

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Ana Carolina Ramos Lopes

**IMPACTO DA OBESIDADE E DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NO  
SISTEMA RESPIRATÓRIO**

Alfenas/MG  
2019

Ana Carolina Ramos Lopes

**IMPACTO DA OBESIDADE E DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NO  
SISTEMA RESPIRATÓRIO**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Alfenas-MG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa Dra. Roseli Soncini

Alfenas/MG  
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

L864i Lopes, Ana Carolina Ramos.  
Impacto da obesidade e dos hormônios sexuais femininos no sistema respiratório / Ana Carolina Ramos Lopes -- Alfenas/MG, 2019.  
85 f. : il. --

Orientadora: Roseli Soncini.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Estradiol. 2. Respiração Artificial. 3. Colágeno Tipo I. 4. Receptores Estrogênicos. 5. Resistência das Vias Respiratórias. I. Soncini, Roseli. II. Título.

CDD-612.2

ANA CAROLINA RAMOS LOPES

"OBESIDADE E HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS: IMPACTO NO SISTEMA  
RESPIRATÓRIO".

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em  
Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de  
Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.  
Orientadora: Profa. Dra. Roseli Soncini

Aprovado em: 04/11/2019

Profa. Dra. Roseli Soncini  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Luiz Marcelo Oliveira Santos  
Instituição: Universidade de São Paulo  
– USP - SP

Assinatura: 

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

*“Ao meu pai Antonio Carlos que apoiou meu amor pela ciência mesmo sem compreender o que significava isso”*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade oferecida.

Aos animais que cederam sua vida para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

À Profa. Dra. Roseli Soncini, pela orientação recebida durante esses dois anos, pela grande amizade construída ao longo de 4 anos, por acreditar naquela menina meio sem jeito e desastrada que chegou no seu laboratório pedindo por um estágio mim, pelo carinho que sempre demonstrou para todos os seus alunos, por ser uma orientadora mais humana que eu poderia ter ao longo desse processo e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Bruno Zavan pela paciência e parcerias nas tardes de mecânicas intermináveis, pela amizade construída ao longo desses dois anos, pela compreensão quando uma explicação não bastava e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Roberto, e ao Dr. Délcio pelo conhecimento cedido e material para a realização dos experimentos de PCR que virão futuramente.

Ao meu pai Antonio, que faleceu no início dessa jornada, mas que fez o possível e o impossível para tornar o meu sonho de ser uma cientista uma realidade.

À minha mãe Sandra e a minha irmã Gabriela, pela compreensão da minha ausência em alguns momentos importantes que se passaram, pelo amor e pelo carinho que sempre recebi quando voltava para casa exausta e pelo suporte ao longo de toda essa jornada.

Ao meu namorado Lucas, por toda a paciência durante meus experimentos, pelas noites e madrugadas passadas no laboratório para me fazer companhia, por entender meu cansaço quando chegava em casa, por compreender minha ausência e distância em diversos momentos da nossa vida, por me dar todo o amor e carinho nos momentos de grande dificuldade e por todo suporte que me fez chegar até o final.

Aos meus amigos do laboratório (Luiz, Yuri, Tânia) pela parceria nas manhãs de cirurgias, pelo suporte nas tardes corridas e intermináveis de mecânica que no final já saíamos dançando ao ritmo do FlexVent, pelos epitélios perdidos na confecção da lâminas histológicas, pelas aventuras vividas durante as horas de coloração, pela imaginação fértil em encontrar formas para as lâminas de colágeno, por embarcarmos comigo na busca da foto de fibra elástica perfeita e pela amizade construída no tempo que passamos juntos dentro e fora do laboratório.

*“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”. - Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

A obesidade é caracterizada pelo aumento das reservas de gordura corporal e é a principal causa de doenças metabólicas no mundo. Na última década houve um aumento de 7,5% na frequência de adultos obesos no Brasil, em mulheres houve um aumento de 8,2% nesse período, e atualmente sua relevância equivale à aproximadamente 20 a cada 100 mulheres, acometidas pela doença. O impacto da obesidade, por si só, sobre o sistema respiratório é muito pouco estudado. O crescente aumento de mulheres obesas torna-se, ainda, mais preocupante com as variações de hormônios sexuais durante a menopausa. Nesta fase, o aumento de peso é naturalmente atrelado às variações de hormônios sexuais femininos e seus efeitos são impactantes sobre os vários órgãos, inclusive os pulmões. Este estudo teve como objetivo verificar se há diferença nos parâmetros mecânicos, histológicos e moleculares do sistema respiratório em camundongos fêmeas obesas e camundongos fêmeas não obesas, ovariectomizadas ou não. Nossos resultados sugerem a existência de uma relação entre expressão relativa de ERs, a deposição de colágeno tipo III, a dosagem sérica de estradiol e como eles influenciam no peso dos animais e com a mecânica ventilatória. Deste modo, podemos concluir que existe uma relação entre a obesidade e os hormônios sexuais femininos, especificamente o estradiol, com o sistema respiratório e que esses dois fatores exercem uma influência sobre a função pulmonar.

Palavras-chave: Estradiol, Respiração Artificial, Colágeno Tipo I, Resistência das Vias Respiratórias, Receptores Estrogênicos.

## ABSTRACT

Obesity is characterized by increased body fat reserves and is the cause of metabolic diseases in the world. In the last decade there was an increase of 7.5% in the frequency of obese adults in Brazil, in women, there was an increase of 8.2% over this period, and the relevance today is equivalent to approximately 20 every 100 women affected by the disease. The impact of obesity, by itself, the respiratory system is not very studied. The increasing number of obese women becomes even more worrying besides variations of sexual hormones during menopause. In this phase, the high weight is naturally correlated to variations of female sex hormones and their effects impacts various organs, including the lungs. The aim of this study was to verify if there is a difference in the mechanical parameters, histological and molecular respiratory system in obese female mice and non-obese female mice ovariectomized, or not. Our results suggest positive correlation between relative expression of ERs, the deposition of collagen type III, serum estradiol and how they influence the weight of the animals and with the ventilatory mechanics. In this way, we suggest that there is a positive correlation between obesity and female sex hormones, specifically the estradiol, with the respiratory system and that these two factors exert an influence on pulmonary function.

Keywords: estradiol, ventilatory mechanics, type I collagen, airway resistance, estrogen receptors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Alterações hormonais associadas ao envelhecimento reprodutivo	24
Figura 2 - Biossíntese dos hormônios esteroides derivados do colesterol	26
Figura 3- Estrutura dos hormônios	27
Figura 4- Representação esquemática da estrutura de receptores de estrógeno (ER)	29
Figura 5 - Quantidade de animais utilizados nos experimentos (matrizes e prole)	33
Figura 6 - Descrição compilada do uso dos animais	35
Figura 7- Delineamento experimental de cada grupo	36
Figura 8- Passo a passo da cirurgia de ovariectomia bilateral com incisões dorsolaterais em camundongos fêmeas Swiss.	37
Figura 9 - Localização da incisão para traqueostomia	38
Figura 10 - Ventilador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ®, Canadá)	39
Figura 11- Diagrama do ventilador para pequenos animais (FlexiVent-SCIREQ®), utilizado para a coleta de dados de mecânica respiratória	39
Figura 12 – Diagrama utilizado no roteiro da mecânica ventilatória	42
Figura 13 - Print dos dados gerados pelo software do aparelho de Mecânica Ventilatória de oscilações forçadas Flexivent	43
Figura 14 - Pulmão de camundongo para experimentação	45
Figura 15 - Valores de gordura abdominal e massa corpórea expressos como média $\pm$ SEM	48
Figura 16 - Valores de mecânica respiratória expressos como média $\pm$ SEM	52
Figura 17 - Valores de mecânica respiratória expressos como média $\pm$ SEM	53
Figura 18 – Valores da quantificação de colágeno expressos como média $\pm$ SEM	55
Figura 19 - Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m corados com picrossirius	56
Figura 20 – Valores da quantificação de fibras elásticas expressos como média $\pm$ SEM	57

Figura 21 - Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m corados com orceína	57
Figura 22 – Valores da quantificação de ER $\alpha$ e de ER $\beta$ expressos como média $\pm$ SEM	58
Figura 23- Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica controle negativo.	59
Figura 24- Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica de ER $\alpha$ .	59
Figura 25 - Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica de ER $\beta$ .	60
Figura 26– Relação entre a dosagem de Estradiol e a % encontrada na imunohistoquímica	61
Figura 27– Relação entre o colágeno tipo I encontrado no ensaio com picosirius e a % encontrada na imunohistoquímica	62
Figura 28– Relação entre o colágeno tipo III encontrado no ensaio com picosirius e a % encontrada na imunohistoquímica	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O <sub>2</sub>	Oxigênio
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
MEC	Matriz Extracelular
OMS	Organização Mundial da Saúde
ERs	Receptores de estrógeno
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógeno beta
NR3	Receptores nucleares de terceira classe
IMC	Índice de massa corporal
CVF	Capacidade vital forçada
CRF	Capacidade vital funcional
OVX	Ovariectomia
NR	Ninhada reduzida
NN	Ninhada normal
C	Controle
O	Obeso
sham	Falso operado
CC	Grupo Controle Controle
Csham	Grupo controle falso operado
COV <sub>x</sub>	Grupo controle operado
OC	Grupo obeso controle
Osham	Grupo obeso falso operado
OOV <sub>x</sub>	Grupo obeso operado
i.p	Intraperitoneal
s.c	Subcutâneo
kg	Kilograma
ml	Mililitros
PEEP	Pressão Positiva Expiratória Final
R <sub>tot</sub>	Resistência total
R <sub>aw</sub>	Resistência de vias aéreas
E	Elastância total
C	Complacência total
G <sub>tis</sub>	Resistência tecidual
H <sub>tis</sub>	Elastância do tecido pulmonar
eta ou $\eta$	Histeresividade
MCh	Metacolina
Salb	Salbutamol
Sal	Salina
COD	Coefficiente de Determinação
$\mu$ m	Micrometros
HSF	Hormônios Sexuais Femininos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1	PULMÃO	15
2.1.1	Parênquima pulmonar: Colágeno e Fibras elásticas	16
2.1.2	Responsividade das vias aéreas	18
2.2	OBESIDADE	19
2.2.1	Prevalência	20
2.2.2	Fisiopatologia	21
2.3	MENOPAUSA: REDUÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS	23
2.3.1	Modelo de Indução a Menopausa: Ovariectomia	25
2.4	HORMÔNIOS SEXUAIS: ESTROGÊNIO	25
2.5	RECEPTORES DE ESTRÓGENO: ER $\alpha$ e ER $\beta$	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	31
3.1	GERAL	31
3.2	ESPECÍFICOS	31
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
5.1	ANIMAIS	33
5.2	INDUÇÃO E COMPROVAÇÃO DA OBESIDADE	33
5.3	IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
5.4	ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS	35
5.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: OVARIECTOMIA/SHAM	36
5.6	MECÂNICA VENTILATÓRIA	38
5.7	COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, COLESTEROL, TRIGLICÉRIDES E HORMÔNIOS (ESTRADIOL E PROGESTERONA TOTAL)	44
5.8	REMOÇÃO DOS PULMÕES E HISTOLOGIA	45
5.9	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ER	46
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47

<b>6 RESULTADOS</b> .....	48
6.1 VALIDAÇÃO DA OBESIDADE .....	48
6.2 PERFIL BIOQUÍMICO .....	49
6.3 VALIDAÇÃO DA OVARIECTOMIA BILATERAL.....	49
6.4 MECÂNICA VENTILATÓRIA .....	49
6.5 ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENO I, III E TOTAL DAS VIAS AÉREAS E DOS VASOS SANGUÍNEOS DO PULMÃO .....	54
6.6 ANÁLISE DAS FIBRAS ELÁSTICAS DAS VIAS AÉREAS E DOS VASOS SANGUÍNEOS DO PULMÃO .....	56
6.7 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	57
6.8 RELAÇÕES ENTRE HORMÔNIOS E RECEPTORES .....	60
6.9 RELAÇÃO COLÁGENO TIPO I - RECEPTORES.....	62
6.10 RELAÇÃO COLÁGENO TIPO III - RECEPTORES .....	63
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A função básica do sistema respiratório é suprir o organismo com oxigênio ( $O_2$ ) e dele remover o produto gasoso do metabolismo celular, o gás carbônico ( $CO_2$ ) (ZIN, ROCCO e FAFFE, 2008). O principal sítio de trocas gasosas a nível pulmonar é o alvéolo. Os alvéolos são delimitados por estruturas que, vistas em corte, se assemelham a hexágonos. Essa estrutura é composta por uma camada contínua de células epiteliais ao redor de um fino interstício. A superfície alveolar é constituída principalmente por dois tipos de células: pneumócitos tipo I e II; macrófagos alveolares também estão presentes na superfície epitelial. O interstício contém os capilares envolvidos na troca gasosa, tecido conjuntivo e uma grande variedade de células responsáveis por manter a forma do alvéolo e as defesas a nível alveolar (FRASER, 2005). A estrutura do pulmão é composta principalmente por uma rede de tecidos conjuntivos, suas propriedades mecânicas são atribuídas ao colágeno, elastina, proteoglicanos e aos glicosaminoglicanos (GAGs) (SUKI e BATES, 2008).

A hiperresponsividade brônquica é uma resposta à um estímulo broncoconstrictivo no pulmão. Ela possui alguns mecanismos relacionados, tais como contratura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, espessura e integridade da camada epitelial, alterações mecânicas dos brônquios, modificações no conteúdo e no equilíbrio das proteínas da matriz extracelular (MEC) e ainda regulação autonômica exacerbada (BENTO; HERSHENSON, 1998). O processo inflamatório agudo ou crônico, com a liberação de uma vasta gama de mediadores inflamatórios e citosinas, é importante na hiperresponsividade, bem como a intensidade da fibrose subepitelial, a específica infiltração de mastócitos no músculo liso e a inflamação eosinofílica da parede das vias aéreas (BLEASE et al., 2000). Além disso a hiperresponsividade também pode ser afetada negativamente por substâncias biologicamente ativas liberadas pelo tecido adiposo, que em pacientes obesos está presente em excesso (TEIXEIRA, 2015).

A obesidade é a principal doença endócrino-metabólica crônica no mundo e consiste no aumento das reservas de gordura corporal (FORMIGUERA; CANTON, 2004). Definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como "acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde", afetando o funcionamento de quase todos os órgãos e tecidos do corpo (LEAN; LARA; HILL, 2006). A obesidade é tida como uma doença crônica e é um conhecido fator de risco para doenças como o diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, aterosclerose, apnea e algumas formas de câncer, tanto em seres humanos quanto em roedores, além disso o ganho de peso na fase adulta está associado ao aumento do risco de câncer

de mama em mulheres pós-menopáusicas e parece estimular o aumento da responsividade das vias respiratórias, sendo considerada um fator de risco para a asma e para diversas outras doenças (WEISS; HORE, 2004; LI; BOWERMAN; HEBER, 2005).

A menopausa é caracterizada pela depleção paulatina, porém efetiva dos níveis dos hormônios sexuais (estradiol e progesterona) na corrente sanguínea. Sendo assim, toda comunicação celular pré-existente que dependa destes hormônios se torna não efetiva (LIZCANO; GUZMÁN, 2014). A falência ovariana faz com que as mulheres menopáusicas apresentem uma maior chance na incidência de distúrbios fisiológicos decorrentes do envelhecimento humano. Tais como, hipercolesterolemia cardiopáticas, obesidade, diabetes do tipo 2, arteriosclerose, câncer de mama, osteoporose, alterações climatéricas (hot flashes), ansiedade, depressão, disfunção no trato reprodutor. (BEHR et al., 2012; GRAZIOTTIN; SERAFINI, 2009; GU et al., 2011; HUSSAN et al., 2012; PHILLIPS; PINKERNELL; JING, 1997; STICE et al., 2009).

Os receptores de estrogênio (ERs) pertencem à classe pertencem à terceira classe de receptores nucleares (NR3) muitos dos quais são fatores de transcrição ativados por ligantes que regulam a expressão de gene, ligando-se na região promotora dos genes (GERMAIN et al. 2006). Foram descritas duas formas diferentes de ER: ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Eles são codificados por dois genes distintos (ESR1 e ESR2, respectivamente) contendo 8 exons transcritos que dão origem a seis domínios proteicos conservados (KAMPA, 2013). No sistema respiratório sabe-se que existem receptores alfa e beta estrogênicos nas células epiteliais brônquicas. Estudos tem mostrado que os hormônios sexuais exercem um papel fundamental no pulmão (TOWNSEND, 2012; VERMA, 2011). Estes tem demonstrado grande relevância no desenvolvimento pulmonar, inflamação e câncer (SIEGFRIED, 2014).

A relação entre obesidade, hormônios sexuais e função pulmonar não é muito estudada, sendo assim esse projeto teve como finalidade estabelecer a relação ou não dentre os mencionados fatores, afim de melhorar o entendimento sobre o funcionamento do sistema respiratório.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PULMÃO

A principal função do sistema respiratório é levar o O<sub>2</sub> do ar atmosférico para todos os tecidos e órgãos no corpo e retirar o CO<sub>2</sub> produzido por todos os tecidos e órgãos e levar para o ar atmosférico. Eles possuem outra funcionalidade no organismo, tais como: manter o equilíbrio térmico, pois, com o aumento da ventilação pulmonar (hiperventilação) existe uma perda maior de calor e água. Além disso, eles auxiliam na manutenção do pH plasmático dentro da faixa fisiológica, através da regulação e da eliminação de ácido carbônico (sob a forma de CO<sub>2</sub>). O sistema respiratório também é utilizado para outros fins como a defesa contra agentes agressores (ZIN, ROCCO e FAFFE, 2008).

O sistema respiratório é dividido em algumas partes, a zona de transporte gasoso, que é formada pelas vias aéreas superiores e árvore traqueobrônquica, elas são encarregadas de acondicionar e conduzir o ar atmosférico até o interior dos pulmões; na zona respiratória é onde ocorre efetivamente as trocas gasosas e a zona de transição que se localiza entre as duas primeiras zonas, onde começam a ocorrer trocas gasosas, porém a níveis não-significativos (ZIN, ROCCO e FAFFE, 2008).

A principal área de trocas gasosas ocorre nos alvéolos. Os alvéolos são estruturas que se assemelham a hexágonos. Essa estrutura é composta por uma camada contínua de células epiteliais ao redor de um fino interstício. A superfície alveolar é constituída principalmente por dois tipos de células: pneumócitos tipo I e II. Macrófagos alveolares também estão presentes na superfície epitelial. O interstício contém os capilares envolvidos na troca gasosa, tecido conjuntivo e uma grande variedade de células responsáveis por manter a forma do alvéolo e as defesas a nível alveolar (FRASER, 2005).

As membranas basais endoteliais e epiteliais são separadas por um espaço intersticial de extensão variável que contém tecido conjuntivo, como as fibras elásticas e colágenas e uma variedade de células como os miofibroblastos e células intersticiais contráteis (FRASER, 2005). As zonas de transporte e de transição juntamente com artérias, veias, vasos linfáticos, nervos, septo interlobular e pleura, constituem a porção não parenquimal do pulmão (FRASER, 2005). Os alvéolos das vias aéreas de transição associados com os sacos alveolares mais distais constituem o parênquima pulmonar (FRASER, 2005).

A estrutura do pulmão é composta principalmente por uma rede de tecidos conjuntivos. A organização e as propriedades mecânicas não-lineares dos componentes desse tecido

levam a um comportamento mecânico complexo (SUKI e BATES, 2008). Todos os tecidos conjuntivos são compostos por células e MEC, que inclui água e macromoléculas biológicas. As macromoléculas mais importantes para determinar as propriedades mecânicas do tecido pulmonar são o colágeno, elastina, proteoglicanos e os glicosaminoglicanos (SUKI e BATES, 2008).

### 2.1.1 Parênquima pulmonar: Colágeno e Fibras elásticas

O colágeno é a mais abundante e mais frequentemente das macromoléculas, sendo apontado como o principal para a integridade estrutural, ou seja, as fibras de colágeno constituem o principal componente da matriz extracelular e são uma proteína fibrosa que consiste em três cadeias, que formam uma hélice tripla em forma de corda, fornecendo resistência à tração a matriz extracelular (SUKI e BATES, 2008; MONTES, 1996). Além disso, o colágeno representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados (OHARA, et al. 2007; VARMA, 2016).

Há mais de 20 diferentes tipos de moléculas de colágeno, apesar de sua ampla diversidade no tecido conjuntivo, apenas seis tipos de colágeno são conhecidos: os tipos I, II, III são fibrilares e IV, V, VI que não são fibrilar ou são chamados de amorfo. O interstício do parênquima pulmonar contém principalmente colágeno do tipo I e III, que estabelece a estrutura básica da parede alveolar (SUKI e BATES, 2008).

