

---

**COMPARAÇÃO DA RESPOSTA**

---

**INFLAMATÓRIA AGUDA**

---

**ENTRE ANIMAIS**

---

**MACHOS E FÊMEAS**

---

**DA LINHAGEM WISTAR\***

---

CAMILA LAZZARETTI, **MARINA V. ANTUNES**, CAROLINE C. DA SILVA, **MILENE BORSOI**, PATRÍCIA G. ARDENGHI, **EDNA SAYURI SUYENAGA**, GIOVANA D. GAMARO

*Resumo: o estradiol tem ação imunomodulatória. Este trabalho comparou a resposta inflamatória aguda após a indução de pleurisia, em ratos machos e fêmeas. Os resultados mostraram que machos têm contagens leucocitárias aumentadas frente às fêmeas. Assim notou-se uma imunossupressão estrogênica.*

*Palavras-chave: Estradiol. Pleurisia. Machos. Fêmeas. Imunossupressão.*

Os estrógenos são hormônios esteróides derivados da molécula do colesterol, produzidos principalmente pelas células ovarianas da teca e granulosa. Seus representantes são o estriol (E), a estrona (E) e o estradiol (E), sendo o último o principal estrogênio ovariano sintetizado e de maior ação fisiológica (WIERMAN, 2007). O E<sub>2</sub> possui uma grande diversidade de ações funcionais nos sistemas biológicos, as quais são mediadas pela presença de seus receptores (ER) nucleares ou de membrana, subdivididos nas isoformas a e b. Sua ligação a esses receptores provoca uma sinalização celular de caráter genômico, por meio da transcrição de

RNA mensageiro, ou por mecanismos de cascatas de reações no ambiente citoplasmático (CAREY *et al.*, 2007).

Os receptores estrogênicos também se encontram presentes e atuantes no sistema imunológico, demonstrando sua ação em células como os leucócitos bem como os órgãos linfóides como o baço, timo e medula óssea. Baseado no exposto acima se pode explicar a maior susceptibilidade feminina a doenças auto-imunes e neuro-degenerativas, como lúpus eritematoso sistêmico (LES) com uma proporção de 9:1 com dominância no sexo feminino, artrite reumatóide (AR) e esclerose múltipla (EM). Visto que, nessas doenças há uma acentuada auto-reatividade imune mediada por linfócitos B e T, com o aumento de anticorpos auto-reativos formadores de complexos imunes (anticorpo + antígeno próprio), que provocam a sintomatologia convencional compreendida como artrites, exantemas cutâneos, anemia hemolítica auto-imune e trombocitopenia auto-imune, entre outras (ACKERMAN *et al.*, 2006; CUTOLO *et al.*, 2004; WHITACRE, 2001).

Com essa descrição, a maioria dos modelos experimentais de auto-imunidade utiliza ratas fêmeas, por sua facilidade na ativação de reações imunes contra antígenos próprios do organismo, podendo assim explicar esse fenômeno devido à presença do cromossomo sexual X, garantindo uma maior susceptibilidade e determinando a relevância do componente genético aos processos auto-imunes (SMITH-BOUVIER *et al.*, 2008).

Embora seja evidenciada a relação do estradiol em parâmetros pró-inflamatórios, é observada também sua ação antiinflamatória em relatos que demonstram uma supressão neutrofílica em mulheres no período menstrual, e uma grande variação na contagem leucocitária periférica, de acordo com as variações das fases do ciclo (NORTHERN *et al.*, 1994; BAIN, ENGLAND, 1976).

Dados obtidos do estudo *in vivo* de Mueck e colaboradores 2007, realizado em mulheres na fase do climatério, demonstram uma diminuição na dosagem de moléculas de adesão celular (P-selectina, molécula de adesão intracelular- 1 e proteína quimiotática de monócitos -1), sendo os marcadores inflamatórios dosados no estudo, após o tratamento com suplementação de estradiol oral e transdérmico. Sendo considerada a terapia hormonal como um fator protetor contra a formação de célu-

las espumosas na placa aterosclerótica, evitando a inflamação determinate da lesão.

Um contingente abrangente de estudos defende os benefícios antiinflamatórios de  $E_2$  no sistema cardiovascular, no impedimento do acréscimo de marcadores inflamatórios citados acima e de estresse oxidativo, modulando a resposta inflamatória pós-menopausa, através da regulação direta do receptor de estradiol no endotélio vascular (ARNAL *et al.*, 2004; MORI *et al.*, 2004; STÖRK *et al.*, 2004).

Do mesmo modo, nota-se a ação supressora estrôgenica em modelos experimentais (CARD *et al.*, 2006; ESPOSITO *et al.*, 2005). No modelo experimental de pleurisia descrito por Spector em 1956, é realizada a indução de inflamação aguda na pleura de ratos, por administração de carragenina.

