas não manipuladas e não sensibilizadas. Decorridas 24 horas, estes animais receberam, pela via intravenosa, 1ml de suspensão contendo 500mg de OVA associada a 2,5mg do corante azul de Evans e após 15 minutos, submetidos à eutanásia, e foram removidos a cútis dorsal e o diâmetro dos halos azuis formados nos locais de inoculação da diluição dos soros. O título da anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi representado pela maior diluição na qual o soro foi capaz de determinar halo de reatividade maior que 5mm de diâmetro.

### **3.13 Delineamento Experimental Geral**

Foram utilizadas 20 ratas fêmeas, divididas em 2 grupos, com 10 ratas em cada grupo obtidas e agrupadas conforme previamente descrito. Os animais do grupo BASAL (n=10) não foram submetidos a este procedimento.



**Figura 1:** Delineamento experimental – esquema de tratamento pré-natal e estudos da performance reprodutiva.



**Figura 2:** Delineamento experimental – esquema de sensibilização e desafio (Booster) com OVA no modelo de asma experimental.

### **3.14 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Kolmogorov e Smirnov para verificação de homocedasticidade. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer no caso de três amostras ou ao teste t de Student no caso de duas amostras. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Software V.2.01, Graphpad InStat-tm (1990-1993).

## **4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS**

### **4.1 Experimento 1: Efeitos da Administração no DG 9,5 de LPS em Parâmetros Reprodutivos e Gestacionais**

#### **Delineamento experimental**

Foram cruzadas 20 fêmeas as quais foram divididas em dois grupos iguais. O peso das fêmeas foi medido no DG 2 e 21. Ao nascimento foram avaliados os parâmetros reprodutivos e gestacionais: duração da gestação, presença de natimortos, presença de mal-formações, peso da ninhada, número de filhotes e relação de filhotes machos/fêmeas. Os filhotes foram pesados no DPN2, ao desmame (DPN21) e no DPN60.

#### **Resultados**

A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação materna e da prole de ratas tratadas ou não com a solução de LPS no DG 9,5. Assim, o teste t de Student mostrou que as ratas prenhes tratadas com LPS adquiriram menos peso durante o período de sua gestação em relação aquelas do grupo tratado com salina ( $p=0,0101$ ). Essas mesmas ratas também deram a luz a um número menor de filhotes, em relação ao grupo controle ( $p=0,0079$ ). Porém, as ratas do grupo experimental tiveram o peso total

de suas ninhadas similar aquelas do grupo controle ( $p=0,2253$ ). A duração da gestação não foi alterada nos animais do grupo experimental com relação àqueles do grupo controle ( $p= 0,4866$ ) e não foram observadas mal-formações externas nos animais.

Com relação ao peso corporal dos filhotes (Tabela.1), o teste t de Student mostrou que o peso corporal no segundo ( $p=0,9648$ ), vigésimo primeiro ( $p=0,7188$ ) e sexagésimo dia da lactação da prole das ratas tratadas com LPS se mostrou inalterado em relação ao grupo controle ( $p=0,9648$ ).

**Tabela 1:** Avaliação materna das ratas tratadas ou não com a solução de LPS: são apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N = 10/ninhadas/ grupo.

Parâmetro	Grupo	
	Controle	Experimental
<b>PARÂMETROS MATERNOS</b>		
Ganho de peso durante a gestação (g)	16,63 ± 3,26	6,27 ± 1,88*
<b>PARÂMETROS DA PROLE</b>		
Número de filhotes nascidos	10,60 ± 0,65	7,71 ± 0,76*
Peso total da prole (g)	70,60 ± 5,50	60,53 ± 5,69
Peso corporal no PND2(g)	7.45 ± 0.20	7.94 ± 0.29
Peso corporal no PND21(g)	44,96 ± 0,91	44,37 ± 1,39
Peso corporal no PND60(g)	277,11 ± 4,98	266,65 ± 6,95

\* p<0,05 em relação ao grupo controle – teste *t* de Student

## **4.2 Experimento 2: Efeitos da Administração Pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no Lavado Broncoalveolar da Prole Feminina de Ratas.**

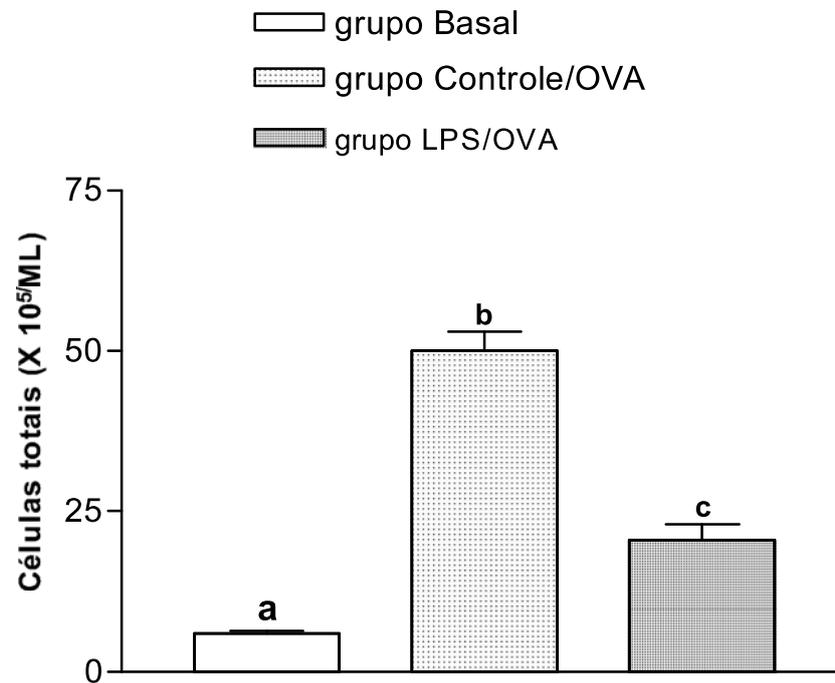
### **Delineamento experimental**

Foram utilizados 20 fêmeas ovariectomizadas provenientes uma de cada ninhada de mães tratadas (n=10) ou não (grupo CONTROLE/OVA, n=10) com LPS (grupo LPS/OVA) no DG 9,5. Estas ratas, após sensibilização e desafio com OVA, foram anestesiadas e procedeu-se ao lavado broncoalveolar como descrito. No mesmo procedimento, coletou-se o sangue e executou-se o lavado femural. O sangue foi utilizado para o leucograma, estudo da formação de anticorpos e o lavado femural para o mielograma. Um outro grupo de 10 ratas ovariectomizadas, cujas mães não foram tratadas durante a gestação e que não foram sensibilizadas e desafiadas com OVA, foram submetidas à mesma manipulação e tomadas como controle negativo do modelo de asma experimental em todos experimentos (grupo BASAL).

### **Resultados**

A Figura 3 mostra os resultados obtidos com os experimentos conduzidos para caracterizar a inflamação alérgica em ratas administradas com LPS pré-natalmente. É apresentado o número total de células em cada grupo. A ANOVA indicou a existência de diferenças significantes entre os grupos ( $F(2/27)=102,27$ ,  $p<0,0001$ ). Como pode ser observado o número total de células no LBA dos animais, 24 horas após o desafio com OVA (CONTROLE/OVA) elevou-se de maneira significativa quando comparado com o

grupo BASAL (BASAL:  $6,0 \pm 0,4 \times 10^5/\text{ml}$  vs CONTROLE/OVA:  $50,1 \pm 2,9 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $p < 0,001$ ). Por outro lado, no grupo LPS/OVA observa-se redução significativa do número total de células no LBA, quando comparada com o grupo CONTROLE/OVA (LPS/OVA:  $20,5 \pm 2,5 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $p < 0,001$ ). A comparação dos valores dos animais do grupo BASAL com daqueles do grupo LPS/OVA também apresentou diferenças significantes ( $p < 0,001$ ).