A fibra de colágeno tipo III é mais flexível e suscetível à quebra, o colágeno tipo I é composto por fibrila mais espessa e reticulada (ROCCO et al. 2001), enquanto a fibra colágena tipo IV está localizada principalmente na membrana basal. Sua rotatividade é um processo dinâmico, necessário à manutenção da arquitetura pulmonar normal (ROCCO et al. 2003). O acúmulo final de colágeno não depende apenas de sua síntese, mas também de sua degradação (ROCCO et al. 2001, 2003) e variações no conteúdo de colágeno do parênquima durante o desenvolvimento (TANAKA e LUDWIG, 1999; TANAKA; AL-JAMAL; LUDWIG, 2001), proporciona uma das principais funções do colágeno que é a de manter a estrutura física do corpo, devido à sua grande resistência mecânica conferida pela sua organização macromolecular, que resulta na formação de fibras, principalmente, no caso do colágeno tipo I (UITTO, et al. 2008; TULLBERG-REINERT e JUNDT, 1999).

O tipo I trata-se da estrutura proteica mais abundante no corpo humano (RITTIÉ, 2017), é sintetizado pelos fibroblastos como um precursor solúvel, o procolágeno tipo I, o qual é secretado pelos fibroblastos e sofre ação proteolítica para formar as fibras insolúveis

de colágeno (CHOI, et al. 2007). E é encontrado facilmente em membranas basais, ligamentos, tendões, pele e vasos sanguíneos, onde lhes confere suas propriedades mecânicas de suporte de cargas (CHOI, et al 2007; VARMA, 2016).

O colágeno tipo III é secretado por fibroblastos e outros tipos de células mesenquimais, e está intimamente associado a patologias como lesão pulmonar, doenças hepáticas virais e não virais, fibrose renal, hérnia e distúrbios vasculares. O colágeno tipo III, juntamente com o colágeno tipo I, são os principais constituintes da matriz intersticial (NIELSEN; KARSDAL, 2016).

Sendo assim, no sistema respiratório as fibras de colágeno têm uma grande importância pois desempenham um papel fundamental para as funções mecânicas (movimentos respiratórios) realizadas pelos pulmões, no entanto, não foi elucidado como a fibra de colágeno deve contribuir para manter a estrutura pulmonar contra a carga mecânica baseada nos movimentos respiratórios (TOMODA; HIROSHI; SHIGEYOSHI, 2013). Em estudos realizados com tecidos pulmonares humanos em desenvolvimento de 12 a 40 semanas de gestação os colágenos I e III foram expressos de forma semelhante em e ao redor de vários tipos de células no pulmão em desenvolvimento e além disso, as células do tipo miofibroblastos parecem produzir mRNA para ambos os tipos de colágeno nos alvéolos (KAARTEENAHOWIJK, et al. 2004). Em estudos com pacientes asmáticos a fim de analisar causas para remodelação das vias aéreas, há respaldo para aumento de expressão dos colágenos tipos I e III nos pacientes com asma moderada a grave, associados à fibrose subepitelial (CHAKIR, 2003).

As fibras elásticas representam outro constituinte da MEC e compreendem três componentes definidos de acordo com a quantidade de elastina e orientação das fibrilas: 1) fibra oxitaniana composta por um feixe de microfibrilas, 2) fibras elaunina compostas por microfibrilas e uma pequena quantidade de elastina, e 3) fibras elásticas totalmente desenvolvidas, constituídas por microfibrilas e elastina abundante (MONTES, 1996). Muitos tipos de células, incluindo condroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas, sintetizam essas fibras. Devido às suas propriedades mecânicas, as fibras elásticas fornecem tensão de recuo para restaurar o parênquima à sua configuração anterior após cessar o estímulo à inspiração. Nos septos alveolares normais, uma camada subepitelial de fibras elásticas composta principalmente por fibras elásticas totalmente desenvolvidas, confere uma grande elasticidade ao tecido alveolar em situações normais (MERCER e CRAPO 1990). A elastose, conforme determinada pela inflamação septal e pela fragmentação das fibras, leva a uma perturbação da arquitetura da parede alveolar (NEGRI et al. 2000; ROCCO et al. 2003). Em resposta ao

aumento da destruição tecidual, é observada a reativação da síntese de elastina, resultando em alterações significativas nas propriedades mecânicas do pulmão (ROCCO et al. 2001).

Deste modo, as fibras elásticas são compostas pela elastina e microfibrilas, que são na maioria fibrilina e fibulina. As fibras de elastina exibem significativa heterogeneidade estrutural e são conectadas mecanicamente ao colágeno (BROWN et al., 1994), por microfibrilas e/ou proteoglicanos (KIELTY et al., 2002).

### 2.1.2 Responsividade das vias aéreas

Responsividade de via aérea se refere à facilidade com que as vias aéreas se contraírem após serem expostas a estímulos provocativos. Hiperresponsividade das vias aéreas denomina-se pela capacidade exacerbada de indivíduos desenvolverem esta resposta decorrente do uso de broncoconstritores. Esta resposta exagerada pode ser em razão da hiperreatividade e/ou da hipersensibilidade do organismo (RUBIN et al., 2002; QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005). Sendo assim, a hiperresponsividade pode ser definida como um aumento na facilidade e grau de estreitamento das vias aéreas em resposta a estímulos broncoconstritores, como exercício, exposição ao ar frio ou outros irritantes ambientais, como pólen e poeira, ou ainda após estimulação mecânica das vias aéreas, como ocorrem com risadas ou com manobras expiratórias forçadas. Segundo Lapa et al (2005) a hiperreatividade brônquica parece ter uma distribuição normal na população. Cerca de 20% da população apresenta hiperresponsividade leve mesmo sem apresentar doenças respiratórias (LAPA et al., 2005).

A hiperresponsividade brônquica pode possuir alguns mecanismos relacionados, tais como contratatura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, espessura e integridade da camada epitelial, alterações mecânicas dos brônquios, modificações no conteúdo e no equilíbrio das proteínas da MEC e ainda regulação autonômica exacerbada (BENTO & HERSHENSON, 1998). Todavia, a parcela de participação de cada um desses fatores ainda não está totalmente esclarecida. A asma é um processo inflamatório agudo ou crônico, com a liberação de uma vasta gama de mediadores inflamatórios e citocinas, é importante na hiperresponsividade, bem como a intensidade da fibrose subepitelial, a específica infiltração de mastócitos no músculo liso e a inflamação eosinofílica da parede das vias aéreas (BLEASE et al., 2000). Além disso a hiperresponsividade também pode ser afetada negativamente por substâncias biologicamente ativas liberadas pelo tecido adiposo, que em pacientes obesos está presente em excesso (TEIXEIRA, 2015).

A responsividade das vias aéreas pode ser medida a partir de resultados obtidos em testes de broncoprovocação, que consiste na aplicação de um broncoconstritor, como a metacolina (inalada), até que um nível preestabelecido de broncoconstricção seja atingido, o que é tipicamente medido por uma queda de 20% no volume expirado forçado no primeiro segundo. Esse teste baseia-se no pressuposto de que a musculatura lisa quando exposta a estímulos irritantes, reage realizando a broncoconstricção. Pacientes hiperresponsivos apresentam broncoconstricção significativa com doses e concentrações menores de um estímulo se comparados a um indivíduo com responsividade normal (RUBIN et al, 2002).

Vários autores também demonstram que a mediação de hormônios sexuais femininos na exacerbação de sintomas da asma (BEYNON et al. 1988; GIBBS et al. 1984; MATSUO et al. 1999), nos processos inflamatórios, recuperação de injúrias teciduais, e doenças vasculares no pulmão (LAHM et al, 2008; SPEYER et al, 2005).

## 2.2 OBESIDADE

A obesidade é a principal doença endócrino-metabólica crônica no mundo e consiste no aumento das reservas de gordura corporal (FORMIGUERA; CANTON, 2004), resultado da ingestão de quantidades de alimento além do utilizado como fonte de energia em que todo excesso de gorduras, carboidratos e até proteínas ingeridas são transformadas em gorduras e armazenadas no tecido adiposo (GUYTON, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) ou World Health Organization (WHO, 1998) a obesidade pode ser definida como "acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde", afetando o funcionamento de quase todos os órgãos e tecidos do corpo (LEAN; LARA; HILL, 2006; WHO, 1998). Sabe-se que o desenvolvimento da obesidade se inicia principalmente com uma dieta hiperenergética, em que o gasto energético é menor do que o ganho, estando associada à um estilo de vida sedentário. Alguns fatores podem agravar a obesidade tais como a pré-disposição genética e biológica de cada indivíduo e o consumo excessivo de carboidratos e gorduras (CALLE; KAAKS, 2004; HILL, 2006).

Classificada pelo índice de massa corporal (IMC,  $\text{kg/m}^2$ ) que é correlacionado com a gordura do corpo e é, portanto, uma medida útil na avaliação clínica e estudos epidemiológicos (MCCLEAN et al., 2008).

TABELA 1 - Cálculo e Classificação do Índice de Massa Corporal (IMC)

IMC	CLASSIFICAÇÃO
< de 18,5	Abaixo do peso
18,6 à 24,9	Peso normal
25,0 à 29,9	Acima do Peso
30,0 à 34,9	Obesidade grau I
35,0 à 39,9	Obesidade grau II (severa)
> 40	Obesidade grau III (mórbida)

FONTE: Da autora

Entretanto, o IMC não é o melhor método para se classificar uma pessoa como obesa, visto que este considera que alguns indivíduos possuem um IMC elevado devido a uma grande massa muscular, nesse caso, como alternativa, podemos calcular realmente a porcentagem de gordura total. A porcentagem de gordura total pode ser estimada de diversas formas tais como a medida da espessura da prega cutânea e impedância bioelétrica, ou pesagem subaquática, porém são práticas pouco utilizadas na clínica (GUYTON, 2006).

A obesidade é tida como uma doença crônica e é um conhecido fator de risco para doenças como o diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, aterosclerose, apnea e algumas formas de câncer, tanto em seres humanos quanto em roedores, além disso o ganho de peso na fase adulta está associado ao aumento do risco de câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas e parece estimular o aumento da responsividade das vias respiratórias, sendo considerada um fator de risco para a asma e para diversas outras doenças (WEISS; SHORE, 2004; LI; BOWERMAN; HEBER, 2005).

Já se sabe que a obesidade compromete padrões fisiológicos da respiração alterando volumes, frequência, estado inflamatório/imunológico, tônus da musculatura lisa, e exacerba crises de baixo fluxo aéreo ou aumento da resistividade das vias aéreas.

### 2.2.1 Prevalência

A prevalência mundial da obesidade tem aumentado ao longo das últimas décadas, atingindo proporções epidêmicas e associando-se cada vez mais com aumento da mortalidade (OGDEN et al., 2007). Dados da OMS apontam que entre 1980 e 2013, a proporção de adultos obesos no mundo subiu de 28,8% para 36,9% entre os homens e de 29,8% para 38% entre as mulheres. Esses aumentos têm variado de 5% na China, Japão e alguns países africanos a

75% em algumas das ilhas da Polinésia. Na Europa, a prevalência triplicou nas últimas duas décadas (MCCLEAN et al., 2008).

Os dados mais preocupantes sobre a obesidade é que a taxas de obesidade infantil vem aumentando significativamente pois padrões de dieta e exercício desenvolvidos na infância são difíceis de mudar, o que torna a obesidade infantil um forte fator de risco para a obesidade adulta, estando associada a maior chance de morte prematura e de incapacidade na vida adulta (MCCLEAN et al., 2008).

No Brasil esse aumento também é alarmante, segundo dados do Ministério da Saúde em 2016 a frequência de adultos obesos foi de 18,9%, ligeiramente maior em mulheres (19,6%) do que em homens (18,1%), atingindo quase um em cada cinco brasileiros; que contrasta com os dados do mesmo em 2006, em que a frequência de obesos foi de 11,4%, onde não se via uma tendência clara para nenhum dos sexos. Resultando num aumento de 7,5% de obesos em uma década, com um aumento claro de 8,2% entre as mulheres. Esse aumento de pessoas obesas no Brasil se deve ao fato de profunda mudança na composição corporal da população, caracterizada pelo aumento da gordura e diminuição da massa livre de gordura (composta pelo tecido muscular, tecido ósseo e água) (EVANS, 1992). Além disso, o aumento do comportamento sedentário e mudanças de hábitos alimentares e estilo de vida, associado ao aumento da renda, tem levado a mudança nos perfis de peso da população brasileira, resultando em aumento da obesidade em mulheres de nível socioeconômico mais baixo e decréscimo nas mulheres de nível socioeconômico mais alto nas regiões mais desenvolvidas.

### 2.2.2 Fisiopatologia

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. É dividido em tecido adiposo marrom (especializado na produção de calor – termogênese - onde participa ativamente do controle da temperatura corporal) e tecido adiposo branco (conhecido por sua capacidade de armazenar energia na forma de triacilglicerol e como órgão endócrino) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Existem dois principais tipos de tecido adiposo branco: subcutâneo e visceral. O subcutâneo está localizado entre a pele e o músculo, e o visceral está localizado dentro das cavidades do corpo, primariamente na cavidade abdominal. Os adipócitos viscerais são mais metabolicamente ativos que os subcutâneos, possuem alta atividade lipolítica provocando liberação de grande quantidade de ácidos graxos livres, e são os principais responsáveis pelos

problemas associados à obesidade. Assim, com evidências aumentadas dos riscos à saúde concomitante ao acúmulo de gordura abdominal (visceral), duas medidas da adiposidade central: a razão cintura-quadril e, mais recentemente, a medida da circunferência da cintura; têm sido comumente usadas em estudos epidemiológicos (CALLE; KAAKS, 2004). O valor do IMC também é muito utilizado, por ser um critério aceito mundialmente para classificar sobrepeso ou obesidade.

No sistema respiratório, a obesidade está associada a uma grande variedade de condições, incluindo síndrome de hipoventilação da obesidade, embolia pulmonar, pneumonia de aspiração, apneia obstrutiva do sono (KOENIG, 2001). Evidências sugerem também associação entre obesidade e asma, assim como há uma potencial ligação entre obesidade e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), embora pouco se saiba a respeito dos mecanismos desta associação (FRANSSEN et al., 2008).

Estudos longitudinais têm demonstrado que o aumento do peso corporal pode conduzir à redução da função pulmonar, estando a distribuição de gordura corporal associada aos efeitos metabólicos da obesidade. Os efeitos mecânicos da obesidade do tronco explicam, em parte, as reduções na complacência da parede torácica, na força muscular respiratória, no tamanho das vias aéreas periféricas, função e volumes pulmonares encontradas em indivíduos obesos e que podem conduzir a maior resistência das vias aéreas durante a respiração corrente (MCCLEAN et al., 2008; FARAH et al., 2011). A gordura abdominal pode alterar as características de pressão e volume do tórax e limitar a descida do diafragma, limitando assim a expansão do pulmão. Esta redução da ventilação nas bases pulmonares pode provocar o colapso de unidades pulmonares periféricas, anormalidades no volume de sangue nos pulmões e na relação de ventilação/perfusão e hipoxemia arterial, especialmente na posição supina (MCCLEAN et al., 2008). Vários podem ser os motivos para resultar em tais alterações em indivíduos obesos, incluindo compressão por gordura e infiltração do tórax ou o aumento do volume de sangue do pulmão (SIN; JONES; MAN, 2002).

A obesidade pode promover ineficiência muscular respiratória e criar aumento da demanda para ventilação (PARAMESWARAN; TODD; SOTH, 2006). Juntamente com todas estas modificações na fisiologia pulmonar, pacientes obesos também desenvolvem respiração superficial, com redução nos volumes pulmonares, especialmente o volume de reserva expiratório, aumento do trabalho respiratório e menor capacidade vital forçada (CVF) e residual funcional (CRF) (DELGADO; BARRANCO; QUIRCE, 2008; MCCLEAN et al., 2008; FARAH et al., 2011). Esta redução nos volumes pulmonares está associada à diminuição no diâmetro das vias aéreas periféricas, que pode conduzir a alterações na função do músculo

liso brônquico. Isto, por sua vez, conduz a alteração do ciclo de ponte cruzada actina-miosina, que pode potencialmente aumentar tanto a obstrução, quanto a hiperreatividade brônquica (HRB) (DELGADO; BARRANCO; QUIRCE, 2008).

### 2.3 MENOPAUSA: REDUÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS

A menopausa é caracterizada pela depleção paulatina (figura 1), porém efetiva dos níveis dos hormônios sexuais (estradiol e progesterona) na corrente sanguínea. Sendo assim, toda comunicação celular pré-existente que dependa destes hormônios se torna não efetiva (LIZCANO; GUZMÁN, 2014).

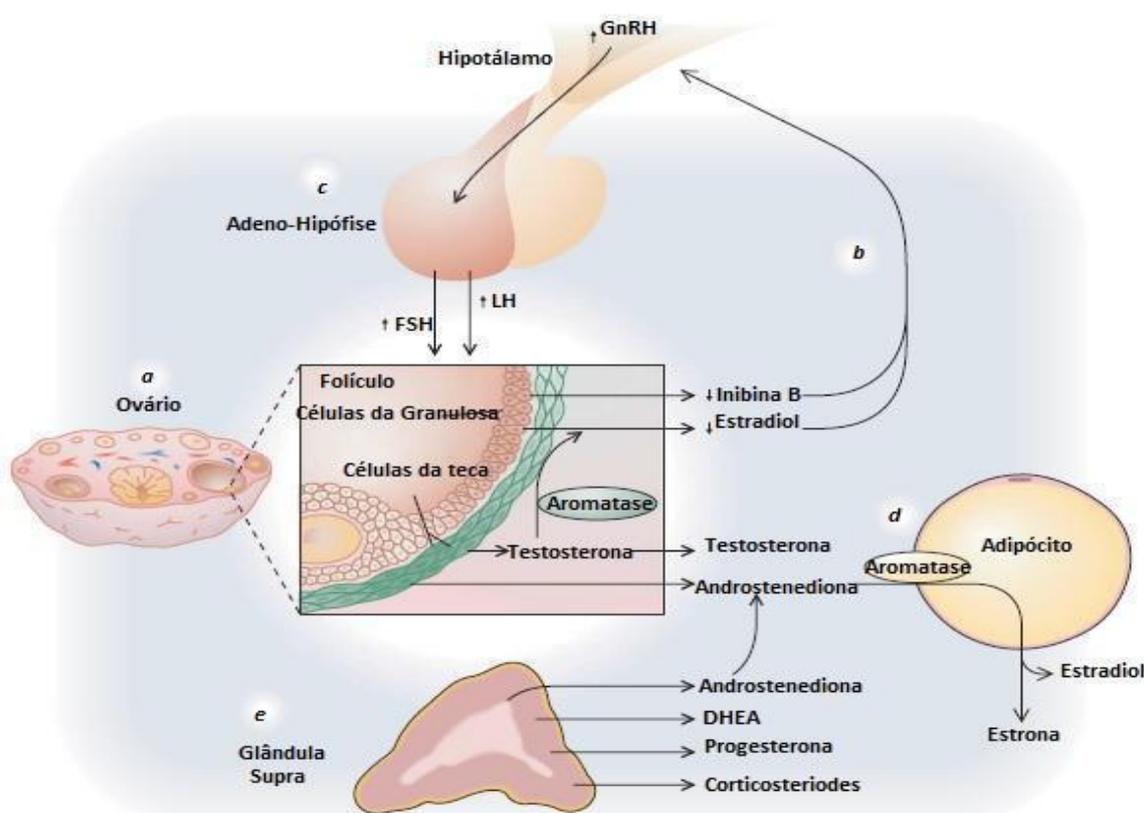
Segundo a OMS (1981), foi definido que a menopausa é dividida em duas categorias para a menopausa: Menopausa Natural que consiste na ausência da menstruação por 12 meses consecutivos sem causa óbvia (como gravidez e lactação) após a amenorreia e a Menopausa Cirúrgica que consiste na ausência de menstruação devida a remoção do útero e de um ovário, ou a remoção de ambos os ovários sem a remoção do útero.