Neste modelo, diversos autores têm descrito a ação antiinflamatória relacionada ao estradiol, em ratas fêmeas, ciclantes e em condições de suplementação de estradiol. Nessas condições, é desempenhada a diminuição de marcadores de inflamação como: a infiltração e migração de leucócitos local ou em sangue total, a síntese de produtos de ação de radicais livres como o malondialdeído (MDA), o volume de exsudato formado, a síntese de leucotrienos, prostaglandinas e a ação de enzimas como a ciclooxigenase 2 ( $COX_2$ ) e a óxido nítrico sintase (iNOS). Entretanto, nos mesmos estudos, com a experimentação realizada com animais ovariectomizadas (OVX), ou na utilização de antagonistas do estradiol, como o Tamoxifen, o ICI 182, 780, e o Raloxifeno, é verificada uma atividade inflamatória acentuada, quando comparada aos grupos experimentais citados acima. De mesmo modo, há relatos de uma possível ação estrôgenica em receptores de glicocorticóides, podendo assim revelar sua ação supressora imune (CUZZOCREA *et al.*, 2000, 2001, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2005).

Com relação ao parâmetro de citocinas, evidências apontam que o  $E_2$  inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1b, TNF, IL-6, de forma dose dependente, em períodos que a concentração de  $E_2$  atinge picos máximos na corrente sangüínea como a gestação ou a fase periovulatória, e estimula a IL-10, sendo reconhecidamente antiinflamatória, em mulheres. Na expressão de moléculas de adesão celular também é apresentada a

influência hormonal, como fator preponderante na diminuição de sua manifestação no endotélio, como a E-selectina, a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM), acarretando em mudanças e diminuindo a migração celular de leucócitos para os sítios inflamatórios. Sendo assim, a modulação do estradiol é devido à inibição de múltiplos genes que codificam citocinas, enzimas e moléculas de adesão celular (STRAUB, 2007; GAO *et al.*, 2006; BOUMAN *et al.*, 2005; GHISLETTI *et al.*, 2005; PFEILSCHIFTER *et al.*, 2005; LANG, 2004; ISLANDER *et al.*, 2003; VEGETO *et al.*, 2003; CUZZOCREA *et al.*, 2000).

No modelo experimental de indução do processo inflamatório agudo na pleura de ratos por administração de carragenina, com a utilização de ratas fêmeas ovariectomizadas (OVX) com suplementação de 17- $\beta$  estradiol, observa-se uma diminuição em parâmetros inflamatórios como, citocinas (IFN-g, TNF- $\alpha$ ), atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO – responsável pela oxidação de materiais biológicos), no grau de exsudação pleural, na contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN) em lavados bronco-alveolares, e na geração do produto de lipoperoxidação MDA, frente a animais ovariectomizados (OVX - sem suplementação) (CUZZOCREA *et al.*, 2000, 2001, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2005).

No modelo de infecção traqueal pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, os resultados demonstraram que ratos machos obtiveram maiores contagens de células inflamatórias, aumento de citocinas, e modulação da expressão de moléculas de adesão celular importantes para a atividade migratória de células polimorfonucleares no pulmão, frente às fêmeas, demonstrando a possível interação hormonal explicada pela ação pró-inflamatória da testosterona (CARD *et al.*, 2006; SPEYER *et al.*, 2005).

Em outros modelos experimentais também se observa uma ação supressora estrogênica, em danos oxidativos e inflamatórios, induzidos *in vitro*, em células de microglia (VEGETO *et al.*, 2001; BRUCE-KELLER *et al.*, 2000), *in vivo* em injúria no cordão espinhal (SRIBNICK *et al.*, 2005), e em colite experimental (VERDÚ *et al.*, 2002).

Na a verificação das fases do ciclo estral de ratas, são realizados esfregaços vaginais, para a análise dos perfis citológicos

das fases do estro e diestro relevantes ao estudo, de acordo com a maturação do epitélio da ecto e endo-cérvice, como descrito por Martins *et al.* (2005) e Marcondes e Tanno (2002), composto de células superficiais, intermediárias e profundas.

Deste modo é relevante a avaliação da resposta inflamatória aguda induzida por carragenina, na cavidade pleural, diferenciada nas fases do ciclo estral estro e diestro em comparação com animais ovariectomizados e machos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, com 5 meses de idade e peso médio de 210g, provenientes do biotério da cidade de Nova Petrópolis – RS, pertencente ao Centro Universitário Feevale, no Rio Grande do Sul - Brasil. Os animais foram mantidos 5 animais/por caixa em ambiente com luz e temperatura controlada (12h claro/12h escuro) a  $21^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$ , com acesso livre à água e ração padrão. Este trabalho possui a aprovação do Comitê em Ética e Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário Feevale sob parecer de código: 2.11.03.07.641.

Os procedimentos de experimentação animal seguiram as normas de *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (ver [http://cioms.ch/frame\\_1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm)) ou Council for the international organizations of medical sciences.

### Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: fêmeas ciclantes em estro (n=9) e diestro (n=11), ovariectomizadas (OVX n =10), *sham* (n=6), e machos (n= 8). Para a determinação dos grupos experimentais em fêmeas ciclantes foram realizados esfregaços vaginais corados pelo método de Papanicolaou para a visualização do perfil citológico característico de cada fase do ciclo estral. Na observação em microscópio óptico, a fase do estro, onde os níveis de  $E_2$  encontram-se máxi-

mos na corrente sangüínea, verificou-se uma maioria de células escamosas superficiais, e no diestro onde os níveis de E são mínimos, são encontradas uma maioria de células intermediárias e profundas (Marcondes *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005). No grupo de animais ovariectomizado (OVX) foi realizado o procedimento cirúrgico com uma incisão cutânea na linha média seguida de sutura dos tecidos, para a retirada bilateral dos ovários sob a anestesia da combinação de quetamina (120mg/Kg) e xilazina (16mg/Kg) descrito por Gamaro *et al.*, 2003. Após cinco semanas para a eliminação dos níveis de estradiol da corrente sanguínea e a recuperação, os animais OVX foram submetidos a um novo esfregaço vaginal, para a confirmação da ausência de descamação específica do epitélio vaginal. Em seguida realizou-se o ensaio de pleurisia. Da mesma forma o grupo *sham* sofreu o mesmo procedimento, entretanto não foi realizada retirada dos órgãos. O grupo de machos não sofreu nenhuma intervenção cirúrgica.

## Reagentes

Os reagentes utilizados foram: I- carragenina (SigmaÒ), quetamina (VetbrandsÒ), xilazina (VetbrandsÒ), coloração May-Grünvald- Giemsa (MGG), heparina sódica (LiquemineÒ), solução de Turk (azul de metileno, ácido acético glacial e água), tampão fosfato salina (PBS- cloreto de sódio, água, fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio – PH final -7,2).

## Metodologia de Pleurisia

A pleurisia foi induzida segundo técnica descrita por Spector, 1956. Os animais sob anestesia foram submetidos a uma incisão cutânea (3mm) junto ao rebordo costal esquerdo. Procedeu-se então, a divulsão dos músculos torácicos até a visualização do espaço intercostal, através do qual, utilizando-se uma agulha de ponta romba, injetou-se 0,1 ml de uma solução salina contendo 0,1 % de carragenina, na cavidade pleural. Os animais foram submetidos à coleta de sangue venoso periférico a partir da cauda antes e depois do processo inflamatório, gerando a confecção de câmaras de Neubauer e esfregaços sanguíneos, para contagem

de leucócitos total e diferencial, respectivamente. Quatro horas após, os animais foram novamente anestesiados para exsanguinação por secção da veia jugular interna e artéria carótida. Após a parada respiratória, foi realizada a toracotomia paraesternal bilateral com exposição da cavidade torácica, procedendo a seguir, à lavagem do espaço pleural com 2 ml de tampão fosfato salina (PBS) heparinizado. Após a coleta do exsudato pleural com auxílio de pipeta Pasteur, as células foram submetidas a três lavagens com PBS e o número total de células foi determinado através de leitura em microscópio óptico em câmara de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos no exsudato pleural foi realizada em esfregaços corados (May-Grüenwald e Giemsa), determinando-se o percentual de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados pelos testes *t* de Student e ANOVA seguido de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## RESULTADOS

Os machos e fêmeas na fase de estro apresentaram aumento significativo de leucócitos totais no sangue periférico após a administração de carragenina, (teste *t* de Student  $p < 0,01$ ). Verificou-se também diferença significativa entre os grupos, cujo número de leucócitos totais, tanto antes como após a indução do processo inflamatório foi superior no grupo dos machos comparado a fêmeas em estro, ( $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey). Resultado semelhante foi observado antes da indução da pleurisia em relação ao número de leucócitos totais em machos ser significativamente superior ao das ratas no ciclo diestro e sham (ANOVA  $p < 0,01$  seguido de Tukey). Após a administração de carragenina, todos os grupos das fêmeas apresentaram número inferior de leucócitos totais em relação aos machos, como mostrado na Figura 1. Isso significa que o  $E_2$  possui uma possível ação imunomodulatória sobre a leucopoesis

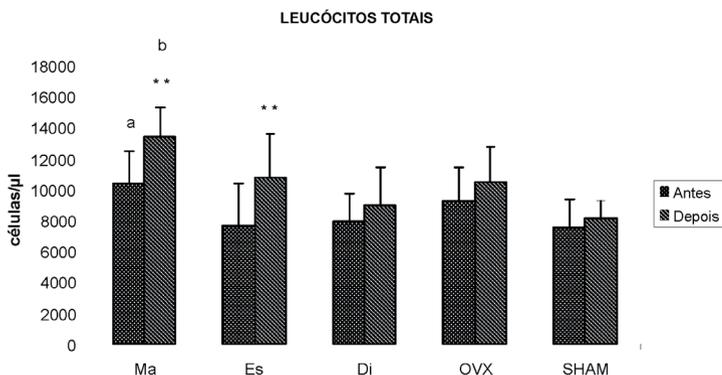


Figura 1: Número de leucócitos totais entre os grupos  
 Nota: dados expressos por média  $\pm$  desvio padrão (DP).