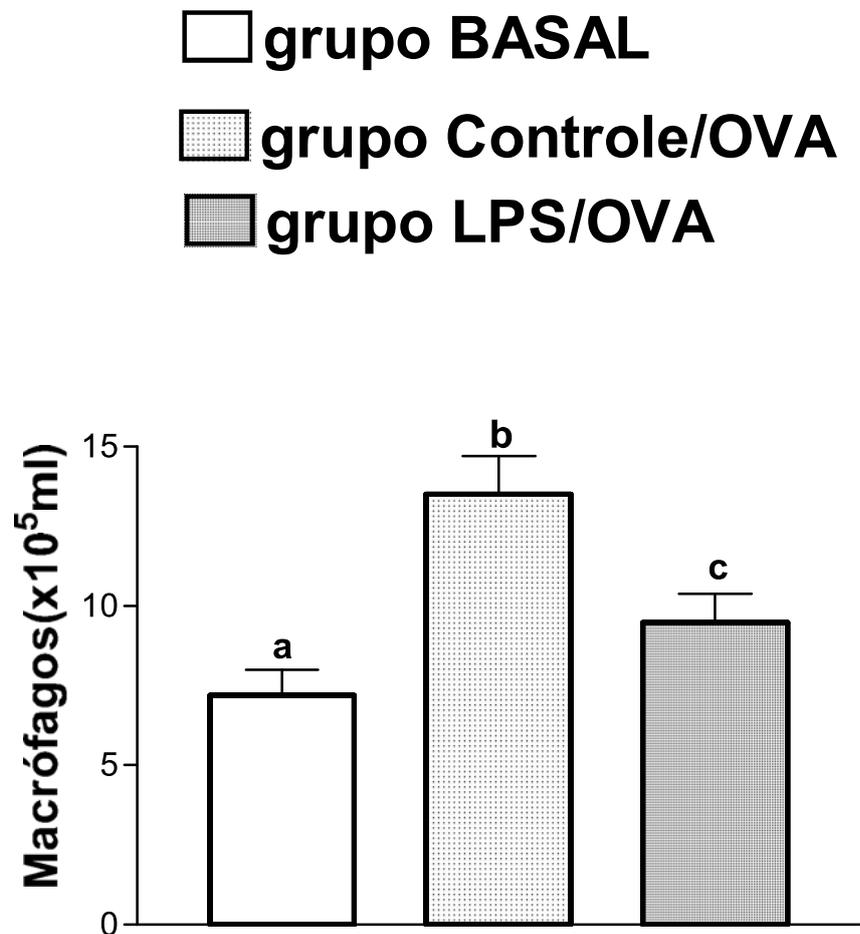
**Figura 3:** Número total de células do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados presentes na Figura 3 referem-se à contagem diferencial de células presentes no LBA desses animais. A ANOVA aplicada aos dados referentes aos macrófagos indicou diferenças significantes entre os grupos ( $F(2/27)=10,6228$ ,  $P < 0,0004$ ). O teste *post hoc* indicou aumento significativo do número de macrófagos (Figura 4,  $p < 0,001$ ) do grupo CONTROLE/OVA ( $13,52 \pm 1,2 \times 10^5/\text{ml}$ ) em relação ao grupo BASAL, ( $7,2 \pm 0,8 \times 10^5/\text{ml}$ ). Por outro lado, verificou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo LPS/OVA ( $9,49 \pm 0,9 \times 10^5/\text{ml}$ ) em relação ao grupo CONTROLE/OVA. Além disto, os valores dos grupos BASAL e LPS/OVA não diferiram ( $p > 0,05$ ).

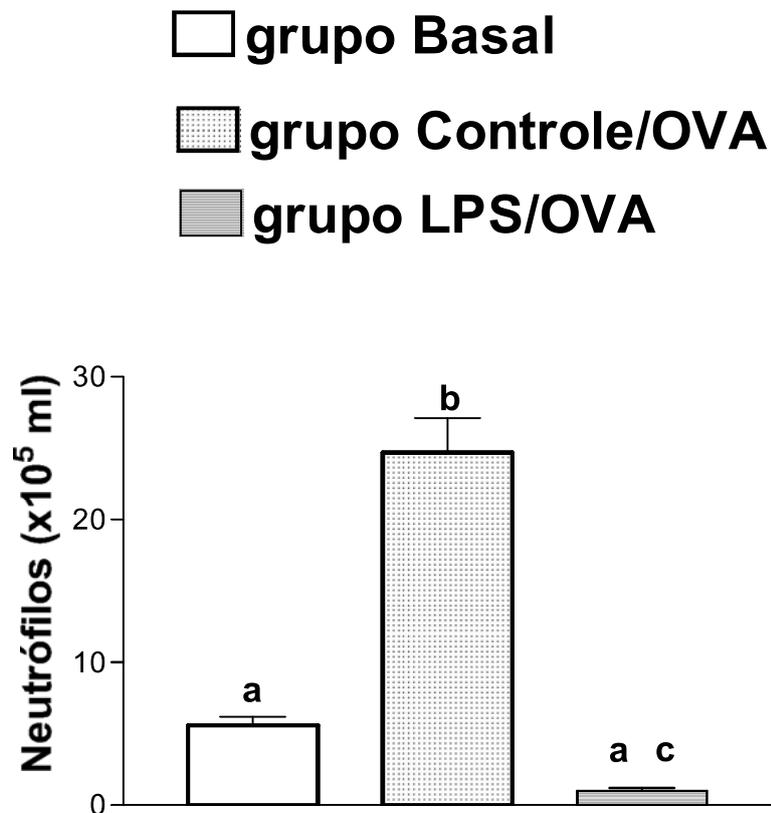
A Figura 5 representa o número de neutrófilos obtidos do LBA. A ANOVA aplicada entre os grupos indicou a existência de diferenças entre os grupos ( $F(2/27)=76,92$ ,  $p < 0,0001$ ). Como pode ser visto, o grupo CONTROLE/OVA ( $24,7 \pm 2,4 \times 10^5/\text{ml}$ ) apresentou aumento significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo Basal ( $1,0 \pm 0,2 \times 10^5/\text{ml}$ ). Ao contrário, o grupo LPS/OVA ( $5,6 \pm 0,6$ ) apresentou redução significativa ( $p < 0,001$ ) destes tipos celulares em relação ao grupo CONTROLE/OVA. Não foram observadas diferenças entre os resultados dos grupos BASAL e LPS/OVA ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao número de linfócitos (Figura 6) a ANOVA indicou a existência de diferenças significantes entre os grupos ( $F(2/27)=8,456$ ,  $P < 0,0014$ ). O teste *post hoc* mostra aumento significativo ( $p < 0,01$ ) entre os dados do grupo CONTROLE/OVA ( $9,66 \pm 1,2 \times 10^5/\text{ml}$ ) em relação ao grupo BASAL ( $2,0 \pm 0,2 \times 10^5/\text{ml}$ ). Nos animais do grupo LPS/OVA ( $4,0 \pm 0,4 \times 10^5/\text{ml}$ ), observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) do número destas células quando comparada ao grupo CONTROLE/OVA. Não foram observadas diferenças entre os valores obtidos dos grupos LPS/OVA e Basal ( $p > 0,05$ ).

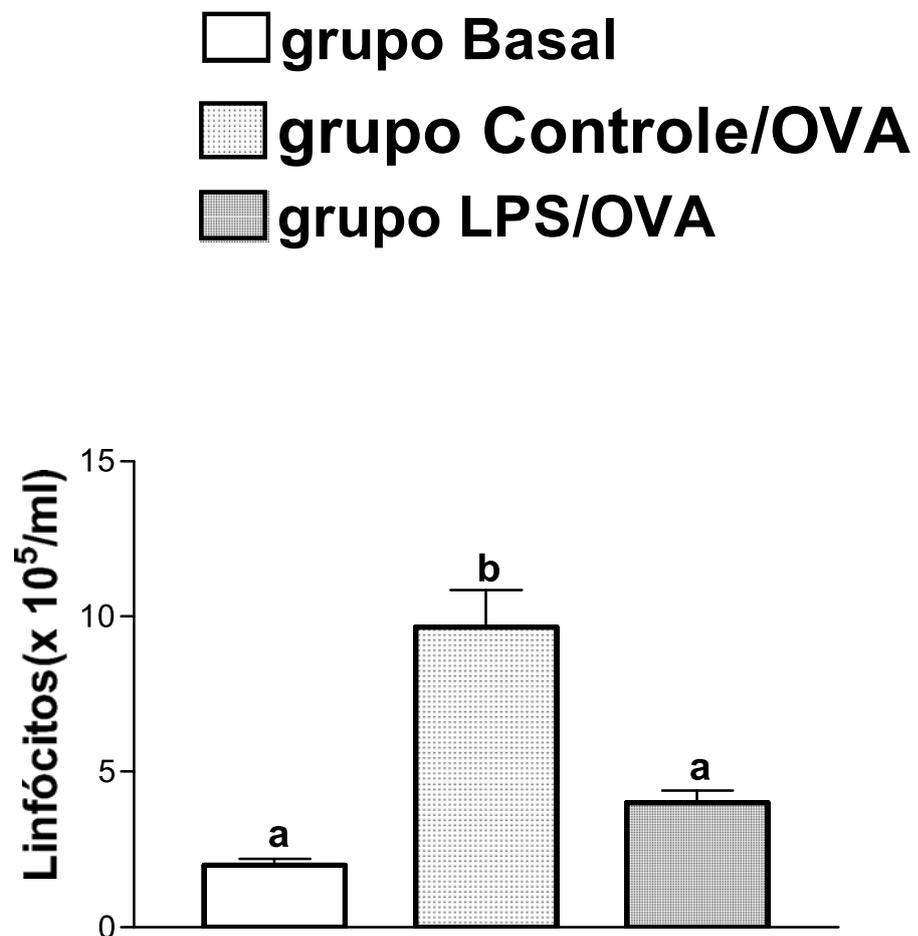
A Figura 7 representa o número de eosinófilos recuperados do LBA. Nos animais do grupo BASAL não foram detectadas a presença de eosinófilos, como esperado. O teste t de Student mostra redução significativa ( $p < 0,0001$ ) no número de eosinófilos recuperados do LBA no grupo LPS/OVA ( $1,0 \pm 0,1 \times 10^5/\text{ml}$ ) em relação ao grupo CONTROLE/OVA.