A falência ovariana na menopausa causa o hipoestrogenismo (queda de estrogênio). Esse hipoestrogenismo influencia o processo fisiológico natural decorrentes do envelhecimento humano e faz com que as mulheres menopáusicas apresentem um aumento na incidência de distúrbios fisiológicos decorrentes do envelhecimento humano. Tais como, hipercolesterolemia cardiopatias, obesidade, diabetes do tipo 2, arteriosclerose, câncer de mama, osteoporose, alterações climatéricas (hot flashes), ansiedade, depressão, disfunção no trato reprodutor. (BEHR et al., 2012; GRAZIOTTIN; SERAFINI, 2009; GU et al., 2011, HUSSAN et al., 2012; PHILLIPS; PINKERNELL; JING, 1997; STICE et al., 2009). Além disso, os principais sintomas da menopausa são: alterações no sistema reprodutor; sintomas vasomotores (ataques de calor e suores noturnos); alterações de humor, sono, cognição e libido, apneia obstrutiva do sono. Os sintomas respiratórios aumentam, e os volumes pulmonares declinam com a transição para a menopausa, especialmente nas mulheres magras. As mulheres também podem notar um aumento de sibilos após a menopausa cirúrgica. A pele torna-se mais fina, perde a elasticidade e fica mais ressecada em um processo gradual, durante e após a menopausa (MCKINLAY; BRAMBILLA; POSNER, 2008; DENNERSTEIN, et al. 2000; WOODS, et al. 2007; WOODS, et al. 2008; FREEMAN, et al. 2007; SZOEKE, et al. 2008; JARVIS; LEYNAERT, 2008; REAL, et al. 2008; BOLOGNIA, 1995).

Sabe-se ainda que os hormônios sexuais desempenham uma função protetora que acaba sendo diminuída com a menopausa. Os estrogênios sinergia com os genes do tecido

adiposo, para aumentar o tecido adiposo subcutâneo gluteofemoral e diminuir o tecido adiposo central em mulheres em idade reprodutiva, o que leva a efeitos cardiometabólicos protetores. A perda de estrogênios após a menopausa, independente do envelhecimento, aumenta a massa total de tecido adiposo e diminui a massa corporal magra, de modo que há pouco efeito líquido sobre o peso corporal. A menopausa também reverte parcialmente a distribuição tecido adiposo de proteção das mulheres. (LEENERS, et al. 2017).

FIGURA 1- Alterações hormonais associadas ao envelhecimento reprodutivo



LEGENDA: (a) Junto ao ovário, a secreção de inibina B pelas células da granulosa diminui quando a mulher chega ao meio da fase dos 30 anos. Então, a depleção folicular resulta em taxas crescentes de anovulação e diminuição das ondas ovulatórias de estradiol e estrona por volta do início da fase dos 40 anos. A secreção ovariana de testosterona continua. Uma parte da testosterona produzida pelos ovários é convertida em estradiol pelas enzimas aromatases, e o restante é secretado como testosterona ou sob a forma de um precursor de androgênio, a androstenediona. (b) na transição para menopausa, os níveis circulantes diminuídos de inibina e, subsequentemente, as concentrações decrescentes de estradiol resultam na estimulação do hipotálamo para intensificação da secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). (c) os elevados níveis circulantes de GnRH estimulam a adenohipófise a aumentar a secreção de hormônio folículo-estimulante (FSH), e a isto se segue o aumento da secreção de hormônio luteinizante (LH). Eventualmente, as tentativas do cérebro de impulsionar o ovário a produzir estrogênio falham, mas a produção de androstenediona e testosterona pelas células tecais ovarianas continua no início da menopausa. (d) com os reduzidos níveis séricos de estrogênio, os adipócitos são estimulados a converter androstenediona em estrona via enzima aromatase. (e) A síntese hormonal pela glândula suprarrenal permanece bastante constante e sofre alterações associadas ao envelhecimento, mas que não estão relacionadas à menopausa em si.

FONTE: REED; SUTTON, 2011 (adaptado)

### 2.3.1 Modelo de Indução a Menopausa: Ovariectomia

Atualmente existem três modelos animais que mimetizam a situação vivida pela mulher na menopausa. Estes modelos reproduzem em grande parte os aspectos e os sintomas advindo dessa nova fase. O primeiro modelo é a senescência reprodutiva natural, no qual se espera o animal atingir a sua senescência reprodutiva natural, que no caso de roedores pode ser por volta dos oito meses de vida (FINCH et al., 1984). O segundo modelo é por indução química, no qual é injetado uma substância química que acelera o processo de falha ovariana (HOYER et al., 2001). E o terceiro modelo é através de uma intervenção cirúrgica no qual realiza a remoção dos ovários (BRINTON, 2005). Os dois últimos modelos não representam a falha progressiva da função ovariana que ocorre na menopausa natural (DEECHER et al., 2008 e MIQUEL et al., 2006).

Dos três modelos existentes para representar a menopausa, a ovariectomia bilateral é amplamente utilizada em pesquisas que abordam o tema justamente por conferir muitos dos sintomas que as mulheres costumam apresentar durante a fase pós-menopausa. Nos últimos anos há um aumento no número de publicações específicas que abordam as consequências deste modelo sobre a fisiologia do sistema nervoso central, a função vascular e epitelial, ganho de peso, estresse oxidativo (BEHR et al., 2012; CASTILLO et al., 2005; CASTILLO et al., 2006; PEREZ-MARTIN et al., 2005; TRESGUERRES et al., 2008).

A ovariectomia (OVX) é uma técnica cirúrgica na qual é feita a retirada dos ovários. Existe duas metodologias para essa cirurgia, a primeira é feita por uma pequena incisão transversal peritoneal, localização das trompas e a retirada dos ovários. A segunda é uma metodologia descrita por Lasota et al (2004) em ratas *Wistar*, no qual foi feita com duas incisões dorsolaterais, localização dos ovários e a retirada dos mesmos. Nosso trabalho foi em camundongos fêmeas *Swiss*, optamos por executar a ovariectomia bilateral com duas incisões do dorsolaterais, uma vez que essa técnica se demonstrou mais fácil, menos demorada e menos prejudicial para as ratas *Wistar*, bem como para camundongos fêmeas *Swiss* (LASOTA et al, 2004).

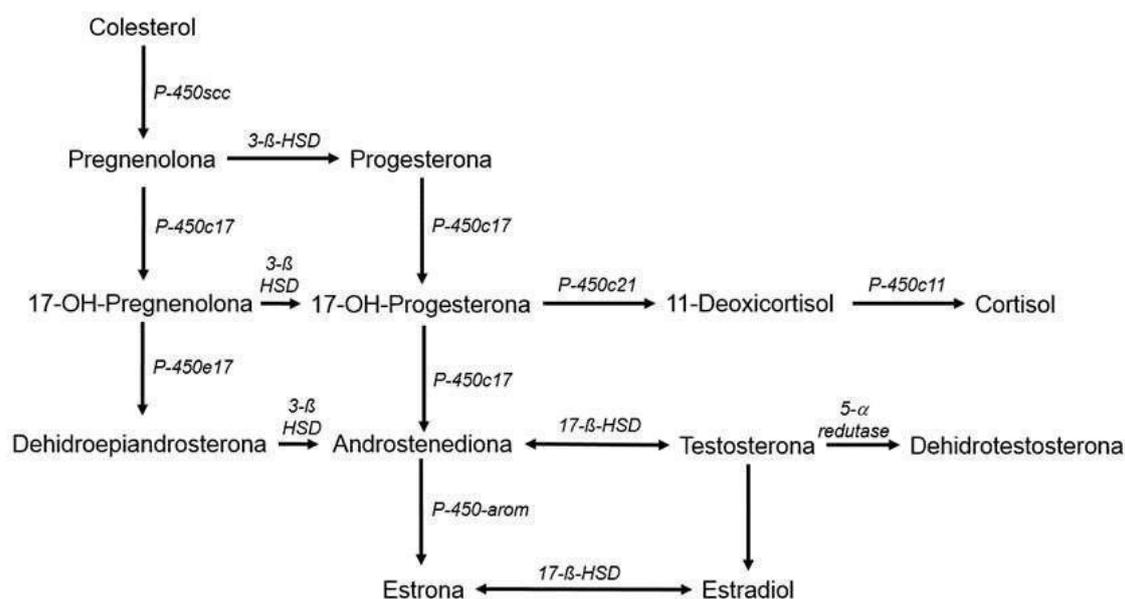
## 2.4 HORMÔNIOS SEXUAIS: ESTROGÊNIO

Os hormônios sexuais desempenham um papel essencial na vida da mulher, porém a literatura é contraditória. Os níveis hormonais variam durante a vida com a menarca, a fase

menstrual, a irregularidade menstrual, a gravidez, a lactação ou com a proximidade da menopausa (REAL et al. 2007). Estes hormônios são produzidos em gônadas, glândulas suprarrenais e a unidade feto-placentária e são divididos em duas categorias: hormônios sexuais femininos e hormônios sexuais masculinos. Os principais hormônios sexuais ovarianos femininos são estrogênios e progestinas. Sem dúvida o mais importante dos estrogênios é o hormônio estrógeno ou estradiol, e o mais importante das progestinas é a progesterona (GUYTON, 2006; CARREY, 2007).

Os hormônios esteroides são sintetizados (figura 2) a partir de um precursor comum que é o colesterol, onde ele é primeiro convertido em pregnenolona pela cadeia de lado P450-lig clivagem enzimática (P450<sub>ssc</sub>). Pregnenolona é então convertida em progesterona, que é usada para sintetizar os andrógenos e estrógenos (PAYNE, 2004). A síntese dos androgênios se dá pela conversão da estrona em androstenediona pela enzima aromatase. Essa enzima também catalisa a conversão de testosterona em estradiol (PAYNE, 2004).

FIGURA 2 - Biossíntese dos hormônios esteroides derivados do colesterol.



LEGENDA: A testosterona pode agir diretamente nos receptores andrógenos ou indiretamente seguindo a conversão a estradiol ou di-hidrotestosterona

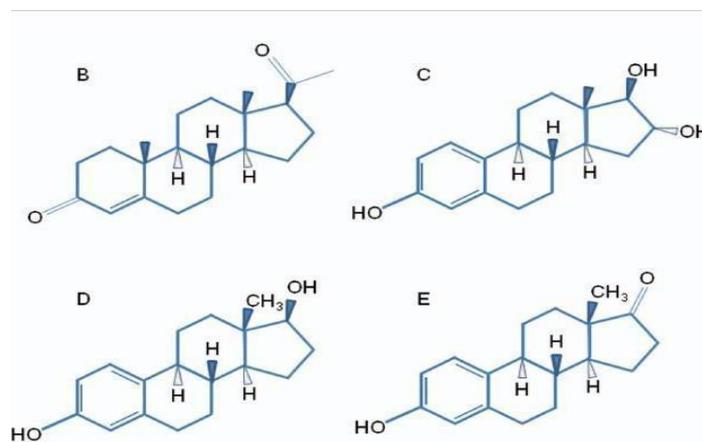
FONTE: Adaptado a partir de LEHNINGER (2013) E BORST; YARROW (2015).

Existem quatro tipos de estrogênios (figura 3), B-estradiol, estrona, estriol e o estreol. Estes estão presentes em quantidades significativas no organismo da mulher, sendo o principal deles é o B-estradiol. Este, por sua vez, é 12 vezes mais potente que a estrona e 80 vezes mais potente que o estriol (GUYTON, 2006; FUENTES, 2019).

A concentração desses hormônios pode variar, levando em consideração a fase na qual a mulher se encontra, como por exemplo, o estriol e o estreol são predominantes em mulheres grávidas, enquanto que o estradiol é a forma predominante nas mulheres não-grávidas e na pré-menopausa, já a estrona é o estrogênio predominante em mulheres na menopausa (COUSE, 1997; FUENTES, 2019).

O estradiol é um hormônio fundamental para a diferenciação sexual, reprodução e manutenção da função sexual. Nas mulheres ele é produzido principalmente pelos ovários, mas também conta com uma parcela produzida pelas suprarrenais e pelo tecido adiposo. Nos homens, cerca de 20% é produzido nos testículos, o restante é obtido a partir da conversão da testosterona (VERMEULEN, 2002; FUENTES, 2019). Em ambos exerce grandes funções sob os sistemas cardiovascular, respiratório, muscular, esquelético, imunológico e sistema nervoso central. A ação principal do estradiol ocorre a partir da ligação com receptores (TONWSEND, 2011). Atuando em três níveis distintos: 1) na membrana em receptores semelhantes aos clássicos e aos não clássicos e em canais iônicos dependentes de ligantes e dependentes da voltagem; 2) nível citoplasmático - ativam cinases e induzem a NO sintase endotelial, aumentando a síntese de NO; e 3) nível nuclear: atuam sobre receptores clássicos, ER $\alpha$ , e não clássicos, ER $\beta$  (estes de menor afinidade para o estradiol).

FIGURA 3- Estrutura dos hormônios



LEGENDA: B: Progesterona; C: Estriol; D: Estradiol; E: Estrona.

FONTE: TAM et al., 2011 (adaptado).

Os hormônios esteroides exercem um papel fundamental no pulmão (TOWNSEND, 2012; VERMA, 2011). No entanto, apenas os glicocorticoides e seus receptores têm sido amplamente estudados, enquanto o impacto dos esteroides sexuais é parcialmente explorado

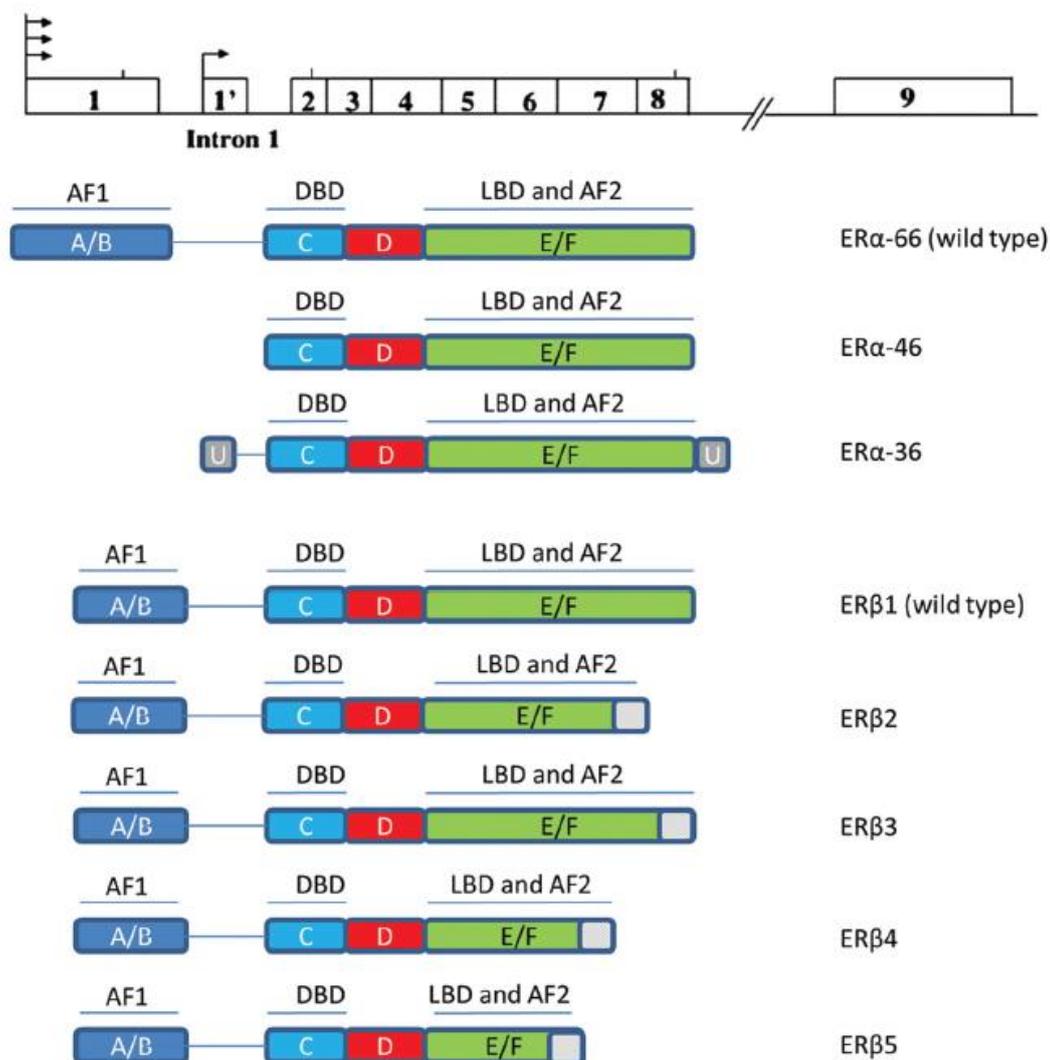
e controverso. Siegfried (2014) têm mostrado a relevância dos hormônios sexuais, principalmente os estrogênios no desenvolvimento pulmonar, inflamação e câncer (SIEGFRIED, 2014). Outros estudos indicam que os hormônios sexuais agem diretamente nas vias aéreas e nas células imunológicas para modular as vias respiratórias. Os esteroides sexuais (produzidos ou circulando localmente) têm uma profunda influência no desenvolvimento pulmonar e na etiologia das doenças respiratórias.

## 2.5 RECEPTORES DE ESTRÓGENO: ER $\alpha$ e ER $\beta$

Os ERs pertencem à terceira classe de receptores nucleares (NR3) muitos dos quais são fatores de transcrição ativados por ligantes que regulam a expressão de gene, ligando-se na região promotora dos genes (GERMAIN et al. 2006). Essa classe inclui, além para ERs, progesterona, andrógeno, glicocorticoide e receptores mineralocorticoides que medeiam o sistema endócrino ações de esteroides, bem como dos receptores órfãos ERR $\alpha$ - $\gamma$ . Classicamente, os receptores NR3 atuam como nucleares e fatores de transcrição. No entanto, nos últimos anos, a descoberta de isoformas receptoras, juntamente com a identificação do modo alternativo iniciado por esteroides caminhos de ação e sinalização, ampliou a visão sobre a ação do estrogênio (GERMAIN et al. 2006).

Os efeitos dos estrogênios podem ser medidos pela via não genômica e pela via transcricional dos seus receptores. Os ERs contêm um domínio de ligação do DNA do N-terminal e um domínio de ligação de ligante do C-terminal (LBD) para estrógeno (KAMPA, 2013; KOEHLER, 2005). Foram descritas duas formas diferentes de ER: ER $\alpha$  e ER $\beta$  (figura 4). Eles são codificados por dois genes distintos (ESR1 e ESR2, respectivamente) contendo 8 exons transcritos que dão origem a seis domínios proteicos conservados (KAMPA, 2013). Algumas variantes de ER $\beta$  possuem diferenças específicas no exon 8 (FUQUA, 1999; SAIJI, 2002), essas diferenças provoca uma modulação diferenciada na sinalização do estrogênio (RAMSEY, 2004; LEUNG, 2006).

FIGURA 4- Representação esquemática da estrutura de receptores de estrógeno (ER).



LEGENDA: AF-1 – Região de transativação ou domínio de ativação de função independente de ligação; DBD – domínio central de ligação ao DNA (DNA binding domain). AF-2 – Domínio de ativação de função dependente de ligação; LDB – domínio de ligação ao ligante hormonal.

FONTE: WANG, et al. 2005; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011. (Adaptado)

Os receptores de estrógeno são receptores nucleares expressos no pulmão, sendo que a isoforma é ER $\alpha$  mais abundante quando comparado a ER $\beta$ , amplamente desconhecida (LUBAHN, 1993 e KREGGE, 1998). Esses receptores ligam seus respectivos hormônios, resultando na translocação do receptor do citoplasma para o núcleo, onde pode ocorrer homodimerização e, em alguns casos, heterodimerização. Classicamente, ER $\alpha$  é um ativador transcrricional melhor que ER $\beta$ , com a sugestão de que ER $\beta$  antagoniza ER $\alpha$  (ZHANG e TENG, 2000; HALL e MCDONNELL, 1999).

O receptor alfa estrogênico foi o primeiro a ser descoberto em 1958. A pesquisa foi realizada em tecidos reprodutivos femininos, a partir disso foi possível saber que esse receptor quando ligado ao estradiol era capaz de migrar para o núcleo da célula e estimular a transcrição de genes. Dez anos depois, um grupo de pesquisas descobriu uma proteína com alto grau de homologia com o receptor alfa e a partir dessa semelhança, essa proteína foi denominada receptor beta estrogênico (JENSEN, et al. 1968; KUIPER, et al. 1996).

No sistema respiratório sabe-se que existem receptores alfa e beta estrogênicos nas células epiteliais brônquicas. Em relação a efeitos deste hormônio sexual sobre esse sistema, existem evidências que comprovam a ação do estradiol induzindo o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas (TOWNSEND, 2010) e a broncodilatação a partir da indução de óxido nítrico (TOWNSEND, 2011). Em patologias como a Asma, o papel potencial do estradiol ocorre pela associação deste hormônio com alterações na mecânica ventilatória e na inflamação das vias aéreas, porém, essa relação é bastante complexa e dependente de diferentes concentrações de hormônio, receptores e interação com outros hormônios como a progesterona (BONS, 2013).