**Legenda:**

Ma = machos, Es = estro, Di = diestro, OVX = ovariectomizadas e *sham*

\*\* Diferença significativa antes e depois da inflamação Teste t de Student  $p < 0,01$

<sup>a</sup> Antes da inflamação  $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey – Machos x Estro/ Diestro e *Sham*

<sup>b</sup> Depois da inflamação  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$  ANOVA seguido de Tukey Machos x Estro/ Diestro/OVX

Quanto à análise das contagens diferenciais, foi observada diferença significativa no número de neutrófilos antes do processo inflamatório entre os machos e fêmeas sham, onde o primeiro grupo encontrava-se aumentado (ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey). Após a indução de pleurisia, foi verificado aumento significativo de neutrófilos em todos os grupos (teste t de Student  $p < 0,01$ ), houve diferença significativa na contagem desse tipo celular em machos, sendo superior aos demais grupos de fêmeas em estro, diestro, OVX, e sham, observado na Figura 2 (ANOVA  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  seguido de Tukey).

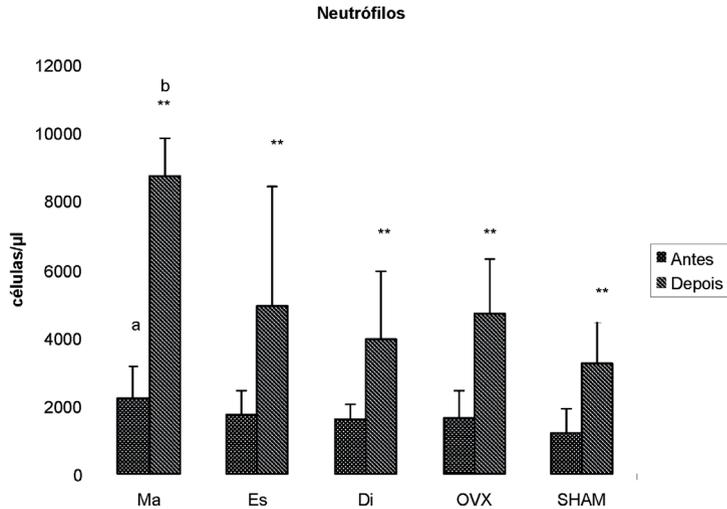


Figura 2: N3mero de Neutr3filos entre os grupos  
Nota: dados expressos por m3dia  $\pm$ desvio padr3o (DP).

Legenda:

Ma = machos, Es = estro, Di = diestro, OVX = ovariectomizadas e sham

\*\* Diferen3a significativa antes e depois da inflama33o Teste t de Student  $p < 0,01$

<sup>a</sup> Antes da inflama33o  $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey – Machos x Sham

<sup>b</sup> Depois da inflama33o  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$  ANOVA seguido de Tukey - Machos x Estro/ Diestro/OVX/ Sham

Em rela33o ao n3mero de mon3citos, houve redu33o significativa nas ratas OVX (teste t de Student  $p < 0,01$ ), ap3s a administra33o da carragenina. O grupo sham apresentou diferen3a significativa no n3mero de mon3citos com redu33o deste tipo celular, antes da indu33o da pleurisia em rela33o aos demais grupos: machos, f3meas em estro, em diestro e f3meas OVX (ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey). Ap3s a administra33o de carragenina, houve diferen3a significativa entre os grupos (ANOVA  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  seguido de Tukey), exceto entre o grupo de machos e f3meas na fase estro, como descrito na Figura 3.

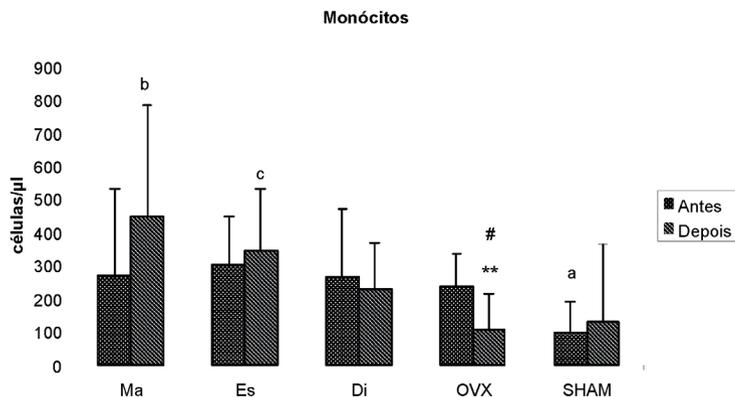


Figura 3: Número de monócitos entre os grupos

Nota: Dados expressos por média  $\pm$ desvio padrão (DP)

Legenda:

Ma = machos, Es = estro, Di = diestro, OVX = ovariectomizadas e sham

\*\* Diferença significativa antes e depois da inflamação Teste t de Student  $p < 0,01$

<sup>a</sup> Antes da inflamação  $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey – Sham x Machos/ Estro/Diestro/OVX

<sup>b</sup> Depois da inflamação  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey – Machos x Diestro/OVX/ Sham

<sup>c</sup> Depois da inflamação  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  ANOVA seguido de Tukey – Estro x Diestro/OVX/ Sham

<sup>#</sup> Depois da inflamação  $p < 0,05$  ANOVA seguido de Tukey – OVX x Diestro

Na análise do número de linfócitos verificou-se redução significativa no grupo de fêmeas em estro antes da indução da inflamação, em relação ao grupo de machos (ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey). Todos os grupos, exceto as fêmeas em estro apresentaram diminuição significativa no número de linfócitos após a administração da carragenina, (teste t de Student  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), mostrado na Figura 4.