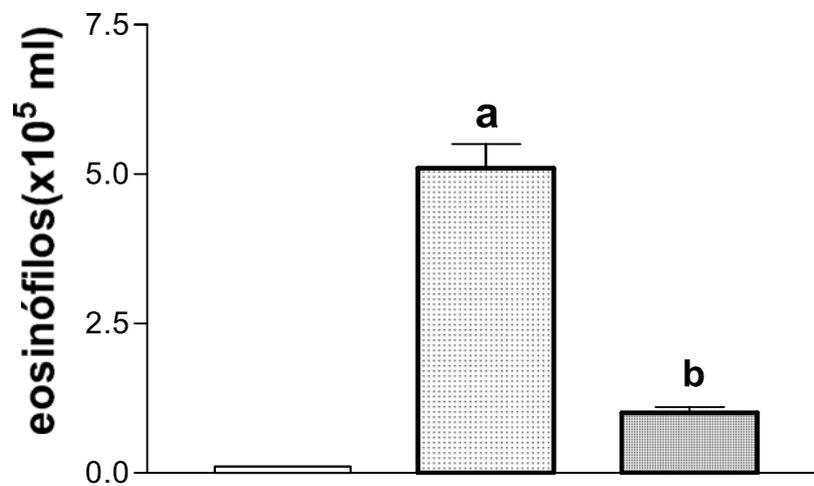
**Figura 4:** Número de macrófagos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100  $\mu$ g/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 5:** Número de neutrófilos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 6:** Número de linfócitos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 7:** Número de eosinófilos do lavado broncoalveolar de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).

### 4.3 Experimento 3: Efeitos da Administração Pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no Leucograma da Prole de Ratas Observadas na Idade Adulta.

#### Delineamento experimental

O sangue das ratas colhido no experimento 2 foi empregado para execução do leucograma, ou seja, quantificação dos leucócitos circulantes.

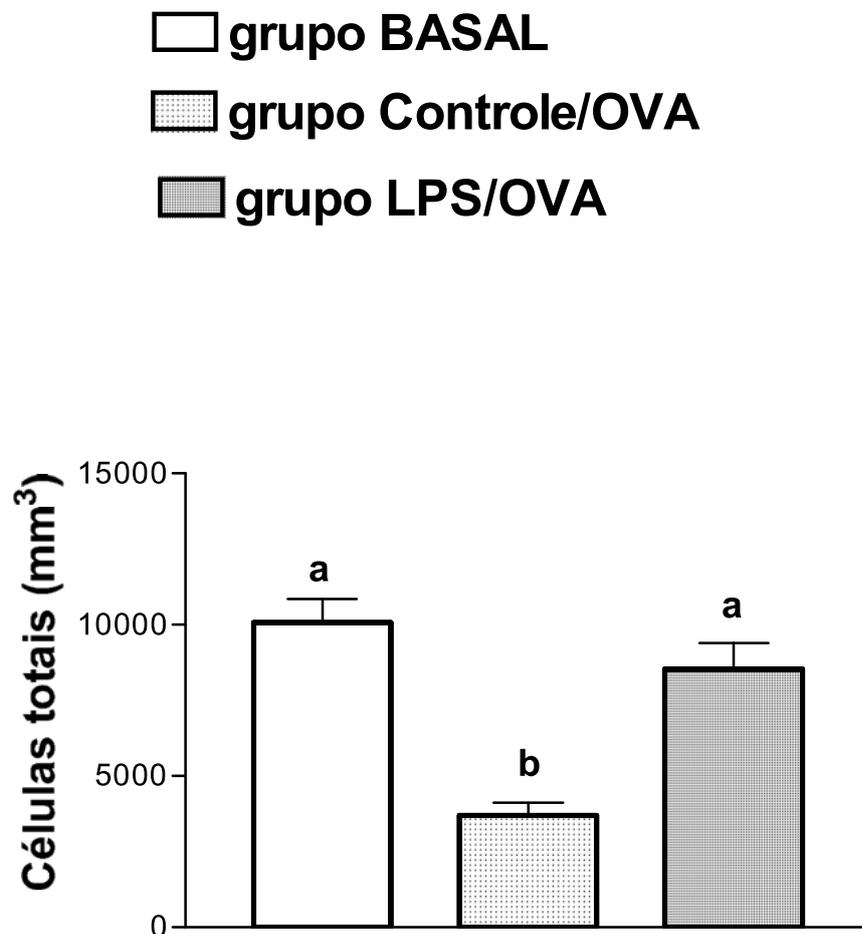
#### Resultados

A ANOVA aplicada entre os dados dos totais de células circulantes (Figura 8) indicam diferença significativa entre os grupos ( $F(2/27)=21,055$ ,  $p<0,0001$ ). A comparação dos dados do grupo CONTROLE/OVA mostrou que houve redução significativa ( $p<0,001$ ) do número total de leucócitos em relação ao grupo Basal ( $10053\pm785$  mm<sup>3</sup> vs CONTROLE/OVA:  $3675\pm447$  mm<sup>3</sup>). Por outro lado, observou-se aumento significativo ( $p<0,001$ ) no número total de células no grupo LPS/OVA quando comparado com o grupo CONTROLE/OVA (LPS/OVA:  $8513\pm873$  mm<sup>3</sup>). A comparação entre os valores dos grupos BASAL e LPS/OVA indicou ausência de diferenças entre os grupos ( $p>0,05$ ).

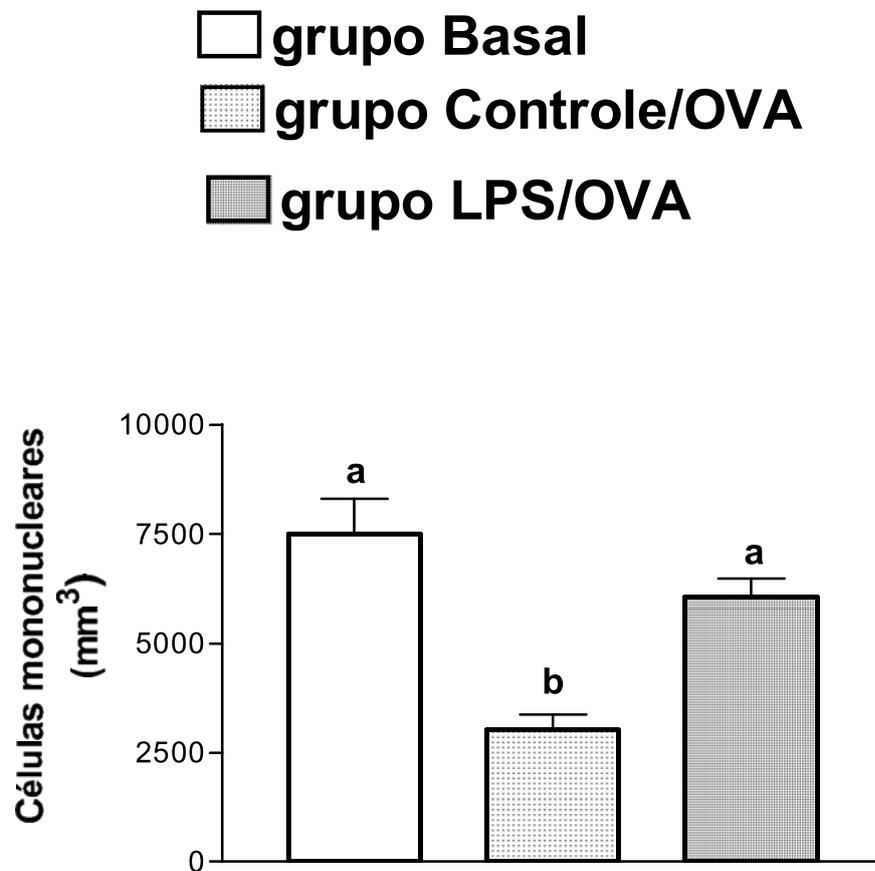
A análise diferencial (Figura 8) indicou a existência de diferenças entre os grupos (ANOVA,  $F(2/27)=16,477$ ,  $p<0,0001$ ). O teste *post hoc* mostrou redução significativa ( $p<0,001$ ) do número de células mononucleares no grupo CONTROLE/OVA ( $3016\pm345$  mm<sup>3</sup>) quando comparado com o grupo Basal ( $7500\pm805$  mm<sup>3</sup>). Já no grupo

LPS/OVA ( $6054 \pm 432 \text{ mm}^3$ ) verificou-se aumento significativo ( $p < 0,01$ ) no número de células mononucleares em relação ao grupo CONTROLE/OVA. Não houve diferenças significantes entre os valores dos grupos BASAL e LPS/OVA ( $p > 0,05$ ).