Outros estudos têm mostrado que em ratos ER $\alpha$  e ER $\beta$  knockout revelou que ambos os tipos de ER são necessários para a formação de unidades alveolares completas nas fêmeas. ER $\alpha$  garante que os pulmões se diferenciem corretamente durante o desenvolvimento, levando a um número normal de alvéolos por área de superfície. ER $\beta$ , por outro lado, modula o desenvolvimento da matriz extracelular, levando a pressão de recolhimento normal tecido elástico nos pulmões. Além disso, ER $\alpha$ , mas não ER $\beta$ , demonstrou-se para mediar uma resposta anti-inflamatória (MASSARO, 2004; MASSARO, 2006; VEGETO, 2010).

Eles também desempenham uma função protetora que acaba sendo diminuída com a menopausa. Os estrogênios sinergizam com os genes tecido adiposo para aumentar o tecido adiposo subcutâneo gluteofemoral e diminuir o tecido adiposo central em mulheres em idade reprodutiva, o que leva a efeitos cardiometabólicos protetores. A perda de estrogênios após a menopausa, independente do envelhecimento, aumenta a massa total de tecido adiposo e diminui a massa corporal magra, de modo que há pouco efeito líquido sobre o peso corporal. A menopausa também reverte parcialmente a distribuição tecido adiposo de proteção das mulheres (LEENERS, 2017).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 GERAL**

O objetivo geral deste estudo foi verificar o impacto da obesidade e o a ausência dos hormônios sexuais, sobre o sistema respiratório.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar o modelo do estudo (obesidade induzida pela supernutrição pós-natal e menopausa induzida pela redução dos níveis hormonal por meio da ovariectomia);
- 2) Estudar a função pulmonar mediante a broncoconstrição/dilatação no modelo experimental de obesidade após ovariectomia;
- 3) Investigar a morfologia do parênquima e vias aéreas (quantificação de fibras colágenas e elásticas) de fêmeas de camundongos obesos e controle, ovariectomizadas ou não;
- 4) Investigar a expressão dos receptores alfa e beta estradiol no tecido pulmonar de fêmeas de camundongos obesos e controle, ovariectomizadas ou não;

#### 4 JUSTIFICATIVA

A obesidade e sua interação com o sistema respiratório têm sido estudadas nas últimas cinco décadas, contudo, o foco é dado em doenças potencializadas pela obesidade. O impacto da obesidade por si só no tecido pulmão é subestimado. Ainda, os estudos apresentam variados métodos de induzir a obesidade que é pouco condizente com a forma natural da vida animal. Desta forma, neste estudo foi escolhida a obesidade induzida pela supernutrição pós-natal, por ser a que mais representativa dentre as maneiras de induzir a obesidade. Além do foco na obesidade, o presente estudo teve a finalidade de estudar a interação da obesidade e os hormônios sexuais em fêmeas de camundongos.

A relação entre obesidade e hormônios sexuais ainda não é muito conhecida, principalmente sobre a influência destes na função pulmonar. Faz-se necessário, portanto, um estudo que relacione obesidade, variações hormonais como visto na menopausa e na gravidez com a função pulmonar. Sabe-se que mulheres quando atingem a menopausa têm maior probabilidade de se tornarem obesas e por consequência desenvolver doenças relacionadas ao sistema respiratório, como por exemplo, a asma. Ainda, têm estudos que correlacionam obesidade e gestação com inúmeras complicações na saúde das mulheres.

Sendo assim, este estudo tem a finalidade de estabelecer a relação entre obesidade com hormônios sexuais e função pulmonar. Além, complementar o entendimento sobre o sistema respiratório, nas condições mencionadas, pode ser uma importante base de conhecimento para, futuramente, ser usada na prática clínica e, assim, melhorar a qualidade de vidas das mulheres.

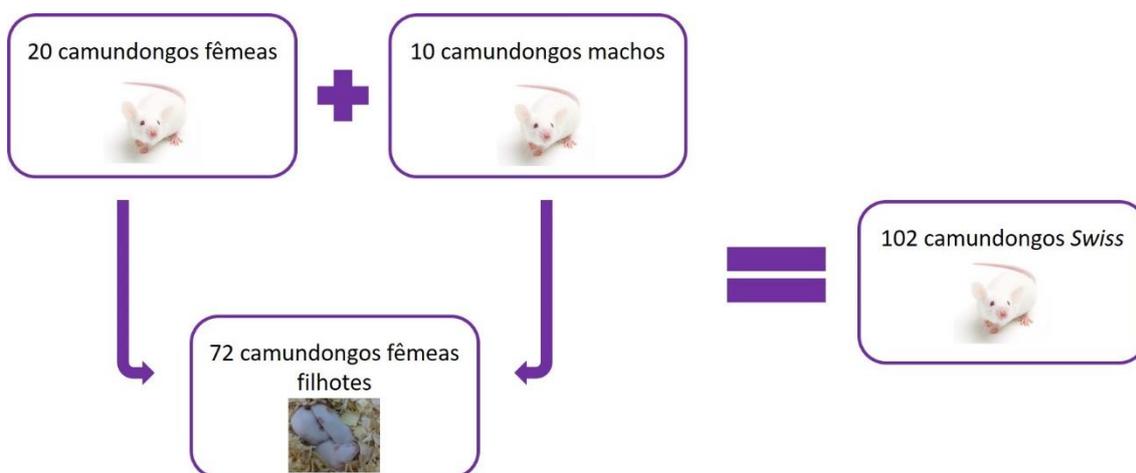
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados no total 102 camundongos da linhagem Swiss espécie *Mus musculus*. Destes 102 animais, 20 fêmeas e 10 machos (matrizes/genitores) geraram os filhotes que foram o objeto de estudo do presente projeto, ou seja, foram utilizados 30 animais no total como matrizes. Tais animais foram obtidos do Biotério Central da UNIFAL-MG e mantidos em caixas de polipropileno com tampa de aço inoxidável, recebendo água e ração comercial *ad libitum* sob ciclo claro-escuro de 12h (luz 07:00-19:00) no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UNIFAL-MG sob o protocolo de número 27/2018 e foram conduzidos de acordo com a declaração de Helsinki para o bem-estar de animais de experimentação.

FIGURA 5 - Quantidade de animais utilizados nos experimentos (matrizes e prole).



FONTE: Da autora

### 5.2 INDUÇÃO E COMPROVAÇÃO DA OBESIDADE

A prole gerada, seguindo o sistema de acasalamento Poiley e mantendo a proporção de duas fêmeas para cada macho (2:1; ou seja, 20 fêmeas para 10 machos) foi manipulada

após o nascimento. Realizou-se o ajuste de ninhada (1º dia pós-nascimento) desta forma: os filhotes fêmeas foram distribuídos aleatoriamente em ninhadas de 03 ou 12 filhotes por mãe, formando assim os dois tipos de ninhada: ninhada reduzida (NR = 36) e ninhada normal (NN = 36). O total de fêmeas usadas neste experimento foi de 72.

Os filhotes NR, ou seja, de 03 filhotes fêmeas por mãe, tiveram aumento de disponibilidade de leite e assim ocorreu a supernutrição pós-natal com aumento de potencial lactotrófico (RAJIA, et al., 2010), tornando-se obesas. Os filhotes NN, de 12 filhotes fêmeas por mãe, na sua grande maioria, não se tornaram obesos, sendo considerado controle. Os filhotes foram desmamados após 21 dias (3 semanas de vida). Portanto, formou-se dois grandes grupos: Controles e Obesos.

O peso dos animais foi verificado em dois momentos, entre a 7ª e 8ª semana de vida e na 11ª semana antes do animal passar por qualquer manipulação experimental.

Os filhotes NR, após o desmame, foram acomodados 3 por caixa (30x20x13cm) e os NN 12 por caixa (41x34x16cm) e, ambos os grupos, foram alimentados com ração comercial.

Os filhotes machos, assim como as matrizes (genitores: fêmeas e machos), foram eutanasiadas.

Dentro do grupo controle obtivemos três outros grupos, sendo controle (CC= 12 animais), controle sham (Csham = 12 animais) e controle ovariectomizado (COvx = 12 animais). Já no grupo obeso obtivemos mais três outros grupos: obeso controle (OC = 12 animais), obeso sham (Osham = 14 animais) e obeso ovariectomizadas (OOVx = 12 animais).

A obesidade foi comprovada após a ortotanásia daqueles animais que foram submetidos a medidas de mecânica ventilatória. Os animais tomaram dose suplementar de anestésicos, suficiente para provocar a eutanásia e retiramos a gordura abdominal presente no animal, essa gordura foi posteriormente pesada e o seu valor anotado. Isso para avaliar o grau de adiposidade corporal, sendo considerado um análogo do índice de massa corporal, que avalia o grau de adiposidade corporal (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

**OVx** - submetidos a cirurgia de ovariectomia (retirada dos dois ovários).

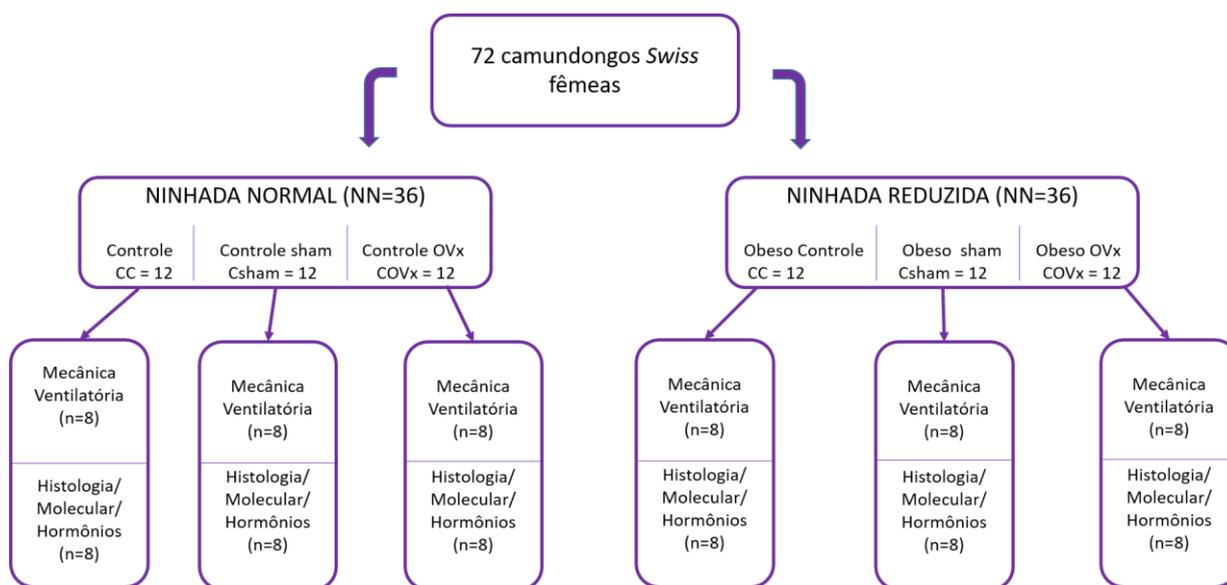
**sham** - falso operado: submetidos à manipulação cirúrgica sem a retirada dos ovários.

**C** - Controle: animais que não foram submetidos a nenhuma manipulação cirúrgica.

## 5.4 ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS

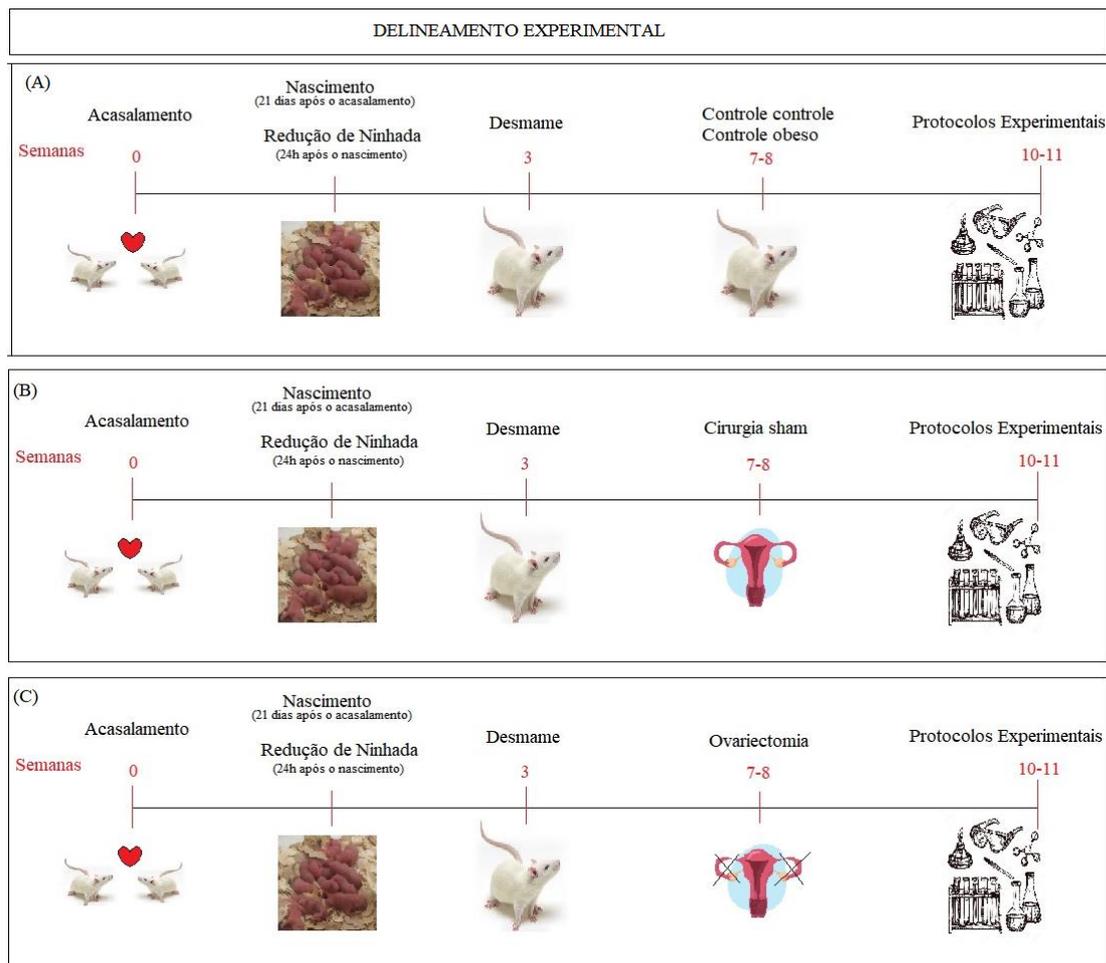
Cada grupo foi dividido de acordo com o tratamento e posteriormente subdivididos para realização dos protocolos experimentais: 1) mecânica ventilatória (n=8), 2) coleta de sangue para a realização do perfil bioquímico, dosagem de hormônios (estrogênio e progesterona), testes histológicos e moleculares (n=4).

FIGURA 6 - Descrição compilada do uso dos animais.



FONTE: Da autora

FIGURA 7- Delineamento experimental de cada grupo



LEGENDA: Durante a 7-8ª semana os animais foram pesados e posteriormente operados (A, B e C). Os protocolos experimentais foram mecânica ventilatória ou coleta de sangue e órgãos.

FONTE: Da autora.

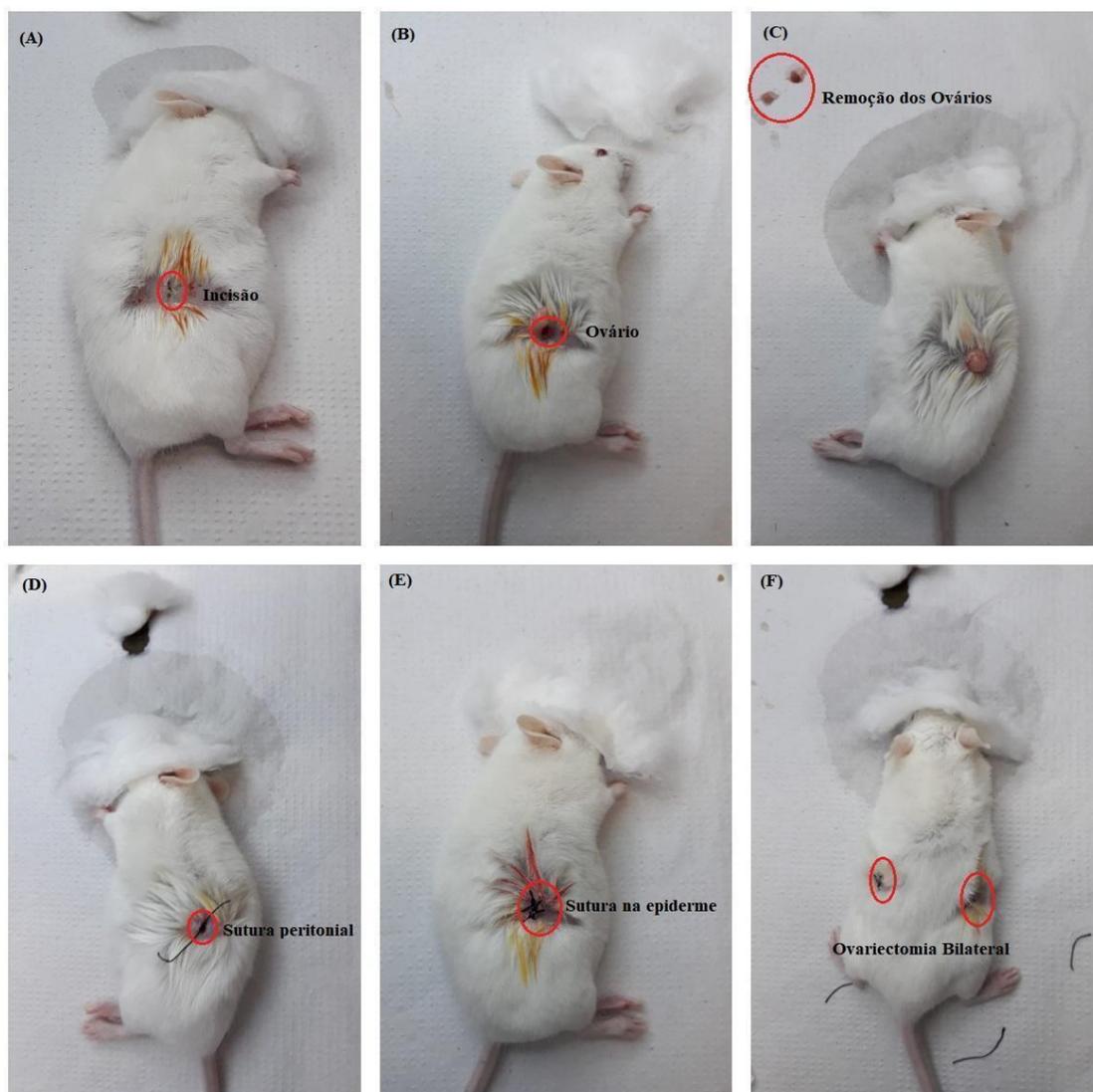
## 5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: OVARIETOMIA/SHAM

Em torno da 7 à 8ª semana de vida os animais dos grupos OVX foram submetidos à ovariectomia (figura 8). No dia do experimento foram pesados e anestesiados com xilazina (12mg/kg) e cetamina (120mg/kg) intraperitoneal (*i.p.*). Quando sob efeito anestésico e após verificação da ausência de qualquer dor ou sensação de desconforto pelo animal, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica. Fizemos a tricotomia e antisepsia da parede abdominal com álcool 70%, fizemos incisões bilaterais. Depois de identificados os ovários foi feita a ligadura de seus pedúnculos e em seguida e ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi suturada em dois planos com sutura simples de fio de seda no tamanho de 4-0 ou 5-0. Após a cirurgia foi feito o acompanhamento pós-operatório dos animais por 48h, foi

administrado Bytril® 5% (0.1mg/kg s.c.) e cloridrato de tramadol (50mg/kg s.c.) de 12h em 12h. Os animais submetidos a cirurgia de ovariectomia foram mantidos em observação por 3 semanas, após esse período foi realizado outros protocolos experimentais.

Os animais do grupo sham foram submetidos às mesmas condições dos grupos OVX, exceto que não sofreram a ressecção dos tecidos ovarianos, sendo assim nosso controle cirúrgico.