## LINFÓCITOS

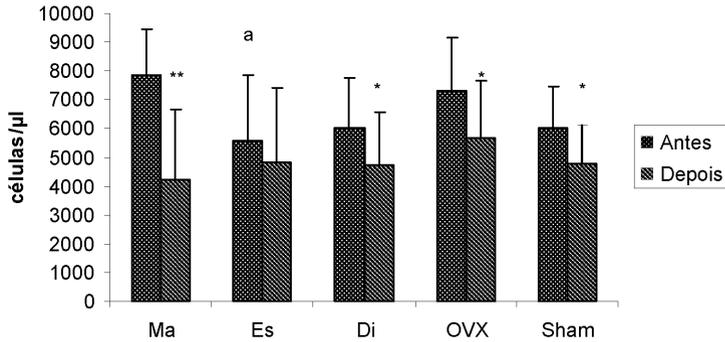


Figura 4: Número de linfócitos entre os grupos

Nota: Dados expressos por média  $\pm$  desvio padrão (DP)

Legenda:

Ma = machos, Es = estro, Di = diestro, OVX = ovariectomizadas e *sham*

\* Diferença significativa antes e depois da inflamação Teste t de Student  $p < 0,05$

\*\* Diferença significativa antes e depois da inflamação Teste t de Student  $p < 0,01$

<sup>a</sup> Diferença significativa antes da inflamação ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey – machos x estro

Na análise do exsudato pleural foi observada diferença estatística significativa no número de células migradas à cavidade torácica entre o grupo de fêmeas em estro e diestro, sendo que o último representou 65,8% de células totais migradas do grupo estro, o qual apresentou predomínio significativo de células mononucleadas, demonstrando que mesmo havendo diferença estatística significante, possivelmente o resultado descrito ressalta a situação normal encontrada em ratos, onde células monomorfonucleares são encontradas mais abundantes que as polimorfonucleares, (ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey), como observado na Figura 5.

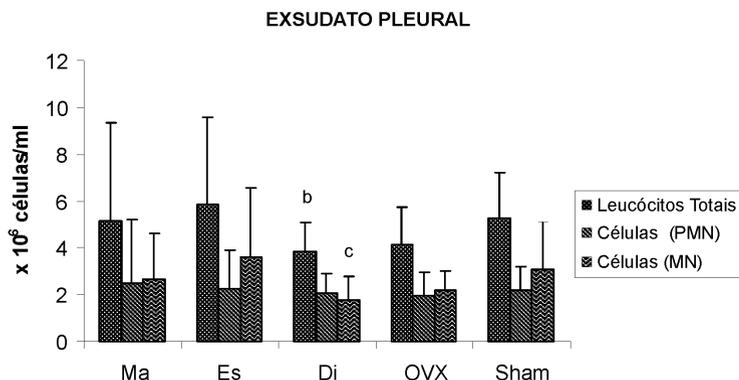


Figura 5: Exsudato pleural – Número de leucócitos totais / células polimorfonucleares (PMN)/ células monomorfonucleares (MN) entre os grupos

Nota: dados expressos por média  $\pm$  desvio padrão (DP)

Legenda:

Ma = machos, Es = estro, Di = diestro, OVX = ovariectomizadas e *sham*

<sup>b</sup> Diferença significativa ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey – estro x diestro

<sup>c</sup> Diferença significativa ANOVA  $p < 0,05$  seguido de Tukey – estro x diestro

## DISCUSSÃO

A inflamação pulmonar aguda realizada pela técnica de pleurisia é obtida através da injeção de carragenina no espaço pleural. Esse agente flogístico é amplamente utilizado na indução de inflamação pulmonar ou em edema de pata, por ser um polisacarídeo sulfatado de alto peso molecular, que permite o envolvimento de mediadores vasculares na evolução do processo, onde principalmente sua interação se dá pela infiltração neutrofílica e macrófagos fagocitadores de carragenina. Há também a liberação de histamina, bradiquinina, prostaglandinas e citocinas, com a produção concomitante de espécies reativas de oxigênio (EROs)

como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, e o superóxido, pelas células inflamatórias (CORSINI *et al.*, 2005).

Os resultados demonstraram que ratos machos diferem das fêmeas nas contagens de leucócitos totais e diferenciais, bem como nas células neutrofílicas e linfocíticas, antes e depois do processo inflamatório, indicando uma resposta gênero-específica nesses parâmetros.