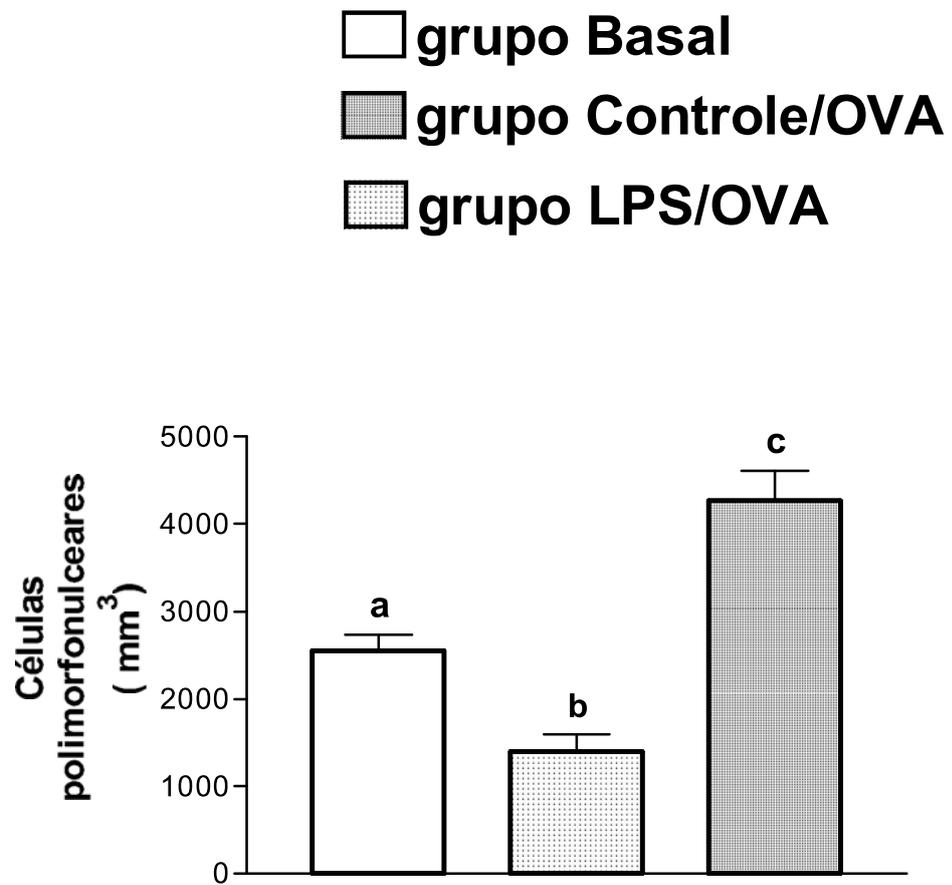
Com relação as células polimorfonucleares circulantes, a ANOVA indicou diferenças significantes entre os grupos ( $F(2/27)=32,387$ ,  $p < 0,0001$ ). Assim, observou-se redução significativa no grupo CONTROLE/OVA ( $1395 \pm 199 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0,01$ ) e no grupo LPS/OVA ( $4260 \pm 347 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparados com o grupo Basal ( $2553 \pm 180 \text{ mm}^3$ ).



**Figura 8:** Número total de células obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 9:** Número total de monócitos obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).



**Figura 10:** Número total de neutrófilos obtidos do sangue periférico de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Letras diferentes significam diferenças significativas (ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis).

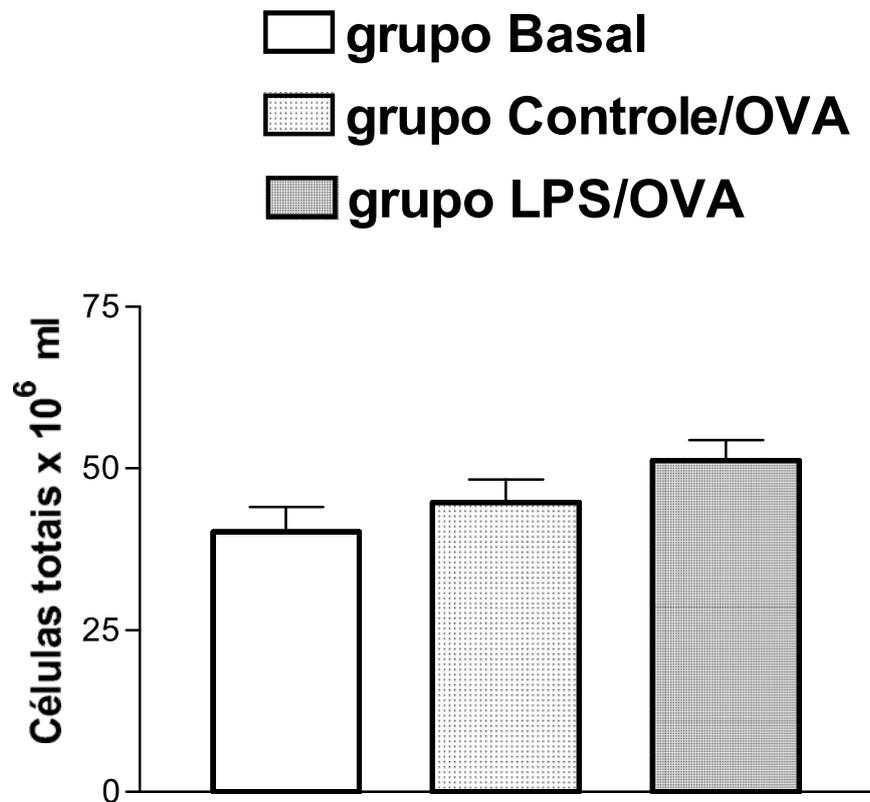
#### **4.4 Experimento 4: Efeitos da Administração Pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS no Mielograma da Prole de Ratas Observadas na Idade Adulta.**

##### **Delineamento experimental**

O lavado femural colhido no experimento 2 foi utilizado para a avaliação do mielograma da prole feminina de ratas expostas ou não ao LPS no DG 9,5.

##### **Resultados**

As células da medula óssea foram quantificadas em amostras de lavado de fêmur dos animais (Figura 11). A ANOVA não indicou a existência de diferenças entre os grupos ( $F(2/27)=2,438$ ,  $p=0,1064$ ). Os valores foram de  $40,20 \pm 3,80 \times 10^6$  para os animais do grupo BASAL,  $44,70 \pm 3,60 \times 10^6$  para os animais do grupo CONTROLE/OVA e  $51,20 \pm 3,20 \times 10^6$  para os animais do grupo LPS/OVA.



**Figura 11:** Número total de células do lavado femural de ratas ovariectomizadas, cujas mães foram tratadas no 9,5 da gestação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina, sensibilizadas e broncoprovocadas na idade adulta com OVA. Os animais do grupo Basal não foram submetidos à sensibilização e broncoprovocação com OVA, sendo considerados como controle negativo. São apresentados as médias e respectivos erros-padrão de 10 animais/grupo/ninhada. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos (ANOVA).