FIGURA 8- Passo a passo da cirurgia de ovariectomia bilateral com incisões dorsolaterais em camundongos fêmeas Swiss



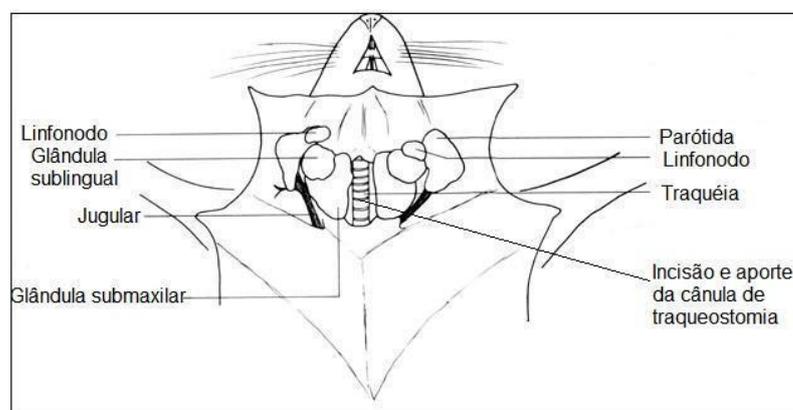
LEGENDA: (A) Incisão de 0.5cm na epiderme e peritônio; (B) Localização e exposição do ovário; (C) Remoção dos ovários; (D) sutura simples peritoneal; (E) sutura simples na epiderme; (F) ovariectomia bilateral.

FONTE: Da autora

## 5.6 MECÂNICA VENTILATÓRIA

Os grupos controle, sham e ovariectomizados foram submetidos ao procedimento de mecânica ventilatória entre a 10 e 11ª semana de vida. Os animais foram novamente pesados e anestesiados com xilazina (12mg/kg) e tiopental sódico (50mg/kg) intraperitoneal (*i.p.*). Quando sob efeito anestésico e após verificação da ausência de qualquer dor ou sensação de desconforto pelo animal, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, para realização traqueostomia. Os camundongos foram colocados em uma pequena mesa aquecida (*Heat Pad – Insight*) sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por fita adesiva. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, realizou-se a introdução de uma cânula de metal com calibre de 18G, sendo a cânula fixada à traqueia por meio de fios de algodão (figura 9). Posteriormente, os animais foram mantidos anestesiados e conectados a um ventilador mecânico (*FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá, versão 5.00*) (figura 10 e 11) apropriado no módulo 1 para camundongos. Este aparelho permite a manutenção da vida em animais sedados e curarizados e também atua na identificação da mecânica, por permitir que perturbações de volumes voluntários sejam aplicadas ao pulmão via traqueia (SHUESSLER; BATES, 1995; BATES; ALLEN, 2006).

FIGURA 9 - Localização da incisão para traqueostomia



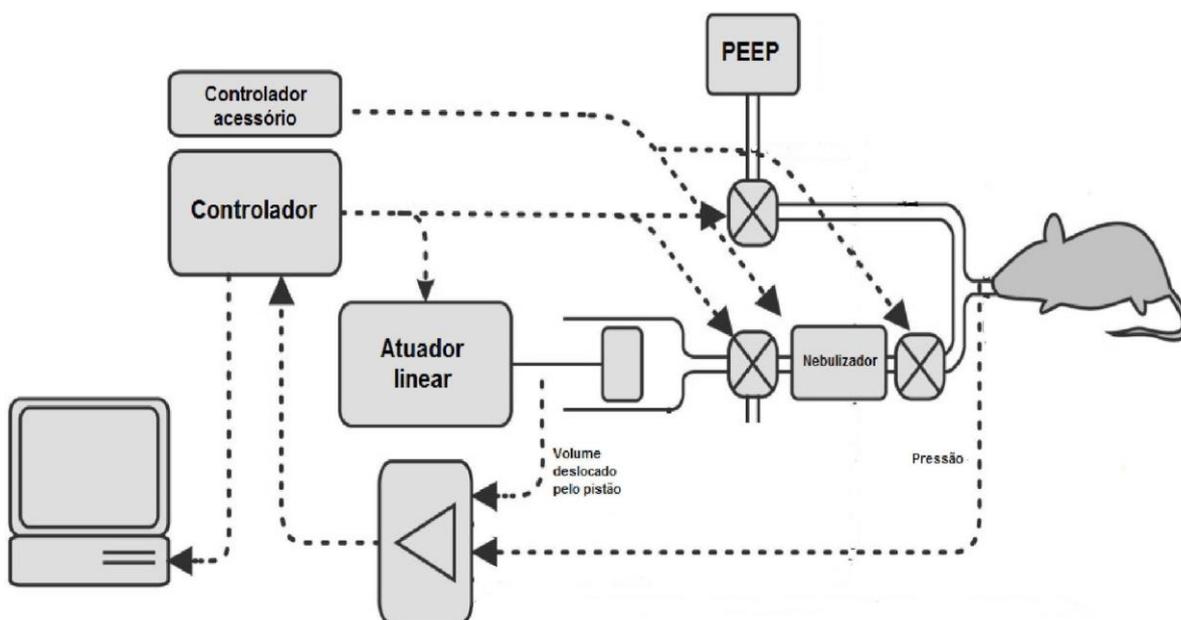
FONTE: COOK, 1965 – Adaptado

FIGURA 10 - Ventilador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ®, Canadá)



FONTE: TEIXEIRA, 2014.

FIGURA 11- Diagrama do ventilador para pequenos animais (FlexiVent-SCIREQ®), utilizado para a coleta de dados de mecânica respiratória.



FONTE: SHALABY et al., 2010 - Adaptado

Os animais foram avaliados com o tórax fechado e ventilados com parâmetros constantes: volume corrente de 10ml/kg, frequência respiratória de 120 ciclos/minuto e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3cmH<sub>2</sub>O conectado a uma válvula expiratória do ventilador. Posteriormente induziu-se a paralisia muscular pela administração de brometo de pancrônico (0.5mL/kg, *i.p.*) e a analgesia foi através da administração cloridrato de tramadol (50mg/kg, *i.p.*).

A mecânica respiratória foi medida pela aplicação de volumes utilizando a técnica de oscilações forçadas (HANTOS, et al., 1992). O ventilador mecânico para pequenos animais FlexiVent® foi controlado por um computador, intercalando a ventilação mecânica com manobras (perturbações) controladas de pressão e volume, para obter medidas precisas e reproduzíveis de mecânica respiratória (REBER, et al., 2012). As perturbações utilizadas foram: a TLC (capacidade pulmonar total) na qual consta de uma inflação profunda dos pulmões a uma determinada pressão, seguida de uma retenção da respiração normalmente de alguns segundos, utilizada antes das nebulizações com o objetivo de abrir espaços aéreos e padronizar o volume, para que a droga se difunda de maneira homogênea nos pulmões; SnapShot que é uma onda de oscilação forçada senoidal (frequência única), que corresponde à frequência respiratória do animal e tem por objetivo proporcionar resultados precisos (CHEN, et al., 2006), e o Quick-prime-3 que é uma manobra que consiste na imposição de um fluxo de ar com amplitude correspondente à soma de senóides de frequências entre 1,00 a 20,5 Hz ao longo de 3 segundos.

O software calcula a impedância do sistema respiratório ( $Z_{rs}$ ) dos animais de cada grupo, e para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (BATES, et al., 1989). Foram coletados: a posição do pistão ( $V_{cyl}$ ) e a pressão interna do cilindro ( $P_{cyl}$ ) (HANTOS, et al., 1992).  $V_{cyl}$  foi corrigido para obter o volume que efetivamente chega ao animal ( $V$ ) e  $P_{cyl}$  foi corrigido, nos dando o valor de  $P_{ao}$  pressão de abertura das vias aéreas. Por intermédio da derivação no tempo de  $V$ , será obtido o fluxo ( $V'$ ).

Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, (HANTOS, et al., 1992).

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Onde  $R_{aw}$  é a resistência de vias aéreas,  $I_{aw}$  é a inertância das vias aéreas ou inércia do ar,  $G$  caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares,  $H$  caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão,  $i$  é a unidade imaginária,  $f$  é a frequência

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \text{arco tangente} \left( \frac{H}{G} \right)$$

Serão obtidos com o ventilador os parâmetros:

$R_{tot}$  – resistência total

$R_{aw}$  - resistência de via aérea nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar;

E - elastância total

C - complacência total

Gtis - resistência tecidual;

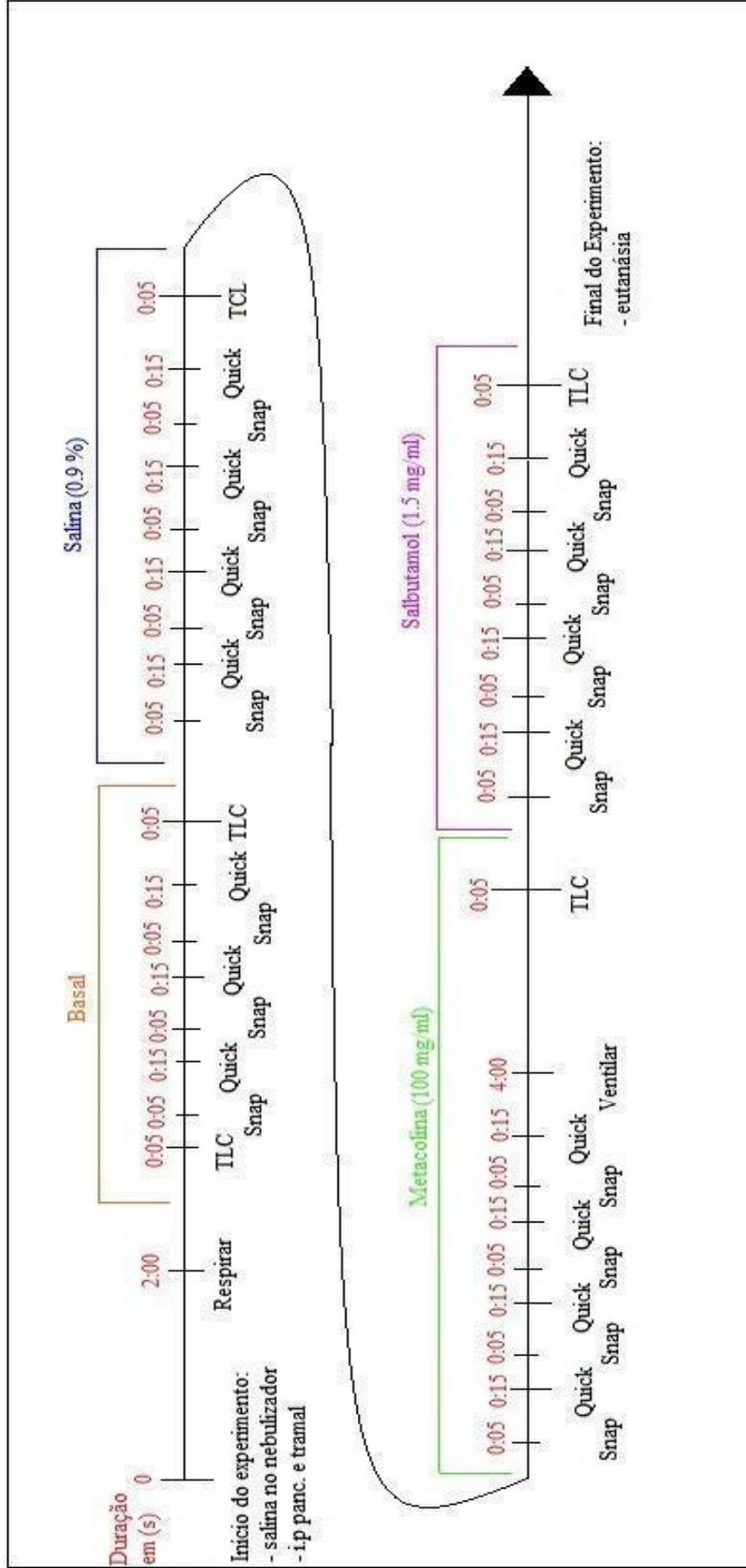
Htis - elastância do tecido pulmonar;

eta ou  $\eta$  - histeresividade

O animal foi ventilado por um tempo de aproximadamente por alguns minutos para adaptação, ajuste do sistema respiratório ao fluxo recebido e verificação de possíveis vazamentos, obstruções e correções no posicionamento. O ventilador mecânico manteve os camundongos ventilados e somente interrompeu essa ventilação em tempos determinados para aplicar perturbações e assim obter os valores acima descritos. Todos os grupos receberão nebulização (*Aeroneb Nebulizador do Flexivent - Aeroneb, Aerogen, Irlanda*) com salina (Sal, 09% NaCl), o broncoconstritor metacolina (MCh, *acetyl- $\beta$ -methylcholine chloride, Sigma®- Aldrich, St. Lois, USA*) na concentração de 100mg/mL para promover a hiperresponsividade brônquica, ou seja, a promover a broncoconstrição e o salbutamol (Salb, 1.5 mg/ml, *Aerolin, Glaxo Smith Kline, Barnard Castle, England*) para promover a broncodilação. Primeiramente, foram determinados os valores basais e posteriormente as medidas dos parâmetros respiratórios após nebulizações com Sal, MCh e Salb. O nebulizador aerosolizou o sistema respiratório durante 10 segundos e 5 segundos após, os valores da mecânica respiratória foram registrados. Os registros foram repetidos de 15 em 15 segundos até o tempo de 90 segundos para cada substância. O tempo de intervalo entre a administração delas foi 4 minutos (figura 12).

Após o registro dos valores (figura 13), seguiu-se a análises dos dados. Os valores analisados foram aqueles que suas perturbações apresentavam um coeficiente de determinação (COD) de 0.95. O limite mínimo para aceitar uma medição, logo após, a média de cada medição foi realizada e os valores foram plotados no Graphpad Prism.

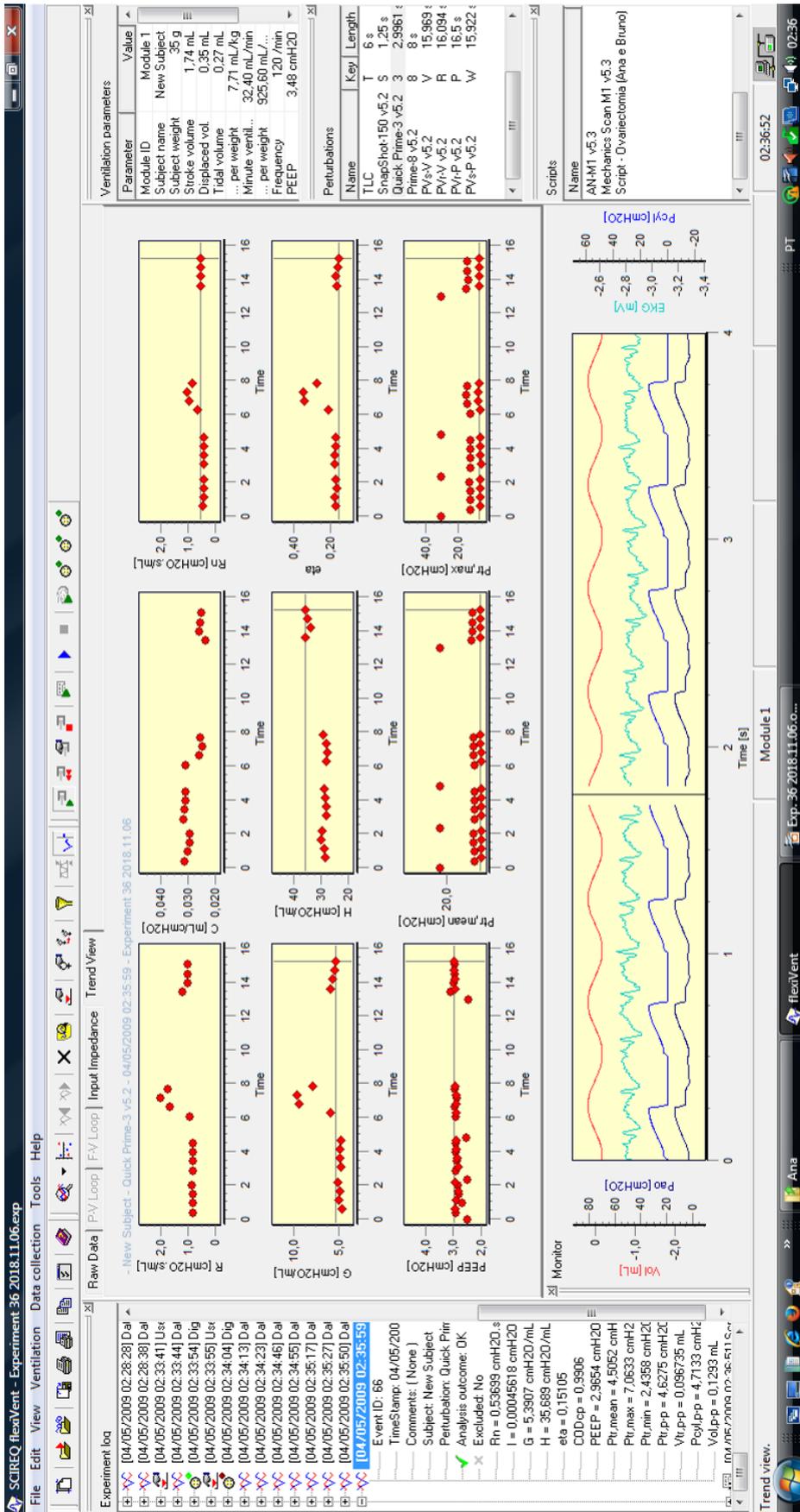
FIGURA 12 – Diagrama utilizado no roteiro da mecânica ventilatória.



LEGENDA: Escritos em preto demonstram quantas vezes foram repetidas cada perturbação e quais foram ela (TLC, SnapShot e Quick-prime). Em vermelho o tempo que durou cada perturbação em segundos.

FONTE: Da autora

FIGURA 13 - Print dos dados gerados pelo software do aparelho de Mecânica Ventilatória de oscilações forçadas Flexivent.



LEGENDA: Bolinhas vermelhas preenchidas significa que o dado foi coletado. Quando se nebuliza a MCh podemos notar um pico na Rtot e quando se nebuliza Salb. Podemos notar que ele volta ao "normal".

FONTE: Autora

## 5.7 COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, COLESTEROL, TRIGLICÉRIDES E HORMÔNIOS (ESTRADIOL E PROGESTERONA TOTAL)

As amostras utilizadas para a coleta sanguínea e para a coleta dos pulmões para a realização de cortes histológicos vieram de outros animais que não foram submetidos à mecânica ventilatória. Assim, desta forma evita que a mecânica ventilatória causa variações de volume e pressão pulmonares que resultam na mudança da estrutura e, conseqüentemente, pode mascarar os efeitos a serem estudados da obesidade e da ovariectomia neste órgão. Além disso, a administração dos fármacos para a indução da broncoconstrição e da broncodilatação podem provocar alterações fisiológicas.

Para a coleta do sangue, os animais foram deixados de jejum por 8h e anestesiados com isoflurano. Após verificação da ausência de qualquer dor ou sensação de desconforto pelo animal, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica. Iniciou-se o processo de coleta por meio de uma punção cardíaca. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, o plasma coletado foi congelado e mantido em freezer a -80°C.

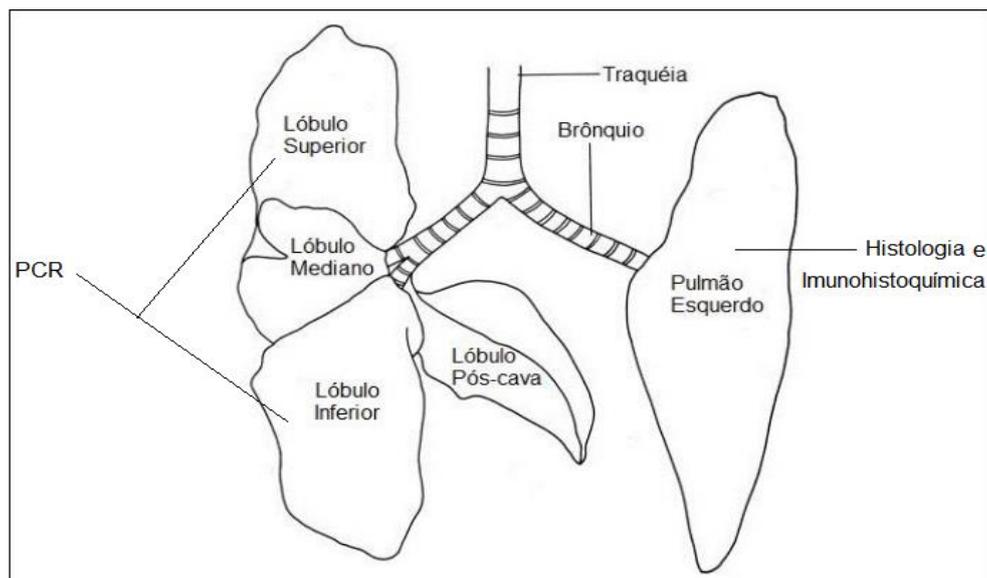
A concentração de glicose, colesterol e triglicérides foi feita com o teste enzimático-colorimétrico (Elisa - MD Millipore Corporation - Cat. #EZRMI-13k) em duplicata. Primeiro, foi pipetado amostras dos animais CC, Csham, COvx, OC, Osham e OOvx (3µL por poço) na placa de 96 poços, posteriormente o reagente enzimático (300µL por poço). Após a montagem da placa, que foi feita a leituras das amostras no espectrofotômetro, nos valores de absorbância em espectro, 500nm para colesterol e glicose e de 505nm para o triglicérides. Para o cálculo dos valores das amostras, primeiro foi feita a média de cada amostra, incluindo a média do branco e do padrão. Depois disso, deve-se subtrair da média das amostras e do padrão o valor da absorbância do branco, do valor obtido dessa subtração foi realizado uma equação (valor da sua amostra/valor do seu padrão) X o valor do padrão fornecido pelo kit, assim obtivemos o valor da concentração de glicemia, colesterol e triglicérides. A partir dos valores obtidos, foi realizado o teste estatístico ANOVA utilizando o programa Graphpad Prism 7.0.