No estudo de Doeing *et al.* (2003), demonstra-se uma modulação sexual, onde os hormônios esteróides sexuais têm efeito na regulação dos leucócitos circulantes, pois o 17- $\beta$  estradiol e a progesterona, podem modular a expressão de moléculas de adesão celular em leucócitos periféricos em ratos e ratas, assim afetando a circulação e ativação dos mesmos (CHERNYSHOV *et al.*, 2002), entretanto nesse estudo não foram feitos esfregaços vaginais para a determinação da fase do ciclo em que as fêmeas encontravam-se. Em outro trabalho, Bain e colaboradores (1976) observam uma queda neutrofílica em mulheres, no período menstrual, o que pode ser explicado com o aumento da infiltração dessa linhagem celular na cavidade uterina, no modelo experimental em ratos tratados com estradiol (GAUNT *et al.*, 1985). Outro estudo (SUBANDRIO *et al.*, 2000), correlaciona a fase do ciclo estral (estro) com a contagem neutrofílica, sendo observado uma diferença na média da concentração desse tipo celular nos diferentes estados reprodutivos em bovinos, determinando um dimorfismo sexual, nas respostas imunes.

Dados da literatura têm relatado sobre a interação do E<sub>2</sub> com moléculas de adesão celular, atuando na supressão da expressão das mesmas e de seus receptores, podendo sugerir um dos mecanismos de ação antiinflamatória desse hormônio (GAO *et al.*, 2006; LANG, 2004). Em cultura de células de veia endotelial umbilical (HUVECs), o E<sub>2</sub> inibiu a expressão de moléculas de adesão, como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, induzidas por IL-1 $\beta$ , (CAULIN-GLASER *et al.*, 1996). MURKHERJEE e colaboradores, também demonstraram que o metabólito do estradiol, o 17-epiestriol, produzido *in vivo* é mais potente que o estradiol na inibição de VCAM-1, em células HUVECs.

Além da supressão estrogênica alguns pesquisadores, sugerem que em ratos machos exista um aumento das moléculas de adesão celular refletindo em um maior recrutamento e adesão de leucóci-

tos, principalmente neutrófilos, afetando assim a circulação dessas células. As moléculas de adesão contribuem para a diapedese das células de defesa para pulmão, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas significantes nesse sítio inflamatório, no presente trabalho (YU *et al.*, 2006; SPEYER *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2004; DOEING *et al.*, 2003). Tais resultados obtidos no presente estudo podem ser explicados de acordo com os estudos já citados, entretanto as moléculas de adesão celular não foram o foco do estudo de nosso trabalho.

Uma outra possível propriedade antiinflamatória de E<sub>2</sub> explicada por Josefsson *et al.* (1992), relata a supressão desse hormônio sinalizada na medula óssea, sugerindo efeitos na distribuição de células polimorfonucleares circulantes no organismo.

Na avaliação diferencial dos monócitos antes da inflamação, o grupo *sham* mostrou a contagem diminuída frente a todos os grupos estudados, o que manteve-se após o procedimento, onde o grupo de machos esteve aumentado nesse parâmetro frente ao diestro, OVX e *sham*, possivelmente explicado na relação com as moléculas de adesão celular sugerido acima, e na interação com produção medular de células inflamatórias. Novamente visualiza-se uma possível ação de E<sub>2</sub> na supressão de mediadores inflamatórios pois os animais *sham* possuem sua ciclagem e produção estrogênica normal, o que pode determinar a diminuição nos monócitos circulantes em relação aos outros grupos, o que está de acordo com os estudos de Bouman *et al.* (2005) e Lang (2004). Assim, os nossos resultados corroboram com os mesmos estudos citados acima com a análise após a inflamação, em que os animais machos determinaram maiores contagens em relação aos outros grupos.

Outra possibilidade da interação do estradiol com o sistema imune pode ser explanada através de sua influência com glicocorticóides. Dessa maneira em 2007, Cuzzocrea e colaboradores indicaram possíveis implicações na modulação imunológica que o E<sub>2</sub> determinou no modelo experimental de pleurisia, com a utilização de um tratamento com dexametasona (DEX), estradiol, ICI 182,70 e Tamoxifen (antagonistas de E<sub>2</sub>) em diferentes grupos experimentais. Seus resultados determinaram que a co-administração de um antagonista do receptor de estradiol bloqueou significativamente o efeito da DEX. Sugere-se também nesse estudo que o efeito inibitório desse glicocorticoide pode ser parcialmente dependente

da ativação de ER. Com relação a presença de receptores em neutrófilos, sugere-se nesse mesmo trabalho a expressão de GR e ER na membrana dos mesmos, indicando uma regulação de função, através da diapedese.

Desse modo estrógenos podem ligar-se em receptores de glicocorticóides contidos nos tecidos, dimerizando-os e regulando a transcrição de genes alvo, para a ligação a específicas seqüências de DNA, nomeadas elementos responsivos aos glicocorticóides. Sabe-se das ações dos mesmos, onde há um aumento da transcrição dos genes que codificam proteínas antiinflamatórias, incluindo lipocorina-1, IL-10, antagonista do receptor de IL-1, entre outros, e inibem a expressão de fatores de transcrição como o NF-kB, múltiplos genes inflamatórios codificadores de citocinas e receptores de moléculas de adesão celular (SOUTHERLAND *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1989).