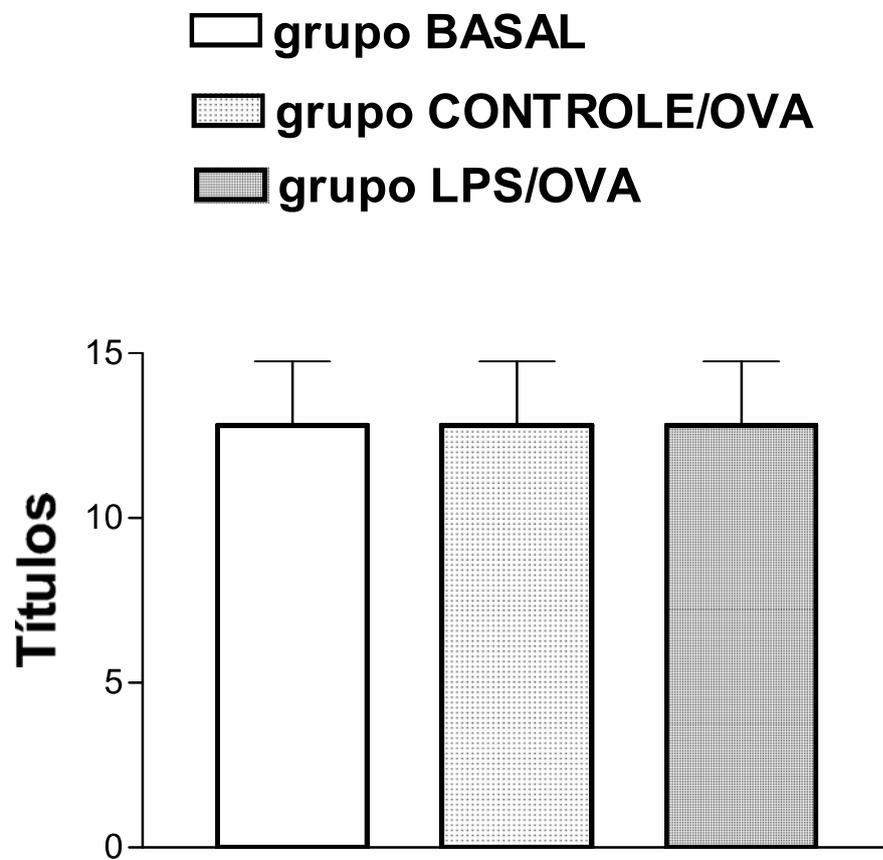
#### **4.5 Experimento 5: Efeitos da Administração Pré-natal no DG 9,5 de 100 µg/kg de LPS na Formação de Anticorpos da Prole de Ratas Observadas na Idade Adulta.**

##### **Delineamento experimental**

O sangue colhido no experimento 2 foi utilizado para o teste de anafilaxia cutânea passiva.

##### **Resultados**

Em ambos os grupos a titulação foi igual a  $12,8 \pm 1,96$  (n = 5).



**Figura 12:** Títulos de IgE de animais do grupo BASAL, CONTROLE/OVA, e LPS/OVA. A variação dos títulos de IgE dos animais foi nula

## 5 DISCUSSÃO

A administração de LPS durante a gestação é associada a diversas alterações na reprodução tais como reabsorção, morte fetal uterina, retardo no crescimento fetal intra-útero e adiantamento do parto em roedores. Neste modelo o TNF-alfa é tido como o mediador mais importante responsável por estes efeitos (SILVER et al, 1994; GENDRON et al, LEAZER et al, 2002; XU et al, 2006). Inúmeros estudos mostram que o LPS aumenta o TNF-alfa no soro materno, no líquido amniótico e na placenta (BELL et al, 2004; VIZI et al, 2001; GAYLE et al, 2004). Neste sentido, a exposição ao LPS induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase nas células da decídua e miométrio bem como aumenta a produção do óxido nítrico na decídua e no útero (OGANDO et al, 2003). As prostaglandinas, também estão envolvidas na embriotoxicidade induzida pelo LPS. Silver et al (1995) mostram que a administração durante a gestação de LPS induz a expressão da COX 2 e resulta no incremento da produção de eicosanóides decidual, seguida por morte fetal dose-dependente. Este efeito é suprimido pela administração de inibidores da COX 2 (GROSS et al, 2000; SAKAI et al, 2001). No entanto no presente trabalho, não foi observada alteração na duração da gestação de ratas tratadas com LPS no GD9,5.

A administração pré-natal de LPS reduziu o ganho total de peso na gestação de ratas, porém não alterou o peso total da prole ao nascer, no segundo dia de vida, ao desmame e na idade adulta. A redução do peso materno pode ser interpretada como resultado do comportamento doentio produzido pela administração do LPS no 9,5 dia da gestação. De fato, estudos em nosso laboratório mostram que não só a ingestão de alimentos bem como a atividade geral de ratas prenhes tratadas com LPS neste dia foram reduzidas (KIRSTEN et al, 2007). Neste sentido, a dose administrada é capaz de induzir comportamento doentio nas fêmeas, já caracterizado em nossos laboratórios por KIRSTEN et al (2007). Esses autores mostram que fêmeas prenhes que receberam LPS (100 µg/kg ) no GD 9,5 apresentaram perda de peso, redução da atividade geral e hipofagia.

Portanto, a dose administrada de LPS causou comportamento doentio materno nas ratas tratadas, já que estas apresentaram menor ganho de peso durante a gestação e provavelmente estas fêmeas apresentaram reabsorção fetal sugerido pelo menor número de filhotes das ninhadas.

Apesar de se ter observado redução no ganho de peso materno não foi detectada alteração no peso da prole ao nascer e até a idade adulta. Assim, a administração do LPS não interferiu no desenvolvimento intra-útero da prole bem como no seu desenvolvimento físico, evidenciando que, embora a homeostase materna tenha sido prejudicada, esta não foi suficiente para interferir com o desenvolvimento ponderal da prole. Além disso, se ocorresse, este efeito seria indireto, pois o LPS não chega diretamente até a prole (ASHDOWN et al 2006). Por outro lado, não foi observada alteração na duração da gestação de ratas tratadas com LPS no GD 9,5

A este respeito, no entanto, observou-se redução no número de filhotes a termo o que evidencia o efeito deletério do LPS na manutenção da gestação e corrobora com dados da literatura mostrando aumento de mortes perinatais em resultado da administração do lipopolissacarídeo (ROMERO et al, 1988, SILVER et al, 1995; GENDRON et al, LEAZER et al, 2002; XU et al, 2006).

A respeito dos resultados no modelo de asma murino experimental, no presente trabalho verificou-se redução significativa no número de células totais do LBA bem como na contagem diferencial destas células. Observou-se acúmulo no sangue de células mononucleares e polimorfonucleares circulantes indicativo que estas não migraram para o pulmão dos animais explicando ausência de resposta inflamatória. Por outro lado, não ocorreram modificações no número de células da medula no LF mostrando que a hematopoiese não foi modificada pelo tratamento pré-natal com LPS. Além disso, não ocorreram diferenças entre os títulos de IgE no teste de anafilaxia cutânea.

Assim, os presentes resultados indicam que o tratamento pré-natal no GD 9,5 com LPS alterou a migração dos leucócitos para o pulmão, além disto, a ausência de alterações celulares na medula sugere que a hematopoiese não foi modificada pelo

tratamento pré-natal e que a diferença de resposta entre os grupos LPS/OVA e CONTROLE/OVA deve-se a outros fatores imunológicos que não a produção de IgE.

Está também bastante estabelecido que processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam a interferência no ambiente fetal, podendo resultar em diversos danos a prole.

Alguns trabalhos evidenciam que a inflamação pré-natal pode lesar o pulmão fetal, deixando-o mais suscetível à displasia broncopulmonar quando presentes alguns fatores pós-natais (ventilação mecânica, sepses). Jobe (2004) evidenciou que a injeção de endotoxina (*E. coli*) no fluido amniótico de ovelhas com a realização da cesariana, 30 dias após aumentou a resposta inflamatória subsequente quando os pulmões destes pré-termos são ventilados. Neste caso, os recém nascidos receberam 6 horas de ventilação e 6 horas sem ventilação. As células nos lavados alveolares, a expressão das citocinas pró-inflamatórias e a expressão do RNAm para a proteína do surfactante não foram diferentes entre os grupos da endotoxina e solução salina quando não foram ventilados. Já no grupo exposto a endotoxina e ventilado, o lavado alveolar continha 5,7 vezes mais monócitos, 12 vezes mais linfócitos. As células do lavado broncoalveolar deste grupo ventilado exposto a endotoxina expressaram 3 vezes mais a IL-6 e IL-8 do que o grupo exposto à solução salina.

Yoon e al (1997) detectaram maiores níveis de IL-6, TNF-alfa, IL-1-beta e IL-8 no líquido amniótico de crianças recém nascidas com idade gestacional menor que 33 semanas que desenvolveram displasia bronco-pulmonar. Assim, a injúria pulmonar levou à displasia bronco-pulmonar e propôs que, em alguns recém nascidos, esta poderia ter se iniciado intra-útero.