A dosagem do estradiol e progesterona total foi feita por meio de um pool de amostras de plasma de cada grupo após ser centrifugado como descrito acima. A análise do estradiol foi realizada pelo método de eletroquimioluminescência e a progesterona total pelo método de quimiluminescência. As dosagens foram efetuadas pelo laboratório de análises clínica Hermes Pardini, Belo Horizonte.

## 5.8 REMOÇÃO DOS PULMÕES E HISTOLOGIA

Diferente do pulmão dos humanos, o pulmão de camundongos possui uma estrutura que consiste em um lóbulo pulmonar esquerdo sem fissuras, e o pulmão direito é dividido em quatro lóbulos distintos: o superior, mediano, inferior e o pós-cava (COOK, 1965). Para a remoção dos pulmões, o abdômen do animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava e artéria aorta abdominal foram seccionadas no intuito de permitir hemorragia maciça para levar o animal à morte. Posteriormente, o tórax foi aberto e os pulmões foram removidos em bloco (coração e pulmão). O pulmão foi separado do coração e o pulmão esquerdo e fixado em formalina 10% por aproximadamente 48 horas, depois desse período deixamos os pulmões em álcool 70% 7 dias. Após esse tempo os órgãos foram submetidos a bateria de desidratação seriada em álcool e xilol para depois serem embebidos em Paraplast. As amostras quando já solidificados e montados em blocos de madeira, fizemos cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo (Leica RM 2135) que foram coletados em lâminas histológicas revestidas por poli-L-lisina 10%. O pulmão direito foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise de transcrição relativa de ER. A figura 14 ilustra as regiões pulmonares que foram utilizados nesse estudo.

FIGURA 14 - Pulmão de camundongo para experimentação



FONTE: COOK, 1965 - Adaptado

Os cortes histológicos foram utilizados para a análise e quantificação de fibras elásticas e colágenas das vias aéreas e dos vasos sanguíneos pulmonares. Parte destes cortes foram utilizados para análise de imunocitoquímica para ER.

Os colágenos tipo I, III e totais foram corados pelo método de polarização por picrossirius. Os colágenos exibem diferentes interferências, cores e intensidades de birrefringência nas seções de tecido; quantificadas em vias aéreas e vasos sanguíneos (JUNQUEIRA et al., 1978). As fibras elásticas, foram coradas pelo método de coloração de orceína, marrom, foram quantificadas em vias aéreas e vasos sanguíneos (NAKAMURA, et al., 1977).

Os dois protocolos de coloração são muito semelhantes passam pela fase de desparafinização com xilol, hidratação com uma bateria seriada de etanol absoluto, 95%, 80%, 70% e água destilada, coloração (Orceína ou Picrossirius), desidratação (etanol em diversas concentrações), diafanizadas em xilol e montagem da lâmina permanente com Entelan e lâmina.

As lâminas foram fotografadas em microscópio fotônico (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan) e adquiridas pelo software de análise de imagens (NIS-Elements 3.1/Nikon/Japan). As medidas dos vasos sanguíneos e das vias aéreas, em ambos os métodos (picrossirius e orceína), foram feitas sob uma ampliação de 20x em uma luz convencional microscópio com luz polarizada para picrossirius e luz convencional sem polarização para orceína. A análise consistiu em 10 fotografias por animal nas quais observamos a relação espessura da parede de vias aéreas/ área do lúmen.

A quantificação de ambas as fibras foi realizada pelo programa ImageJ através da porcentagem de expressão por área marcada.

## 5.9 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ER

As reações de imunohistoquímica para receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  foram realizadas após os cortes histológicos de 5 $\mu$ m de espessura de pulmão em parafina serem obtidos em micrótomo diretamente sobre lâminas tratadas com poli-L-lisina (1:8) e submetidos inicialmente para serem desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool e incubados com 1% de peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS por 30 minutos. Logo após a lavagem com PBS (50mM), os cortes foram incubados com 1% de albumina sérica bovina (BSA - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS por 30 minutos, seguido de incubação (over night - 4°C) com os anticorpos primários: anti-ER $\alpha$  e anti-ER $\beta$  (ambos 1:50, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após lavagem com PBS os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário: anti-coelho biotilado (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 hora e streptavidina-peroxidase (1:150, Chemicon International, Temecula, CA, USA) por mais 1 hora. Após lavagem com PBS, os

cortes foram revelados com 3,3 diaminobenzidina (Sigma, St Louis, USA) em TBS 50mM contendo peróxido de hidrogênio 0,1%. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, montados em Entellan (Merck kGAa Darmstadt, Alemanha) e observados com microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japão) com câmera acoplada. O controle negativo da reação foi obtido com procedimento similar, porém omitindo o anticorpo primário.

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram obtidos do equipamento, coletados e distribuídos em planilhas de Microsoft Excel. Posteriormente foram processados no software GraphPad Prisma (v 7.0, San Diego, CA, USA) expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (SEM) somente os dados de mecânica ventilatória foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores para amostras independentes, enquanto os outros dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) com um fator para amostras independentes. Quando encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foi realizado o teste de Bonferroni post hoc para comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

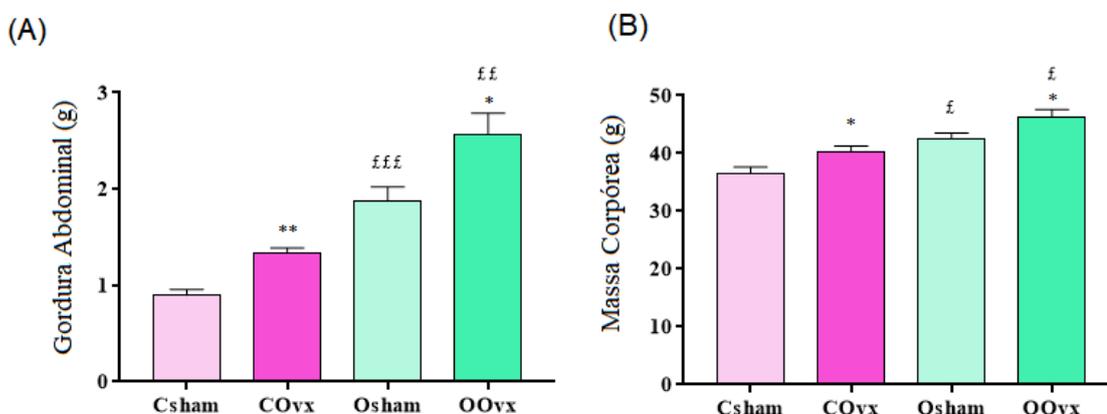
Todos os resultados e análises encontrados abaixo, foram realizados em todos os grupos experimentais (CC, Csham, COVx, OC, Osham e OOvx). Entretanto, as comparações feitas entre os grupos CC vs. Csham e OC vs. Osham, não demonstraram diferença, por esse motivo, optamos por escolher um dos grupos para fazer as análises e comparações, ou seja, optamos pelos grupos Csham e Osham em vez de CC e OC.

### 6.1 VALIDAÇÃO DA OBESIDADE

A validação da obesidade foi realizada pela medida de massa corpórea. Para isso comparamos o peso dos animais adultos com 7-8 semanas de vida e com 10-11 semanas, calculando a média desse valor. Outro método que utilizamos para validar a obesidade foi através da quantificação da gordura abdominal.

De acordo com a figura 15 podemos perceber que o grupo Osham apresenta um acréscimo tanto de massa corpórea ( $p < 0,05$ ) quanto de gordura abdominal ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo Csham. Os gráficos apontam ainda que os animais dos grupos submetidos a cirurgia de ovariectomia bilateral tiveram um incremento significativo tanto da massa corpórea ( $p < 0,05$ ) quanto da gordura abdominal (Csham comparado ao COvx  $p < 0,01$  e Osham comparado ao OOvx  $p < 0,05$ ).

Figura 15 - Valores de gordura abdominal e massa corpórea expressos como média  $\pm$  SEM.



LEGENDA: (A) Gordura Abdominal; (B) Massa Corpórea. \* Csham comparado com COvx, ou, Osham comparado com OOvx ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ); £ Csham comparado com Osham ou COvx comparado com OOvx (£ $p < 0,05$ ; ££ $p < 0,01$ ; £££ $p < 0,001$ ). Teste One-way Anova seguido do teste de múltipla comparação Bonferroni.

FONTE: Da autora.

## 6.2 PERFIL BIOQUÍMICO

A partir do plasma sanguíneo determinamos o perfil bioquímico de todos os grupos a partir de três componentes, tais como a glicose, o colesterol total e os triglicerídeos.

Podemos observar que os animais obesos (Osham e OOvx) possui um aumento significativo na sua glicose e nos seus triglicerídeos, quando comparados aos seus grupos controles. No entanto as únicas comparações que foram estatisticamente significativas é a de Csham com o Osham para os triglicerídeos. Indicando assim, que a obesidade é prejudicial para o animal.

Tabela 2 - Valores bioquímicos expressos como média  $\pm$  SEM

Parâmetros (mg/dl)	Csham	COvx	Osham	OOvx
Glicose	130 $\pm$ 9	140 $\pm$ 13	140 $\pm$ 13	152 $\pm$ 6
Colesterol Total	25 $\pm$ 4	30 $\pm$ 6	27 $\pm$ 8	29 $\pm$ 1
Triglicerídeos	107 $\pm$ 12	121 $\pm$ 8	133 $\pm$ 8 <sup>&amp;</sup>	122 $\pm$ 9

LEGENDA: Csham – controle falso operado, COvx – controle ovariectomizado, Osham – obeso falso operado e OOvx – obeso ovariectomizado. Teste One-way Anova seguido de teste de múltiplas comparações Bonferroni. N= 4-8.

FONTE: Da autora

## 6.3 VALIDAÇÃO DA OVARIECTOMIA BILATERAL

A validação da ovariectomia foi feita por meio de uma dosagem hormonal. Essa dosagem foi analisada a partir de um pool de sangue dos animais e seus respectivos grupos. Os hormônios analisados foram o estradiol e a progesterona, que são produzidos em grande quantidade pelos ovários.

Segundo a tabela (3), nota-se uma redução drástica de ambos os hormônios nos grupos que foram ovariectomizados. Demonstrando assim, que a ovariectomia bilateral é efetiva para simular a menopausa.

Tabela 3- Dosagem de estradiol e progesterona de animais controle e obesos, ovariectomizados e não ovariectomizado.

Hormônios	Csham	COvx	Osham	OOvx
Estradiol (mg/ml)	21	14	20	5
Progesterona Total (ng/ml)	22,63	0,25	19	3,26

LEGENDA: Csham – controle falso operado, COvx – controle ovariectomizado, Osham – obeso falso operado e OOvx – obeso ovariectomizado

FONTE: Da autora.

#### 6.4 MECÂNICA VENTILATÓRIA

Os valores basais e de salina dos grupos não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,1$ ), como observado em outros trabalhos (MCALEXANDER et al., 2015; NEZIRI et al., 2017). Visto isso, optamos por utilizar os valores de salina como comparação, pois os demais fármacos, metacolina (MCh) e salbutamol (Salb), foram diluídas em salina e também aerosolizadas.

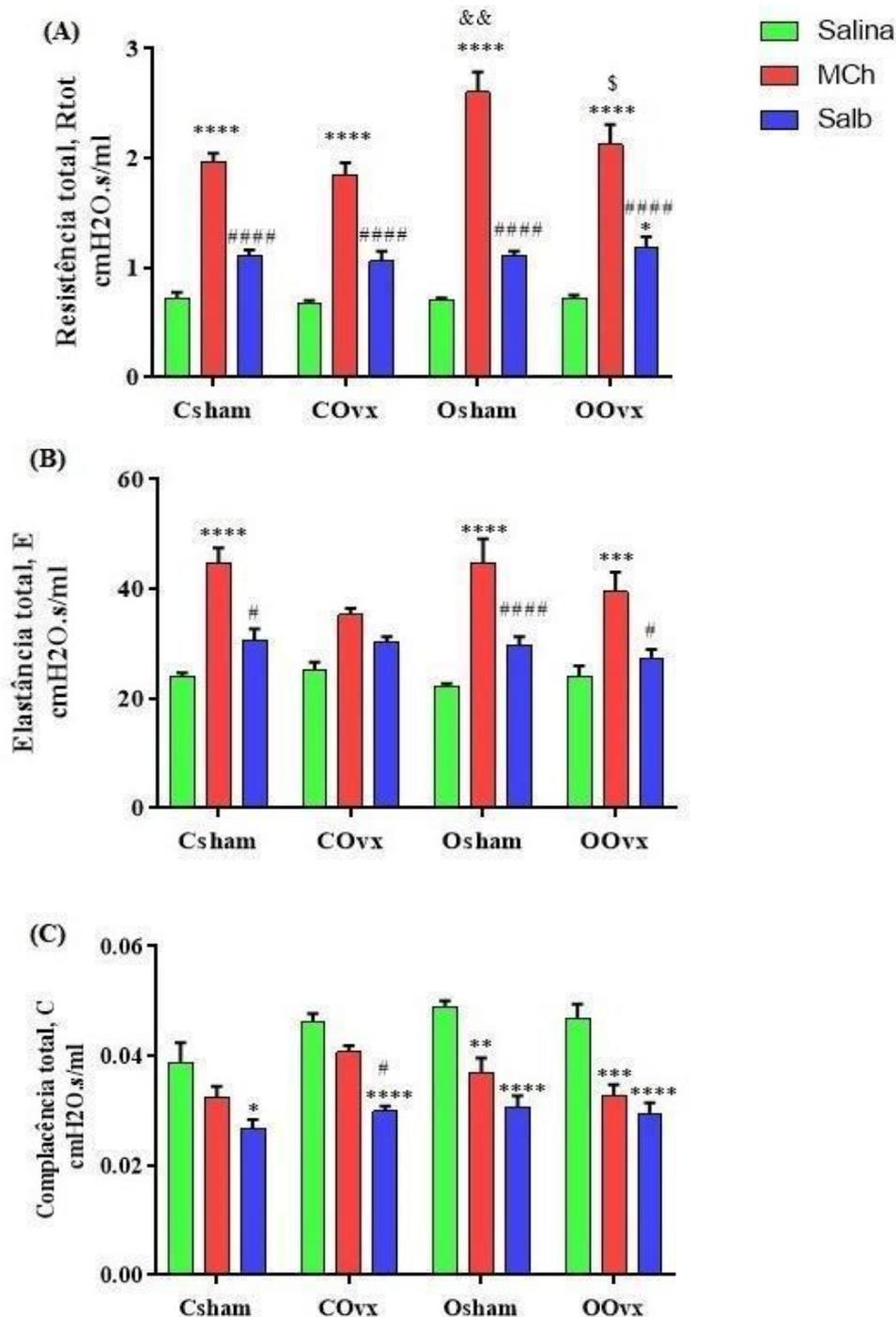
Analisamos os resultados dos parâmetros obtidos pela mecânica individualmente, uma vez que são parâmetros distintos, na figura (16) temos os gráficos de  $R_{tot}$ , E e C já na figura (17) temos os gráficos de Raw, G, H e  $\eta$ . Em  $R_{tot}$  (figura 16 - A) todos os grupos (Csham, COvx, Osham e OOvx) estudados apresentaram um incremento da sua resistência quando submetidos a MCh, um broncoconstritor. Após induzir a broncoconstricção com MCh, foi usado o broncodilatador Salb que apresentou resposta de queda na  $R_{tot}$ , retornando os valores basais. O teste com o fármaco Salb., broncodilatador, demonstrou que  $R_{tot}$  volta ao normal quando comparado a salina. A obesidade tem um grande efeito nos pulmões, uma vez que o grupo obeso é submetido ao teste com MCh a sua resposta é muito acentuada ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo Csham. Outro fator que podemos observar é que o grupo OOvx demonstra um retorno dessa broncoconstricção de modo semelhante ao do grupo COVx e Csham.

Na elastância total (E) (figura 16- B) identificamos que os grupos (Csham, Osham e OOvx) obtiveram o mesmo padrão que a  $R_{tot}$  nos testes com MCh e Salb. Nota-se que a cirurgia de ovariectomia demonstra uma tendência na diminuição de E no grupo COvx quando comparados a Csham.

Na resistência de vias aéreas (Raw) (figura 17 - D) detectamos que todos os grupos (Csham, COvx, Osham e OOvx) apresentaram um acréscimo de Raw quando submetidos a MCh. No entanto, o padrão de resposta ao Salb se difere do que fora encontrado em  $R_{tot}$ , E e C. Sendo assim, constatou-se que a resposta ao Salb é diferente da salina nos grupos Csham ( $p < 0,001$ ); COvx ( $p < 0,0001$ ) e Osham ( $p < 0,01$ ). A exceção a esse padrão encontrado é o grupo OOvx tem valores semelhantes a salina. Observou-se ainda em Raw a existência de uma diferença significativa entre os grupos Csham e Osham, no qual Osham apresenta um perfil de MCh aumentado, esse valor aumentado que é atribuído a efeito causado pela obesidade. Contudo, quando observamos os grupos Osham e OOvx, nota-se que a ovariectomia provoca uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) da MCh em Raw.

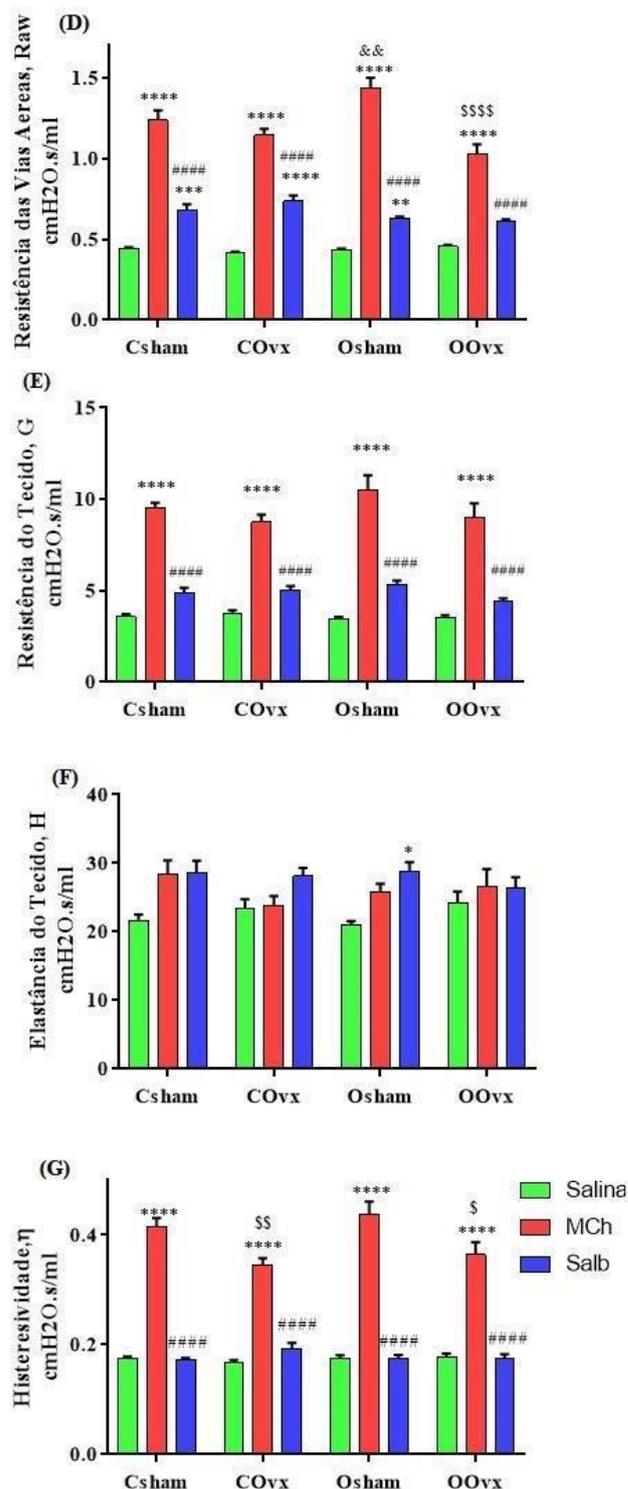
Ao estudarmos os gráficos com todos os grupos (Csham, COvx, OC e OOvx) da complacência total (C) e a resistência do tecido (Gtis) e elastância do tecido (Htis) se mostrou semelhante em todos os grupos e em todas as condições estudadas, não acusando diferença estatística.