Na análise de exsudato, observamos na contagem de leucócitos totais um aumento no grupo do estro frente ao diestro, o que está relacionado com o aumento de células mononucleadas (MN) na avaliação diferencial e dos leucócitos totais devido a esse parâmetro. Entretanto não pode-se afirmar que o E teve uma função imunossupressora no local da inflamação. Essa caracterização é visualizada somente com a diminuição da infiltração de células polimorfonucleadas (PMN) na cavidade pulmonar, como demonstrado no estudo de Cuzzocrea *et al.* (2000).

Os trabalhos realizados com o modelo experimental de pleurisia em ratas fêmeas (CUZZOCREA *et al.*, 2000; 2001; 2007; ESPOSITO *et al.*, 2005), demonstram a ação supressora estrôgenica, através da medida de diversos parâmetros, como: enzimáticos (mieloperoxidase MPO, óxido nítrico sintase iNOS) e marcadores de estresse oxidativo como por exemplo, o malondialdeído (MDA), análises histológicas, citocinas, reação da polimerase em cadeia (PCR), prostaglandinas, os quais não foram o foco do trabalho em questão, podendo assim diminuir a sensibilidade das análises e a correlação de resultados.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que ratas fêmeas ciclantes possuem contagens de leucócitos totais, neutrófilos, e monócitos diminuídas, indicando uma possível ação supressora e imunomodulatória do estradiol, nas contagens de leucócitos em sangue periférico.

## COMPARISON BETWEEN THE ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE MALE AND FEMALE ANIMALS OF THE WISTAR STRAIN

*Abstract: Estradiol has an immunomodulatory action. This study compared the acute inflammatory response after the induction of pleurisy, in male, and female rats. The results showed that male have increased leukocyte counts when compared with female. Thus, it observes an estrogenic immunosuppression.*

*Keywords: Estradiol. Pleurisy. Male. Female. Immunosuppression.*

### Referências

ACKERMAN, L.S. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Archives of Dermatology*, v. 142, p. 371- 376. 2006.

ARNAL, J-F. et al. Estrogens and atherosclerosis. *European Journal of Endocrinology*, v. 150, p.113-117. 2004.

BAIN, B. J.; ENGLAND, J.M. Normal Haematological Values: Sex Difference in Neutrophil Count. *British Medical Journal*, v.1, p. 306-309. 1976.

BOUMAN, A; HEINEMAN, M. J; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 411- 423, 2005.

BRUCE-KELLER, A.J. et al. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*, v. 141, p. 3646-3656. 2000.

CARD, J.W. et al. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 177, p. 621- 630, 2006.

CAREY, M. A. et al. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal models. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 293, p. 272- 278, 2007.

CAULIN-GLASER, T; WATSON, C.A; PARDI, R; BENDER J.R. Effects of 17-b-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of Clinical investigation*, v. 98, p. 36-42, 1996.

CHERNYSHOV, V. P; VODIANYK, M. O; HREKOVA, S.P. Effect of female steroid hormones on expression of adhesion molecules by peripheral blood leukocytes. *Fiziologichnyi Zhurnal*, v. 48, p. 46-53, 2002.

CORSINI, E. et al. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in

old rats. *Immunology*, v. 115, p. 253-261, 2005.

CUTOLO, M; et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, v. 13, p. 635-638, 2004.

CUZZOCREA, S; et al. 17 $\beta$ -estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinology*, v. 141, n. 4, p. 1455-1463, 2000.

CUZZOCREA, S. et al. The protective role of endogenous estrogens in carrageenan-induced lung injury in the rat. *Molecular Medicine*, v. 7 n.7, p. 478-487, 2001.

CUZZOCREA, S. et al. Estrogen receptor antagonist fulvestrant (ICI 182,780) inhibits the anti-inflammatory effect of glucocorticoids. *Molecular Pharmacology*, v. 71, n.1, p.132-144, 2007.

DOEING, D. C; BOROWICZ, J. L; CROCKETT, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *Biomed Central Clinical Pathology*, v. 3, n. 3, 2003.

ESPOSITO, E. et al. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces carrageenan-induced acute inflammation in normal and ovariectomized rats. *Endocrinology*, v.146, p. 3301-3308, 2005.

GAMARO, G. D; PREDIGER, M. E; LOPES, J. B; DALMAZ, C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 76, p. 327- 333, 2003.

GAO, H. et al. Estrogen attenuates vascular expression of inflammation associated genes and adhesion of monocytes to endothelial cells. *Inflammation Research*, v. 55, p. 349-353, 2006.

GAUNT, S.D; PIERCE, K.R. Myelopoiesis and marrow adherent cells in estradiol-treated mice. *Veterinary Pathology*, v. 22, p. 403-408. 1985.

GHISLETTI, S; MEDA, C; MAGGI, A; VEGETO, E. 17-Beta estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-Kappa b intracellular localization. *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, p. 2957- 2968, 2005.

ISLANDER, U. et al. Influence of oestrogen receptor and on the immune system in aged female mice. *Immunology*, v. 110, p. 149-157, 2003.

JOSEFSSON, E; TARKOWSKI, A; CARLSTEN, H. Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell Immunology*, v.142, n.1, p. 67-78. 1992.

KIM, J. K.; LEVIN, E.R. Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nuclear Receptor Signaling*, v. 4, p. e013, 2006.