Estas evidências levaram a hipótese de que as citocinas pró-inflamatórias poderiam atuar como sinalizadoras de maturação no feto. Estas teriam papéis sinalizadores durante o desenvolvimento pulmonar, assim como durante a lesão e reparo pulmonares.

No entanto, também existem evidências que a infecção materna perinatal pode induzir a maturação pulmonar e ao mesmo tempo, reduzir a resposta imunológica.

Em roedores a organogênese é dividida em 4 etapas: 1) o estágio pseudoglandular; 2) o estágio canicular; 3) estágio terminal sacular e 4) estágio alveolar. O estágio pseudoglandular ocorre entre os dias 12 e 14 da gestação sendo o mais vulnerável a interferências que ocorrem no âmbito materno e levam à conseqüências no desenvolvimento da asma de sua prole (PINCUS-KNACKSTEDT et al, 2006). Desta forma, escolheu-se, neste trabalho, o dia 9,5 da gestação para o tratamento materno, pois como citado, o comportamento doente foi observado por no mínimo 3 dias e assim seria atingido o início do período crítico do estágio de desenvolvimento pseudoglandular.

Há mais de uma década Baker (1995) enfatizava a existência de uma base científica entre a doença materna e a fetal, em resultado desta sua proposição uma série de investigações foram concentradas nos efeitos da malnutrição durante a gestação e seus múltiplos efeitos deletérios na saúde e o risco de doenças nos descendentes em idade adulta. Mais recentemente, os experimentos de Nepomnaschy et al (2006) sugerem que o estresse pré-natal também aumenta o risco de doenças na prole de animais e do homem na idade adulta.

A hipótese higiênica defende que a exposição precoce a determinadas infecções, vacinas ou endotoxinas pode influenciar a resposta imunológica e proteger contra doenças alérgicas em fases mais tardias da vida.

Baseia-se no princípio da exposição a agentes microbianos ou seus produtos com conseqüente aumento de produção de células Th1, alterando a relação Th1/Th2.

Uma melhor situação sócio-econômica e melhores condições higiênicas parecem estar envolvidas com o surgimento de doenças alérgicas.

Um dos exemplos mais citados na literatura mostra resultados da Alemanha logo após sua unificação (1991 a 1992). A prevalência de asma e outras doenças atópicas foi maior entre crianças da Alemanha Ocidental quando comparadas com as da Alemanha Oriental. Essa diferença se explicaria pelo maior uso de antibióticos, aditivos antimicrobianos de alimentos, vacinações e baixa exposição à alérgenos rurais pelos ocidentais.

Outros estudos também mostram uma menor prevalência de asma em crianças com estilo antroposófico de vida na Suíça. O estilo antroposófico se baseia no uso restrito de drogas (antibióticos, antipiréticos e vacinas) e alimentos industrializados. Martinez (2001) enfatiza que a relação entre a vacina contra sarampo e doenças alérgicas é controversa e propõe que o ambiente rural favorece o crescimento das crianças, pois essas estão expostas a uma grande quantidade de microorganismos e produtos bacterianos como o LPS o que diminui consideravelmente a prevalência de doenças alérgicas.

De fato, Kramer et al (2004) evidenciaram que a corioamnionite induzida por endotoxina modula a imunidade inata dos monócitos em ovelhas pré-termo. Sete a quatorze dias após a exposição a endotoxina a resposta dos monócitos excedeu a dos adultos; no entanto, uma segunda exposição 7 dias após a primeira exposição, a endotoxina suprimiu a função dos monócitos. Assim, os padrões de respostas dos monócitos foram condizentes com o desenvolvimento de tolerância a endotoxina (paralisia imune), assim como da maturação da função. Assim, a modulação da resposta fetal inata pela exposição à inflamação pode alterar subsequente a adaptação imune após o nascimento. No presente trabalho foi realizada apenas uma aplicação de LPS o que anula a possibilidade de ocorrência de paralisia imune.

Presentemente, verificou-se redução do número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos no LBA do grupo que recebeu LPS pré-natalmente e quando adultos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Com relação aos leucócitos circulantes, verificou-se aumento das células mononucleares e polimorfonucleares nos animais administrados com LPS pré-natalmente e sensibilizados e broncoprovocados com OVA na fase adulta em relação aos que não receberam o LPS. Ainda não foram observadas diferenças significativas na celularidade da medula óssea e na produção de IgE nestes animais em relação ao grupo CONTROLE/OVA. Neste sentido, não existem trabalhos na literatura mostrando o efeito do LPS pré-natal sobre a celularidade no sangue e na medula óssea.

Neste sentido, alguns estudos sugerem que a administração de LPS modula *in utero* o desenvolvimento de alergias na prole de camundongos.

Blümer et al (2005) foram os primeiros autores a identificar esse fenômeno. Eles administraram LPS antes da concepção e durante a gestação de camundongos tendo observado que a prole, após sensibilização e desafio com OVA, apresentou aumento na IFN-gamma, mas não na liberação de IL-4 e IL-2. Observaram também supressão nos anticorpos IgG1 e IgE sendo que a IgG2a não foi modificada. Paralelamente os níveis de IL-5 and IL-13 após estimulação mitógena de leucócitos do baço foram reduzidos. O lavado broncoalveolar após o desafio com OVA revelou redução significativa nos eosinófilos e macrófagos e a hiper responsividade respiratória não foi alterada. Estes dados estão de acordo parcialmente com os aqui relatados, pois além de redução nos eosinófilos e macrófagos no LBA, encontrou-se redução dos eosinófilos e neutrófilos e ausência de alterações na IgE.

Em 2006, Gerhold et al propuseram que uma estratégia para prevenir o desenvolvimento de doenças alérgicas, em particular a asma, seria a exposição pré e pós-natal a endotoxinas. Os autores observaram que a exposição pré-natal de LPS em camundongos suprime as características de doenças alérgicas das vias respiratórias na sensibilização dos filhos na idade adulta, (1) produção de IgE alérgeno específica, (2) inflamação alérgica eosinofílica, e (3) aumentou reatividade das vias aéreas *in vivo*. Para a apreciação do potencial de propriedades imunomoduladoras do LPS no que diz respeito à sua capacidade de inibir o desenvolvimento posterior da sensibilização do alérgeno na prole, mostrou-se que a inalação de LPS em doses baixas não causou qualquer efeito tóxico (GERHOLD et al, 2003). Em particular, a exposição pré-natal com LPS não causou quaisquer sintomas clínicos ou efeitos pró-inflamatórios, como inflamação alérgica neutrofílica ou o desenvolvimento de qualquer aumento de reatividade das vias aéreas em camundongos jovens.

Estes autores expuseram camundongas prenhes, três vezes por semana até o nascimento a nebulização com LPS. Após o nascimento, alguns filhotes foram expostos ao LPS e outros não. Então, todos os animais foram sensibilizados i.p. com OVA no 28º dia de vida e o desafio foi feito entre os dias 55-58 de vida, os resultados mostraram que a exposição perinatal ao LPS suprimiu a sensibilização alérgica específica, ou seja, a produção de IgE, reduziu o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e a reatividade *in vivo* a metacolina. Estes efeitos ocorreram quando o tratamento foi feito

pré e pós-natal. A supressão das respostas inflamatórias foi associada ao aumento da expressão de toll-like receptors e a expressão dos T-bet de tecidos pulmonares que sofreram mudanças em direção predominantemente para respostas imunes Th<sub>1</sub>. Portanto, a exposição iniciada prenatalmente e sustentada pósnatalmente aumentou a susceptibilidade a endotoxina e preveniu a sensibilização da prole através da inibição da resposta imune Th<sub>2</sub> observada em cultura de células de baço expostas a OVA *in vitro*. No presente trabalho pode-se também aventar que a exposição pré-natal ao LPS tenha levado às mesmas conseqüências. Acrescente-se que a causa fundamental da prevenção da sensibilização foi os leucócitos circulantes não migrarem do sangue para o pulmão, causando aumento dos mesmos neste tecido (GERHOLD, K. et al, 2006).

Outro mecanismo que poderia estar envolvido neste sistema é o desenvolvimento de tolerância ao LPS. É bem sabido que o LPS induz um estado de tolerância imunológica, que é transitória e pode ser observada após a exposição inicial ao LPS. Foi demonstrado que este mecanismo é mediado pela IL-1beta (ALVES-ROSA et al, 2002). No entanto, neste trabalho, não temos dados suficientes para implicar os resultados com o fenômeno.