A histeresividade ( $\eta$ ) é a relação existente entre o Gtis e o Htis. Este por sua vez exibiu um aumento da sua resposta em MCh e um retorno dessa resposta ao nível basal com o Salb. em todos os grupos estudados (Csham, COvx, Osham e OOvx). Porém, a resposta a MCh dos grupos que foram submetidos a cirurgia de ovariectomia (COvx e OOvx) é significativamente reduzida quando comparado aos seus respectivos grupos controle Csham e Osham ( $p < 0,01$ ) (figura 17-G).

FIGURA 15 - Valores de mecânica respiratória expressos como média  $\pm$  SEM.

LEGENDA: (A) Resistência total; (B) Elastância Total; (C) Complacência total; em camundongos fêmeas, grupos controle sham (Csham), controle ovariectomizado (COvx), obeso controle (OC) e obeso ovariectomizado (OOvx), n= 5-8. \* Salina vs MCh e Salb dentro do mesmo grupo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). # comparação entre MCh e Salb. dentro do mesmo grupo (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$ ). \$ comparação entre as MCh dos grupos Csham com COvx e Osham com OOvx (\$ $p < 0,05$ ). & comparação entre os grupos controle e obesos (& $p < 0,01$ ). Teste Two-way Anova seguido do teste de múltipla comparação Bonferroni.

FONTE: Da autora.

FIGURA 16 - Valores de mecânica respiratória expressos como média  $\pm$  SEM.

LEGENDA: (D) Resistência das Vias Aéreas; (E) Resistência do tecido; (F) Elastância do tecido; (G) Histeresividade, em camundongos fêmeas, grupos controle sham (Csham), controle ovariectomizado (COvx), obeso controle (OC) e obeso ovariectomizado (OOvx), n= 5-8. \* Salina vs MCh e Salb dentro do mesmo grupo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). # comparação entre MCh e Salb. dentro do mesmo grupo (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$ ). \$ comparação entre as MCh dos grupos Csham com COvx e Osham com OOvx ( $p < 0,05$ ). & comparação entre os grupos controle e obesos (& $p < 0,01$ ). Teste Two-way Anova seguido do teste de múltipla comparação Bonferroni.

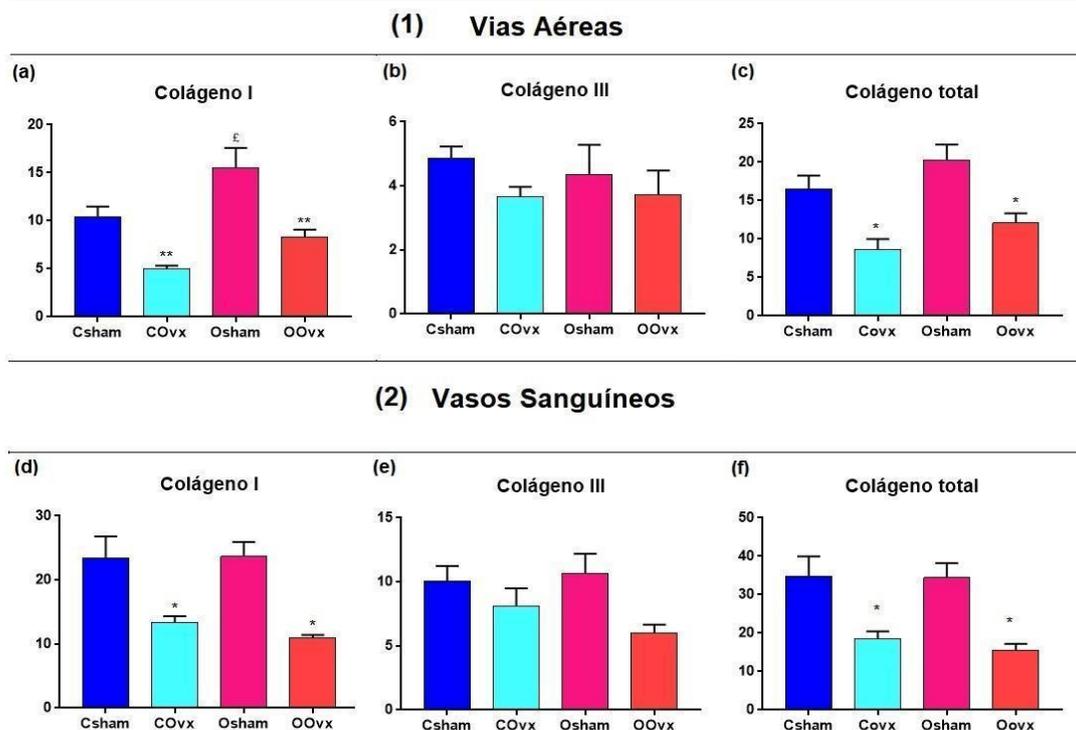
FONTE: Da autora.

## 6.5 ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENO I, III E TOTAL DAS VIAS AÉREAS INFERIORES E DOS VASOS SANGUÍNEOS DO PULMÃO

Analisamos e quantificamos o colágeno presente nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos dos cortes histológicos de pulmão (figura 19).

Podemos observar que nas vias aéreas (figura 18 - 1) houve um incremento de colágeno do tipo I no grupo Osham quando comparado ao grupo Csham (seu respectivo grupo controle). No entanto, quando analisamos o colágeno do tipo III notamos que não existe uma diferença estatística entre os grupos controles e obesos e nem entre não ovariectomizados e ovariectomizados. Ao analisamos os grupos ovariectomizados (COvx e OOVx) notamos que houve uma redução do colágeno tipo I quando comparado aos seus grupos controles (Csham e Osham). Notamos que essa redução persiste quando analisamos o colágeno total e comparamos eles aos seus respectivos grupos controle. O colágeno total é a soma do colágeno do tipo I e o colágeno do tipo III.

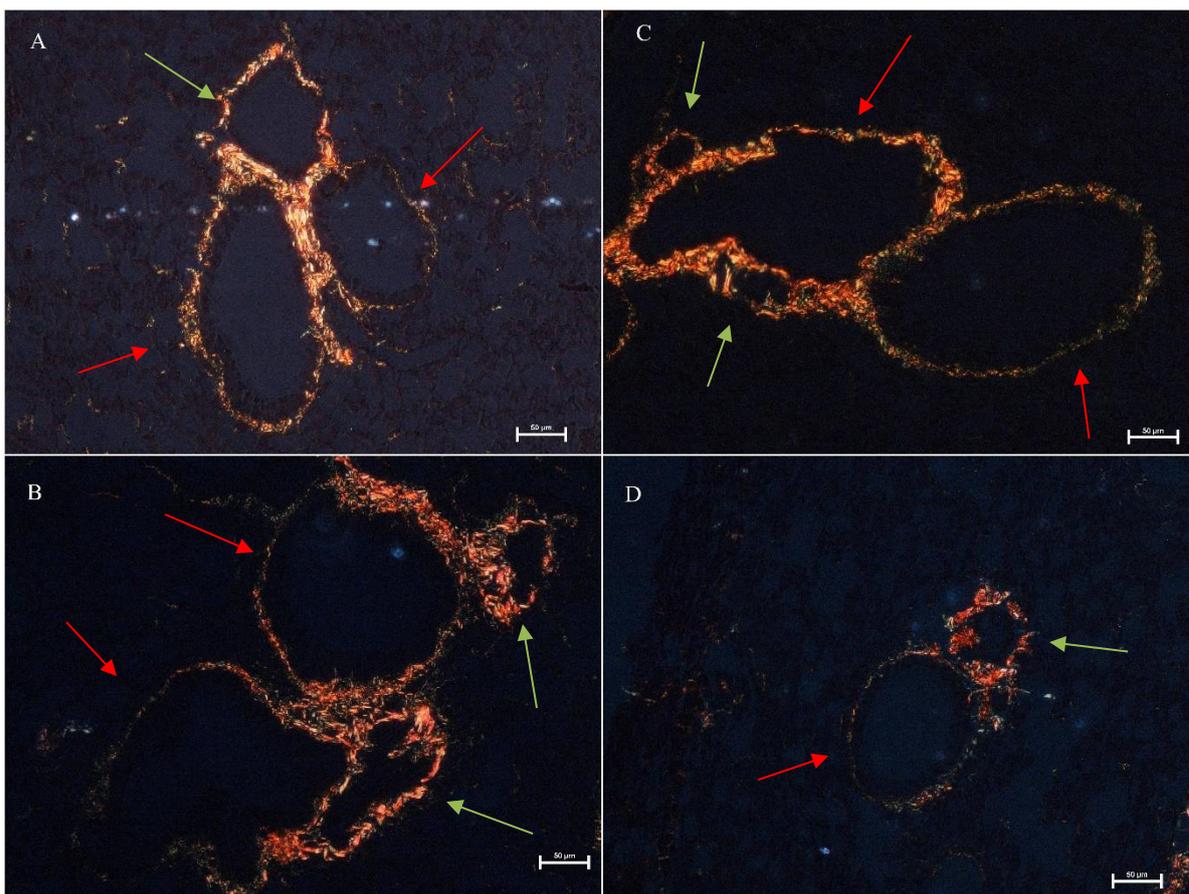
Ao observamos os vasos sanguíneos (figura 18 – 2) podemos identificar uma redução do colágeno tipo I quando comparados aos seus grupos controles (Csham e Osham). Notamos que essa redução persiste quando analisamos o colágeno total e comparamos eles aos seus respectivos grupos controle. O colágeno total é a soma do colágeno do tipo I e o colágeno do tipo III.

FIGURA 17 – Valores da quantificação de colágeno expressos como média  $\pm$  SEM

LEGENDA: (1) Vias aéreas: (a) colágeno tipo I, (b) colágeno tipo III, (c) Colágeno total. (2) Vasos Sanguíneos: (d) colágeno tipo I, (e) colágeno tipo III, (f) Colágeno total. \* Comparação entre Csham e COvx, Osham e OOvx (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). £ Comparação entre Csham e Osham (& $p$ <0,01). Teste One-way Anova seguido do teste de múltipla comparação Bonferroni.

FONTE: Da autora

FIGURA 18 - Cortes histológicos com espessura de 5µm corados com picosirius



LEGENDA: (A) Csham; (B) COvx; (C) Osham; (D) OOvx. Setas vermelhas indicam vias aéreas e as setas verdes indicam vasos sanguíneos. O colágeno se encontra na membrana das vias aéreas e dos vasos sanguíneos.

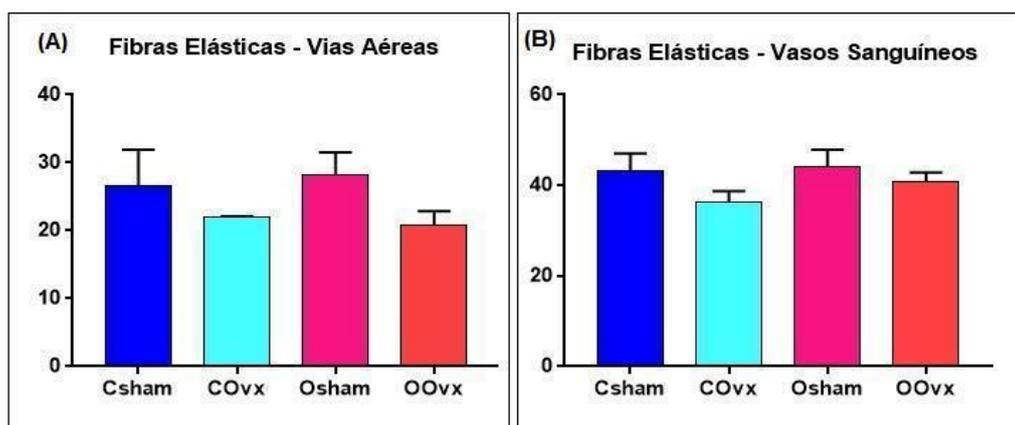
FONTE: Da autora.

## 6.6 ANÁLISE DAS FIBRAS ELÁSTICAS DAS VIAS AÉREAS INFERIORES E DOS VASOS SANGUÍNEOS DO PULMÃO

Analizamos e quantificamos as fibras elásticas presente nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos dos cortes histológicos de pulmão (figura 21)

Os gráficos (figura 20) demonstram que não houve uma diferença significativa entre os grandes grupos controles e obesos e entre os não ovariectomizados e os ovariectomizados, ou seja, entre Csham vs. Osham e entre COvx e OOvx. Quando comparamos dentro dos grandes grupos, ou seja, entre as comparações de Csham vs. COvx e de Osham vs. OOvx, identificamos que eles também não possuem diferença estatística.

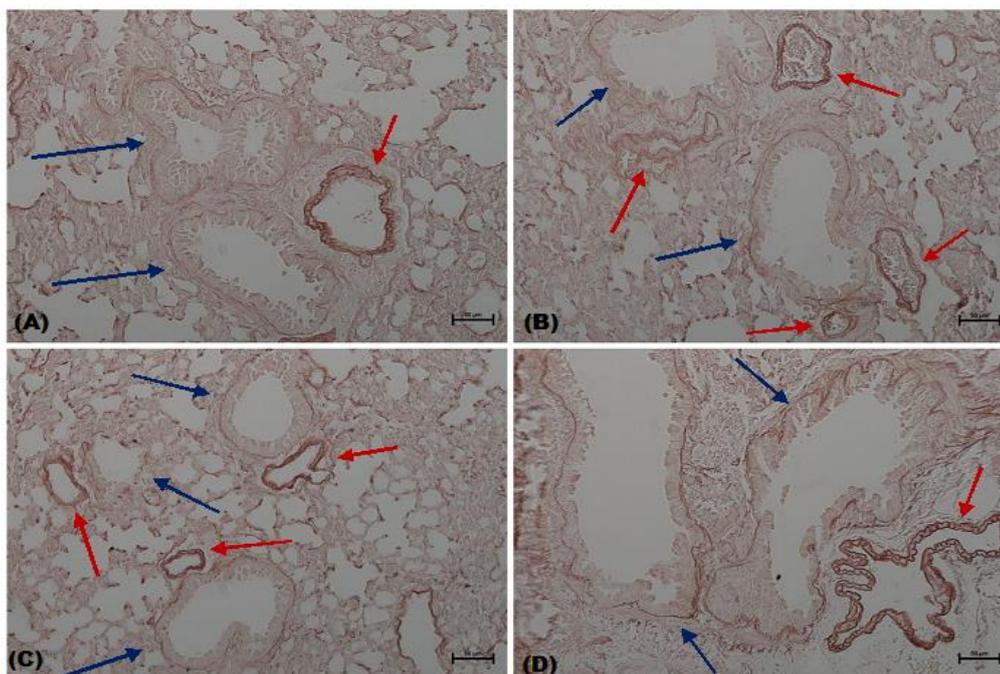
FIGURA 19 – Valores da quantificação de fibras elásticas expressos como média  $\pm$  SEM.



LEGENDA: (A) Fibras Elásticas –Vias Aéreas; (B) Fibras Elásticas – Vasos Sanguíneos.

FONTE: Da autora

FIGURA 20 - Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m corados com orceína.



LEGENDA: (A) Csham; (B) COvx; (C) Osham; (D) OOvx. Setas azuis indicam vias aéreas e as setas vermelhas indicam vasos sanguíneos. As fibras elásticas ficam na parte externa da borda das vias aéreas e dos vasos sanguíneos.

FONTE: Da autora.

## 6.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

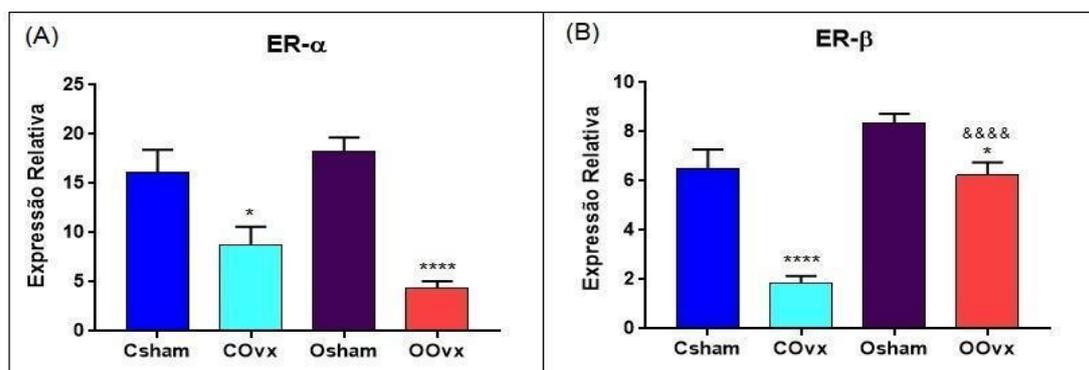
A imunohistoquímica é um experimento que nos possibilita analisar a quantidade de ER $\alpha$  e ER $\beta$  presente nos cortes histológicos de pulmão (figura 24 e 25). Ao observarmos os gráficos (figura 22) notamos que não existe diferença significativa entre os grupos Csham e

Osham e entre os grupos COvx e OOvx., podemos evidenciar que ER $\alpha$  é mais predominante do que ER $\beta$  no pulmão, ou seja, a quantidade de ER $\alpha$  chega próxima dos 30%, enquanto ER $\beta$  chega próxima dos 10%.

Observando agora, somente o gráfico de ER $\alpha$  (figura 22 – A), notamos que após a cirurgia de OVX, notamos uma redução na expressão relativa de receptores ativos quando comparamos os grupos Csham vs. COvx e Osham vs. OOvx, no entanto, essa redução é mais expressiva na comparação entre o grupo Osham e OOvx ( $p < 0,0001$ ). No gráfico de ER $\beta$  (figura 22-B), também identificamos uma redução na quantidade de receptores ativos (Csham vs. COvx e Osham vs. OOvx), entretanto, essa redução é mais significativa na comparação entre Csham e COvx ( $p < 0,0001$ ), possuindo assim, diferença estatística.

O resultado encontrado que se destaca nesse experimento é diferença exorbitante entre o grupo COvx e o grupo OOvx na quantidade de receptores ativos de ER $\beta$ . O grupo OOvx apresentou uma quantidade elevada de ER $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo COvx.

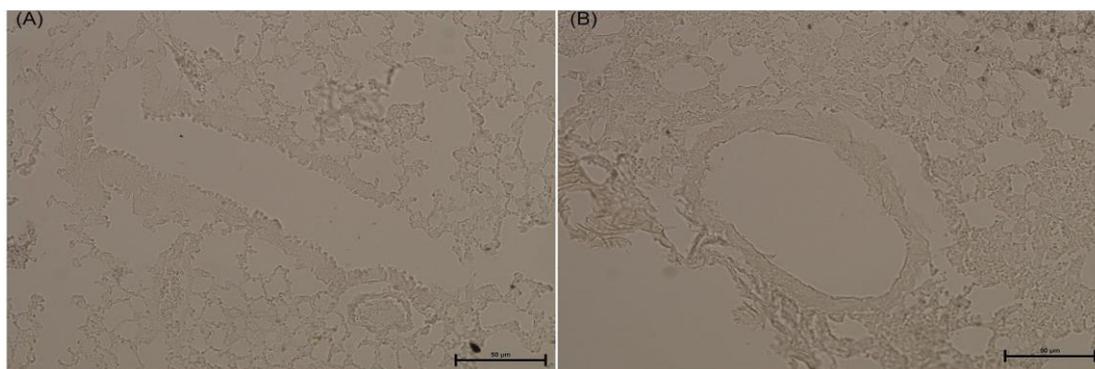
FIGURA 21 – Valores da quantificação de ER $\alpha$  e de ER $\beta$  expressos como média  $\pm$  SEM.



LEGENDA: (A) ER $\alpha$ ; (B) ER $\beta$ . \* Comparação entre Csham e COvx, Osham e OOvx ( $*p < 0,05$ ;  $****p < 0,0001$ ). & Comparação entre COvx e OOvx (&&&&  $p < 0,0001$ ). Teste One-way Anova seguido do teste de múltipla comparação Bonferroni.

FONTE: Da autora.