LANG T, J. Estrogen as an immunomodulator. *Clinical Immunology*, v. 113, p. 224 -230, 2004.

MARCONDES, F.K.; TANNO, A.P. Determination of the Estrous Cycle Phases

of Rats: Some Helpful Considerations. *Brazilian Journal Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609- 614, 2002.

MARTINS, R. R.; PEREIRA, N. M. L. ; SILVA, T. M. A. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 20, p. 46-49, 2005.

MILLER, A.P. et al. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation*, v.110, p. 1664-1669, 2004.

MORI, M. et al. Suppression by 17-estradiol of monocyte adhesion to vascular endothelial cells is mediated by estrogen receptors. *Life Sciences*, v.75, p. 599-609, 2004.

MUECK, A.O. et al. Low dose continuous combinations of hormone therapy and biochemical surrogate markers for vascular tone and inflammation:transdermal versus oral application. *The Journal of the North American Menopause Society*, v.14, n.6, p. 978-984, 2007.

MUKHERJE, T. K. et al. Epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1(VCAM-1) mRNA expression. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 278, p.11746-11752, 2003.

NORTHERN, A. L.; RUTTER, S. M; PETERSON, C. M. Cyclic Changes in the Concentrations of Peripheral Blood Immune Cells During the Normal Menstrual Cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 207, p. 81-88, 1994.

PFEILSCHIFTER, J; DITZ, R; PFOHL, M; SCHATZ, H. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Review*, v. 23, n. 1, p. 90-119, 2002.

**SMITH-BOUVIER, D.L. et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 5, p.1099-1108, 2008**

SRIBNICK, E. A. et al. Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Research*, v. 82, p. 283-293, 2005.

SPECTOR, W.G. Determination altered capillary permeability in acute inflammation. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 72, p. 380-387, 1956.

SPEYER, C.L. et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. *American Journal of Physiology -Cell Physiology*, v. 288, p. 881-890, 2005.

STÖRK, S; et al. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in women: a critical appraisal. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 15, n. 2, p. 66-72, 2004.

STRAUB, R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 5, p. 521-574, 2007.

SUBANDRIO, A.L; SHELDON, I.M; NOAKES, D. E. Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. *Theriogenology*, v. 53, p. 1591-1608, 2000.

SUTHERLAND, R.L. et al. Estrogen and progesterone regulation of cell cycle progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 3, p. 63-72, 1998.

VEGETO, E. et al. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n.6, p. 1809-1818, 2001.

VERDÚ, E.F ; DENG, Y; BERCIK, P; COLLINS, S.M. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal Liver Physiology*, v. 283, p. 27-36, 2002.

WIEMAN, M.E. Sex steroid at target tissues: mechanisms of action. *Advances in Physiology Education*, v. 31, p. 26-33. 2007.

WHITACRE, C.C. Sex Differences in Autoimmune Disease. *Nature Immunology*, v. 2, p. 777-780, 2001.

YU, H-P. et al. Tissue-specific expression of estrogen receptors and their role in the regulation of neutrophil infiltration in various organs following trauma-hemorrhage. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 79, p. 963-970, 2006.

ZHOU, F. BOUILLARD, B. PHARABOZ- JOLY, M.O. ANDRE, J. Non classical antiestrogenic actions of DEX in variant MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Molecular Cell Endocrinology*, v. 66, p.189-197, 1989.

\* Recebido em: 02.03.2010.

Aprovado em: 17.03.2010.

Agradecemos ao Centro Universitário Feevale e à FAPERGS pelo apoio financeiro concedido.

**CAMILLA LAZZARETTI**

Biomédica pelo Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde, curso de Biomedicina, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. *E-mail*: camillinhallazzaretti@yahoo.com.br

**MARINA VENZON ANTUNES**

Biomédica responsável técnica pelo Laboratório de Toxicologia do Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde, curso de Biomedicina, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. *E-mail*: marinaantunes@feevale.br

CAROLINE CALICE DA SILVA

Biomédica formada pelo Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde, curso de BIOMEDICINA, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. *E-mail*: carol.calice@gmail.com

MILENE BORSOI

Biomédica formada pelo Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde, curso de BIOMEDICINA, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. Mestranda no PPG Neurociências UFRGS. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, RS. *E-mail*: mileneborsoi@gmail.com

PATRÍCIA GROLLI ARDENGHI

Doutora em Bioquímica pela UFRGS. Professora de Imunologia dos cursos de Biomedicina e Ciências Farmacêuticas no Centro Universitário FEEVALE no Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. *E-mail*: pardenghi@yahoo.com.br

Edna Sayuri Suyenaga

Doutora em Bioquímica pela UFRGS. Professora de Química Farmacêutica e Farmacologia dos cursos de Biomedicina e Ciências Farmacêuticas no Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS. *E-mail*: ednafarm@yahoo.com.br

Giovana Duzzo Gamaro

Doutora em Bioquímica pela UFRGS. Pós-doutoranda em Ciências Ambientais na UFCSPA. Rua Sarmiento Leite, 245 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *E-mail*: ggamaro@yahoo.com.br