Sobre o mesmo tema, Datti et al (2006) correlacionaram a exposição materna pré-natal a um estresse neste período e a progressão de doenças respiratórias em seus descendentes. O fator estressante considerado foi a infecção materna pré-natal induzida por administração de LPS. Além disso, investigaram o envolvimento do óxido nítrico com a administração pré-natal de LPS. Assim, os autores expuseram ratas prenhes a 7 ug/kg de LPS no 17 dia da gestação tratadas ou não previamente com aminoguanidina, um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). A exposição pré-natal ao LPS reduziu a inflamação alérgica pulmonar da prole destas ratas na idade adulta não tratadas com o inibidor da iNOS, quando sensibilizadas e desafiadas com OVA. Observou-se redução no número de eosinófilos broncoalveolares independente do gênero. A aminoguanidina reverteu totalmente à supressão de eosinófilos. A exposição materna ao LPS também reduziu o número de eosinófilos na medula e no sangue periférico da prole. Esta redução não ocorreu em animais tratados com aminoguanidina. Além disso, nenhuma diferença foi detectada nos níveis de TNF-alfa. Em conclusão, os autores propuseram que a exposição pré-natal ao LPS reduz o

recrutamento de eosinófilos na alergia das vias aéreas da prole na idade adulta, possivelmente por mecanismos que envolvem a ativação de iNOS. Embora, presentemente tenha se observado resultados similares, não houve alteração da hematopoiese em nossos animais.

Mais recentemente, Hodyl et al (2007) estudaram o perfil da função imune durante diferentes períodos da vida da prole de ratas expostas pré-natalmente ao LPS. As respostas foram examinadas em quatro períodos do desenvolvimento pela determinação dos subtipos de células imunes e da resposta à exposição *in vitro* ao LPS de TNF-alfa e IL-1beta. Animais lactentes não tiveram respostas típicas ao LPS enquanto que na puberdade nenhuma diferença foi detectada entre animais do grupo controle e experimental. Na idade adulta e senescência da prole de mães expostas a endotoxina apresentou menor número de monócitos circulantes. Efeitos diferenciais com relação ao sexo só foram observados em animais idosos. Portanto, o período da vida é fator importante na determinação de respostas do sistema imune. Neste sentido, não só o período de exposição, mas também a dose e a frequência da exposição podem determinar diferenças nas respostas obtidas. De fato, os trabalhos acima citados utilizaram doses e períodos perinatais diferentes deste estudo. Além disso, em todos os casos o LPS foi administrado repetidamente e no presente trabalho apenas uma vez no 9,5 dias da gestação.

Neste sentido, existem crescentes provas de que o desenvolvimento do sistema imune do feto está ativo e passivamente controlado pela imunidade materna, e que o resultado desta interação feto-maternal tem um forte impacto sobre alergias na vida adulta da prole. Além disso, foi mostrado que alérgenos específicos de células T já estão presentes ao nascimento (KOPP et al, 2001) e que o risco de desenvolver alergias é inversamente associado com a capacidade de secretar IFN-alfa durante estimulação mitogênica de leucócitos esplênicos (GEREDA et al, 2000). Uthoff et al (2003) demonstraram que exposição ao alérgeno durante a gravidez tem um forte impacto na sensibilização alérgica da prole. Pode-se distinguir entre efeitos pró-alérgico das células T CD4 e efeitos imunossupressores mediados via anticorpos maternos alérgeno-específico IgG.

O mecanismo molecular através do qual o LPS materno modula a imunidade Th<sub>2</sub> pós-natal não é totalmente compreendido ainda. O reconhecimento de LPS envolve a ação de várias moléculas incluindo a proteína ligadora do LPS (LBP), receptor de membrana monócito/macrófago (CD14) e engajamento com receptores (TLRs), como o TLR-4. É sabido que TLR-4 está expresso na placenta humana (GEREDA et al, 2000; Braun-Fahrlander et al, 2002). Permanece ainda por ser investigado se a exposição materna ao LPS desencadeia e regula o nível da expressão e da função do TLR-4 na área placentária-fetal. Esse poderia ser um mecanismo semelhante que opera na área placentária como tem sido identificado em camundongos adultos expostos ao LPS (TULIC et al, 2000; LAPA E SILVA et al, 2000; HOLMLUND et al, 2002).

É importante notar que o LPS materno reprime o desenvolvimento de respostas imunes Th<sub>2</sub> à OVA, mesmo no contexto do Al(OH)<sub>3</sub>, um potente adjuvante Th<sub>2</sub>. Além disso, não há qualquer indicação de que a imunidade Th<sub>1</sub> esteja aumentada. Este efeito inibitório Th<sub>2</sub> pode estar relacionado com o aumento da resposta neonatal ao IFN-alfa. No entanto, esta não foi associada a um reforço da resposta imune Th<sub>1</sub> a alérgenos.

Em conclusão, a exposição iniciada pré-natalmente e sustentada pós-natalmente a componentes imunomoduladores, como LPS, foram muito eficazes na supressão de respostas imunes alérgeno-induzidas das vias aéreas. Os resultados mostraram que a administração do LPS a ratas inibiu a resposta alérgica inflamatória nos animais na idade adulta sensibilizados a OVA por impedir a migração de células do sangue para o pulmão sem alterar a hematopoiese e os níveis de IgE. Embora os mecanismos subjacentes a estas alterações devam ser investigados com mais profundidade, estes resultados podem ser úteis tendo em vista as novas propostas que visam à prevenção de doenças alérgicas na prole.

## 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, estudos da administração de LPS no modelo de asma murino na prole feminina de ratas, através da injeção intraperitoneal aos 9,5 dias de gestação, pretendeu-se avaliar o desempenho reprodutivo de ratas por meio do peso corporal, o desenvolvimento da prole de ratas exposta ao LPS e avaliar, em fêmeas ovariectomizadas, sensibilizadas e desafiadas com OVA que receberam ou não LPS no 9,5 dias de gestação, as células do lavado broncoalveolar, leucograma, mielograma e a produção de anticorpos.

Várias referências mostram que existem alterações perinatais que foram aqui observadas na avaliação dos parâmetros reprodutivos através dos experimentos onde os dois grupos foram comparativamente observados. O peso das ratas tratadas com LPS diminuiu durante o período gestacional quando comparado ao grupo CONTROLE/OVA, sem que essa diferença induzisse à perda de peso da prole. Porém, a prole apresentou-se com menor número de filhotes por provável reabsorção fetal.

Na avaliação das células do lavado broncoalveolar observou-se que o grupo CONTROLE/OVA apresentou um maior número de células, ou seja, o grupo submetido ao LPS teve redução do número total de células do lavado broncoalveolar e na contagem diferencial dessas células (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos).

Os leucogramas mostraram aumento significativo do número total de leucócitos circulantes, bem como na análise diferencial de células sanguíneas circulantes (células mononucleares e polimorfonucleares).

Os experimentos não demonstraram alterações na celularidade medular, pois a administração de LPS não altera a hematopoiese.

Também não foram detectadas diferenças referente à produção de anticorpos, entre os grupos nos títulos IgE no teste de anafilaxia cutânea, por não haverem desenvolvido reações inflamatórias observadas nos experimentos realizados.

Em suma, a exposição pré-natal ao LPS no 9,5 dias da gestação reduz a resposta à asma experimental induzida por OVA na prole feminina de ratas por reduzir a migração de células imunes do sangue periférico para o pulmão, sem interferência da atividade da medula e na produção de anticorpos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. **Toll-like receptors in the induction of the innate immune response**. *Nature*, v. 406 n. 6797, p. 782-787, 2000.
- ALVES-ROSA F. et al **Interleukin-1beta induces in vivo tolerance to lipopolysaccharide in mice**. *Clin Exp Immunol*, v. 128, p. 221-228, 2002.
- ASHDOWN, H. et al **The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia**. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.
- AMMIT, A.J. **The role of mRNA stability in airway remodelling**. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 18, n. 6, p.405-415, 2005.
- AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. **Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior**. *Brain Research*, v. 773, n. 1-2, p. 149-161, 1997.
- AVITSUR, R. YIRMIYA, R. **The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness**. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 64, p. 787-796, 1999.
- BARKER, D.J. **Intrauterine programming of adult disease**. *Mol. Med. Today*, v.1, p. 418–423, 1995.
- BELVISI, M.G. **Regulation of Inflammatory Cell Function by Corticosteroids**. *Proceedings of the American Thoracic Society*. v. 1, n. 3, p. 207-214, 2004.
- BIAZE et al **T Cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm**. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 58, n. 9, p. 844-853, 2003.
- BLÜMER, N. et al **Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma**. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 35, p. 397-402, 2005.
- BOCHNER, B.S.; BUSSE. W.W. **Allergy and asthma**. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115, n.5, p. 953-959, 2005.

BOZINOVSKY, S et al **Innate Immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4.** American Journal Physiology (lung cellular and molecular physiology). v. 286, n. 4, p. 877-885, 2004.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P. **A critical appraisal of 'evidence-based medicine' in allergy and asthma.** Allergy, v. 78 Suppl 59, p. 12-20, 2004.

BRAUN-FAHRLANDER, C. et al **Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.** New England Journal of Medicine, v. 347, p. 869-877, 2002.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. Estrutura celular. In: \_\_\_\_\_. **Jawetz, Melnick & Adelberg: Microbiologia médica.** 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 6-30, 2000.

CALDER, P.C. **n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients.** Lipids, v. 39, n. 12, p. 1147-1161, 2004.

COLEMAN, J.W, LAYTON, G.T., STANWORTH, D.R. **The kinetics of *in vivo* sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE.** European Journal of Immunology, v. 13, p. 994-998, 1983.

COLLINS, J.G. et al **Effects of Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster.** Infection and Immunity, v. 62, n. 10, p. 4652-4655, 1994.

DATTI, F. et al **Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats.** Physiol Behav, v. 77, n. 1, p. 79-83, 2007.

DANTZER, R. et al **Cytokines and sickness behavior.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 840, p. 586-590, 1998.

DUNN, A.J. **Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry.** Clinical Neuroscience Research, v. 6, p. 52-68, 2006.

ENGEL, J. A. et al **Neonatal herpes simplex virus type 1 brain infection affects the development of sensorimotor gating in rats.** Brain Research, v. 863, n. 1-2, p. 233-240, 2000.

FENTON, M.J.; GOLENBOCK, D.T. **LPS-binding proteins and receptors.** Journal of Leukocyte Biology, v. 64, n. 1, p. 25-32, 1998.

GAYLE, D.A. et al **Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotrophin releasing hormone in the fetal rat brain.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. v. 286, p. R1024-1029, 2000.

GENDRON, R.L. et al **Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha.** J. Reprod. Fertil, v. 90, p. 395–402, 1990.

GEREDA, J.E.; LEUNG, D.Y.; LIU, A.H. **Levels of environmental endotoxin and prevalence of atopic disease.** JAMA, v. 284, p. 1652-1653, 2000.

GEREDA, J.E. et al **Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of asthma.** Lancet, v. 355, p. 1680-1683, 2000.

GERHOLD, K. et al **Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice.** Journal Allergy Clinical Immunology, v. 112, n. 2, 2003.

GERHOLD, K. et al **Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice.** American Academy of Allergy, 2006.

GROSS, G. et al **Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse.** Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. v. 278, p. R1415–R1423, 2000.

HARJU, K. et al **Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period.** Pediatric Research, v. 57, n. 5, p. 644-648, 2005.

HAVA, G. et al **Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy.** Developmental Psychobiology, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HODYL, N.A. et al **Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring.** Journal of Neuroimmunology, v.190, n. 1-2, p. 61-71, 2007.

HOLMLUND, U. et al **Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta.** Immunology, v. 107, p. 145–51. 2002.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica.** 20. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 99-106, 1998.

JOBE, A. **Reações inflamatórias e o desenvolvimento pulmonar no recém-nascido.** XVIII Congresso de Perinatologia, São Paulo, 2004.

KIRSTEN, T.B.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M.M. **LPS pré-natal e avaliação do desenvolvimento e no comportamento da prole masculina de ratas.** Anais da XXII Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, 2007.

KIRSTEN, T.B.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. **Maternal exposure to an endotoxin induces short and long-term decrease on male offspring social behavior.** 7th International Congress of ISNIM Rio de Janeiro, Brazil, April 2008.

KOPP, M.V. et al **Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production.** Clin Exp Allergy; v. 31, p.1536–1543, 2001.

KRAMER, B.W. et al **Endotoxin induced chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep.** Am J Respir Crit Care Med, 2004.

LAPA E SILVA, J.R. **Endotoxins, asthma, and allergic immune responses.** Toxicology, v. 152, p. 31-35, 2000.

LEAZER, T.M., et al **Role of the maternal acute phase response and tumor necrosis factor alpha in the developmental toxicity of lipopolysaccharide in the CD-1 mouse.** Reprod. Toxicol. v. 16, p. 173–179, 2002.

LENT, R. **As unidades do sistema nervoso.** In: \_\_\_\_\_. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu, p. 65-95, 2001.

LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. **The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage.** Annals of Neurology, v. 58, n. 6, p. 821-828, 2005.

LIN, Y.L.; SHICH, C.G.; WANG, J.Y. **The Functional Insufficiency of Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-regulatory cells in Allergic Asthma is Subjected to TNF-  $\alpha$  Modulation.** Allergy, v. 63, n. 1, p. 67-74, 2008.

MARTINEZ, F.D. **The coming-of-age of the hygiene hypothesis.** Respir Res, v. 2, p.129-132, 2001.

MEYER, U. et al **Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.

MIMS, C. et al **Microbiologia Médica.** 2. ed. São Paulo: Manole, p.501-534, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL **MS assina acordo com Sociedade de Pneumologia para prevenção de doenças respiratórias.** [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias\\_detalhe.cfm?co\\_seq\\_noticia=44317](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=44317), acessado em 22/06/2008.

MIYAKE, K. **Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2.** International Immunopharmacology, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

MOTA, I.; WONG, D. **Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization.** Life Science, v. 8, n. 16, p. 813-820, 1969.

NEPOMNASCHY, P.A. et al **Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 10, p. 38-42, 2006.

OGANDO D, et al **A.Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus.** Reprod Fertil Dev, v. 15, n. 5, p. 269-274, 2003.

OKAYAMA, N. et al **Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro.** Am J Physiol. v. 273, n. 5 Pt 1, p. C1581-1587, 1997.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. **Neural regulators of innate immune responses and inflammation.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 61, n. 18, p. 2322-2331, 2004.

PEACHELL, P. **Targeting the mast cell in asthma.** Current Opinion in Pharmacology, v. 5, n. 3, p. 251-256, 2005.

PINCUS-KNACSTEDT, M.K. et al **Prenatal Stress Enhances Susceptibility of Murine Adult Offspring toward Airway Inflammation.** The Journal of Immunology, v. 177, p. 8484-8492, 2006.

PLETNIKOV, M.V. et al **Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage I.** Brain pathology and behavioral deficits. Brain Research, v. 944, p. 97-107, 2002.

PUXEDDU, I. et al **Mast cells in allergy and beyond.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 35, n. 12, p. 1601-1607, 2003.

RIFFO-VASQUEZ, Y. et al **Role of sex hormones in allergic inflammation.** Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, v. 37, n. 3. p. 459-470, 2007.

ROMERO, R.; et al **The role of inflammation and infection in preterm birth.** Seminars in Reproductive Medicine, v. 25, n. 1, p. 21-39, 2007.

ROSENFELD, W.D. **Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate – reducing bacteria.** Journal of Bacteriology, v. 54, n. 5, p. 664-665, 1947.

SAKAI K, et al **Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma.** Int Arch Allergy Immunol, v. 126, n. 2, p.126-134, 2001.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. **The proinflammatory activity of lipopolysaccharide.** Postepy Biochemii, v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SHI, L. et al **Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring.** Journal of Neuroscience, v. 23, n. 1, p. 297-302, 2003.

SILVER, R.M. et al **Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis factor alpha.** Biol Reprod. v. 50, n. 5, p. 1108-1112, 1994.

TAVARES DE LIMA, W et al **Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxid and their interactions in immune complex-induced long injury.** European Journal of Farmacology, v. 358, n. 1, p. 69-75, 1998.

TILLIE-LEBLOND, I.; GOSSET, P.; TONNEL, A.B. **Inflammatory events in severe acute asthma.** Allergy, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2005.

TULIC, M. et al **Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide.** Am J Respir Cell Mol Biol, v. 22, p. 604-612, 2000.

UTHOFF, H. et al **Critical Role of Preconceptional Immunization for Protective and Nonpathological Specific Immunity in Murine Neonates.** The Journal of Immunology, p. 3485-3492, 2003.

VIZI, E.S. et al **Enhanced tumor necrosis factor-alpha-specific and decreased interleukin-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy in mice.** J Endocrinol v.171, n. 2, p. 355-361, 2001.

YIRMIYA, R. et al **The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans.** Brain Research, v. 829, n. 1-2, p. 28-38, 1999.

YOON, B.H. et al **Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia.** American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 177, n. 4, p. 825-830, 1997.

XU, D.X. et al **Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice.** Toxicology Letters, v. 163, n. 1, p. 20-29, 2006.