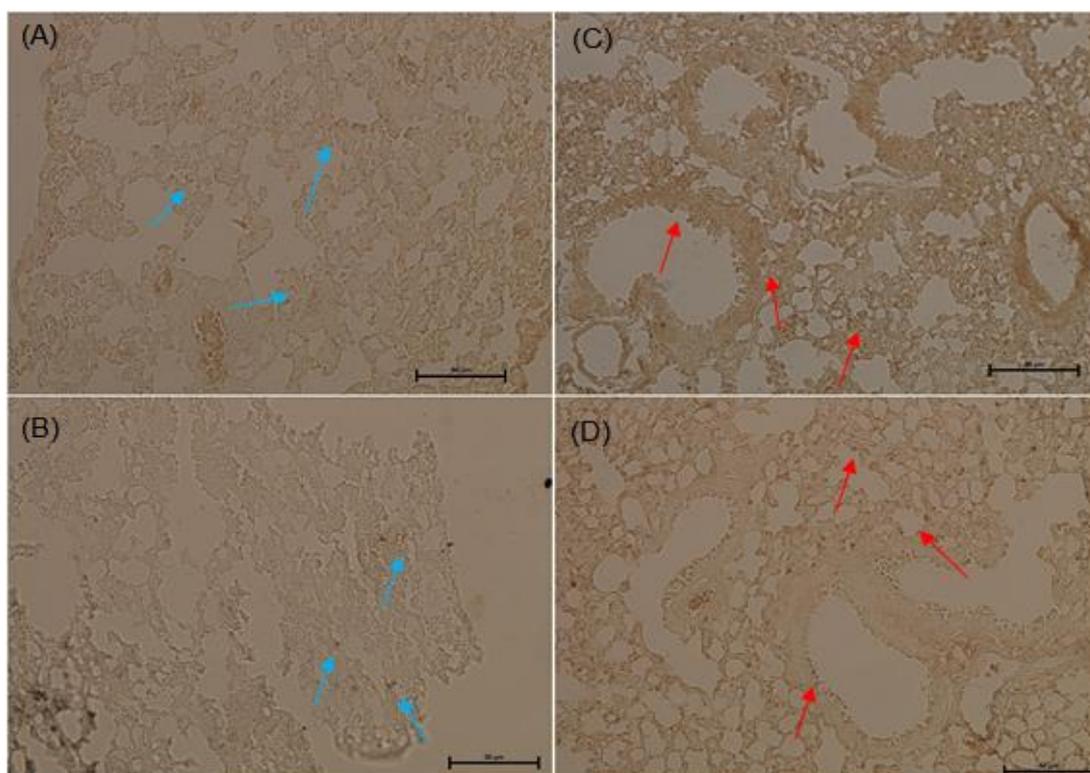
FIGURA 22- Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica controle negativo.



LEGENDA: (A) Controle negativo de ER $\alpha$ . (B) Controle negativo de ER $\beta$ .

FONTE: Da autora

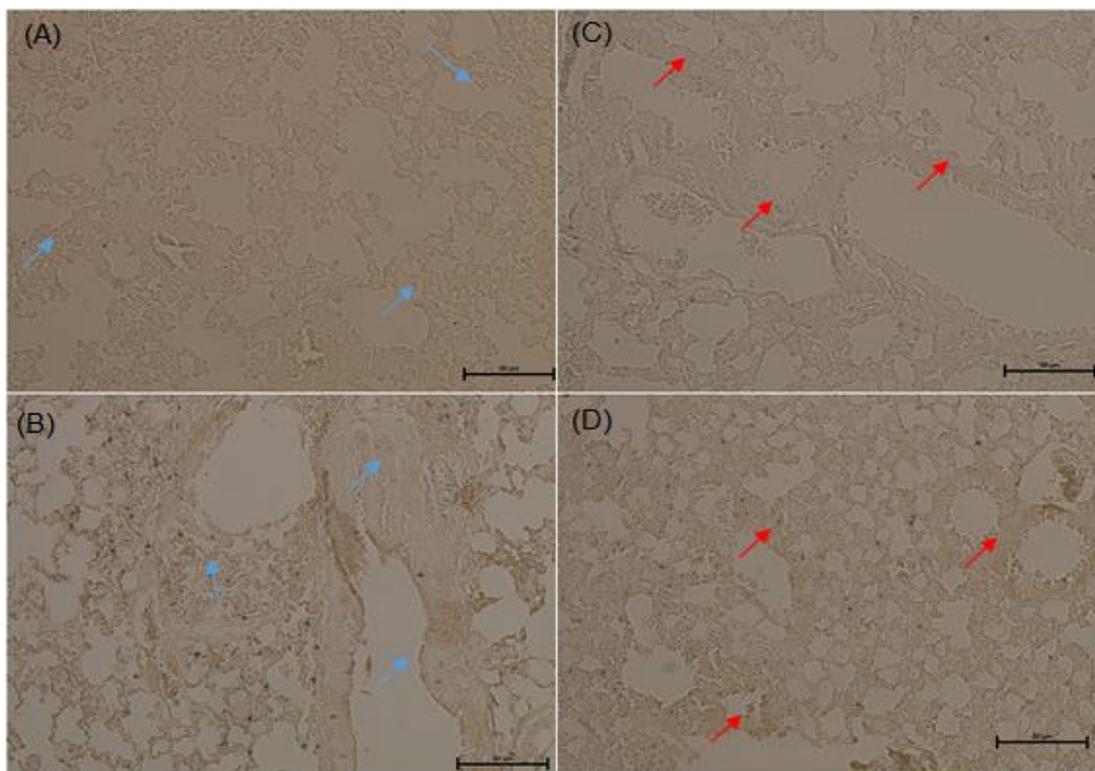
FIGURA 23- Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica de ER $\alpha$



LEGENDA: (A) Csham; (B) COvx; (C) Osham; (D) OOvx. As setas azuis indicam algumas marcações de ER $\alpha$  no grupo controle. As setas vermelhas indicam algumas marcações de ER $\alpha$  no grupo obeso.

FONTE: Da autora

FIGURA 24 - Cortes histológicos com espessura de 5 $\mu$ m, corados com DAB, para imunohistoquímica de ER $\beta$



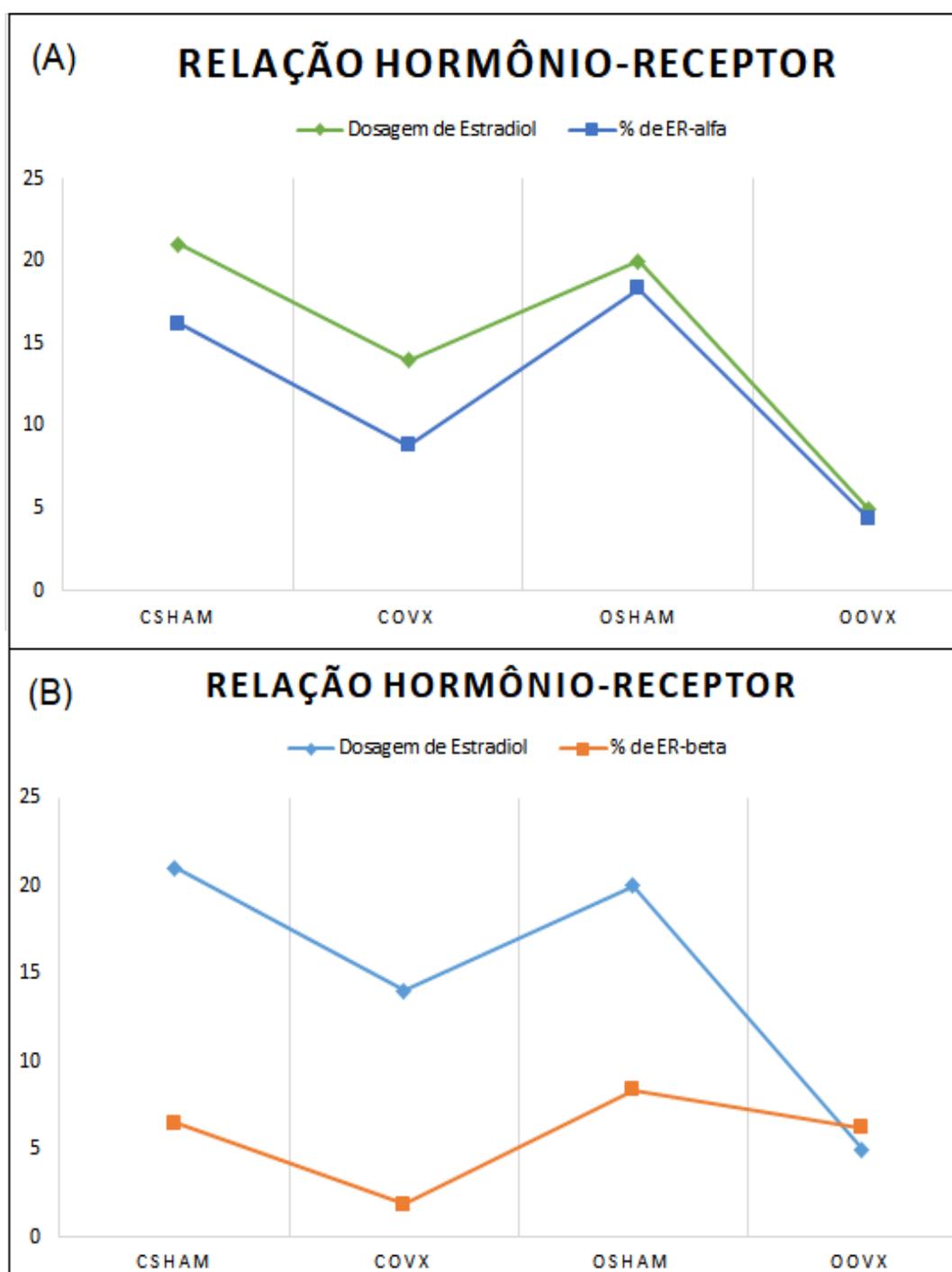
LEGENDA: (A) Csham; (B) COvx; (C) Osham; (D) OOVx. As setas azuis indicam algumas marcações de ER $\beta$  no grupo controle. As setas vermelhas indicam algumas marcações de ER $\beta$  no grupo obeso.

FONTE: Da autora.

## 6.8 RELAÇÕES ENTRE HORMÔNIOS E RECEPTORES

Nos gráficos que relacionam dois fatores nos permite evidenciar a existência de uma relação entre os pontos. Com o gráfico de relação entre a dosagem de estradiol no plasma sanguíneo dos grupos Csham, COvx, Osham e OOVx, e a porcentagem da expressão relativa dos ER $\alpha$  e ER $\beta$ , conseguimos identificar uma relação hormônio-receptor dependente, ou seja, quando submetemos os grupos COvx e OOVx a cirurgia de remoção dos ovários, levando assim uma redução significativa dos níveis séricos de estradiol e por consequência uma redução de ER $\alpha$  e ER $\beta$ .

FIGURA 25– Relação entre a dosagem de Estradiol e a % encontrada na imunohistoquímica.



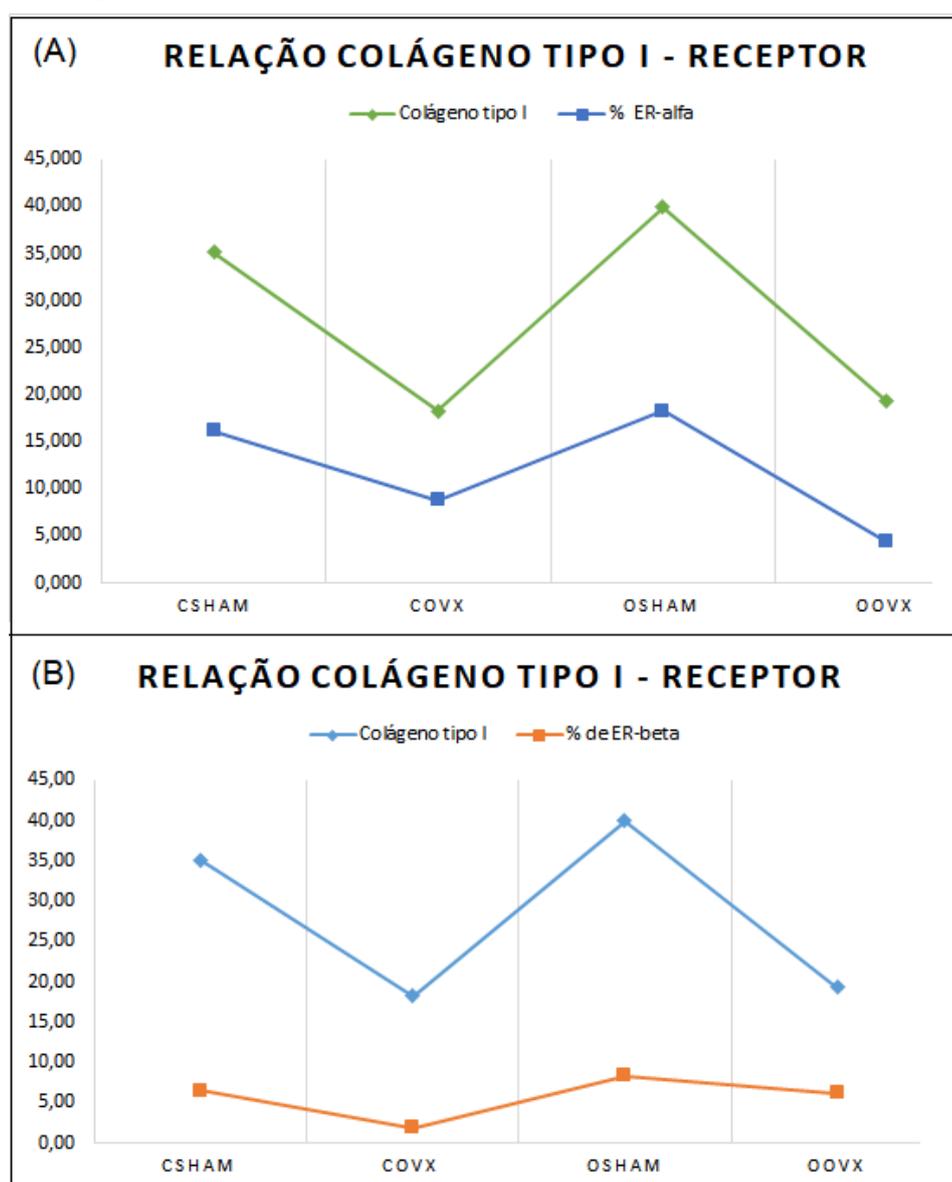
LEGENDA: (A) Relação estradiol-ER $\alpha$  e (B) Relação estradiol-ER $\beta$ . Csham – controle falso operado, COVx – controle ovariectomizado, Osham – obeso falso operado e OOVx – obeso ovariectomizado.

FONTE: Autora.

## 6.9 RELAÇÃO COLÁGENO TIPO I - RECEPTORES

A figura 27 revela a relação entre o colágeno tipo I dos grupos Csham, COVx, Osham e OOVx e a expressão relativa dos ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Como dito anteriormente após a ovariectomia nos grupos COVx e OOVx, existe uma redução da expressão relativa de ambos ERs e a redução de colágeno tipo I nesses mesmos grupos. Sendo assim, podemos induzir sobre a existência de uma relação entre as expressões relativas de ERs com a deposição/produção de colágeno total nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos.

FIGURA 26– Relação entre o colágeno tipo I encontrado no ensaio com picrosirius e a % encontrada na imunohistoquímica



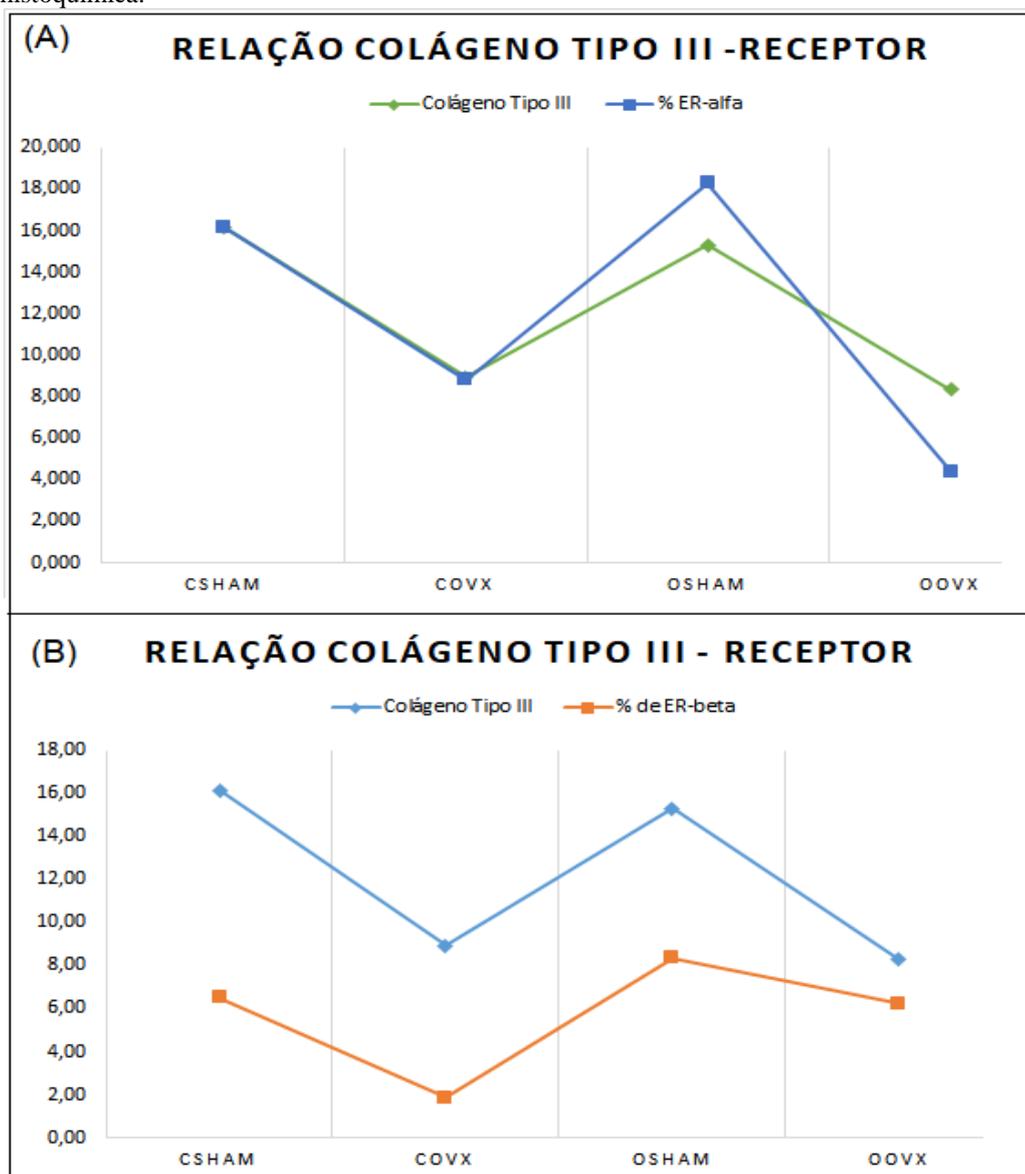
LEGENDA: (A) Relação colágeno tipo III-ER $\alpha$  e (B) Relação colágeno tipo III-ER $\beta$ .

FONTE: Da autora

## 6.10 RELAÇÃO COLÁGENO TIPO III - RECEPTORES

A figura 28 revela a relação entre o colágeno tipo III dos grupos Csham, COVx, Osham e OOVx e a expressão relativa dos ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Como dito anteriormente após a ovariectomia nos grupos COVx e OOVx, existe uma redução da expressão relativa de ambos ERs e a redução de colágeno tipo III nesses mesmos grupos. Sendo assim, podemos induzir sobre a existência de uma relação entre as expressões relativas de ERs com a deposição/produção de colágeno total nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos.

FIGURA 27– Relação entre o colágeno tipo III encontrado no ensaio com picrossírius e a % encontrada na imunohistoquímica.



LEGENDA: (A) Relação colágeno tipo III-ER $\alpha$  e (B) Relação colágeno tipo III-ER $\beta$ .

FONTE: Da autora

## 7 DISCUSSÃO

A relação entre obesidade e hormônios sexuais ainda não é muito conhecida, principalmente sobre a influência destes na função pulmonar. Estudos têm mostrado que os hormônios sexuais exercem um papel fundamental no pulmão, porém eles têm se mostrado contraditórios (TOWNSEND, 2012; VERMA, 2011). A maioria dos estudos consideram apenas uma alteração com grande relevância, tais como, desenvolvimento pulmonar, inflamação e câncer (SIEGFRIED, 2014), no entanto nenhum estudo relaciona a obesidade e os hormônios sexuais femininos, com o olhar voltado à compreensão desses na função pulmonar.

Dentre os métodos de indução da obesidade, o método de redução de ninhada é um dos mais descritos na literatura. Uma vez que induzem a obesidade pelo aumento do potencial lactotrófico e diminui a disputa pelo leite materno, gerando assim, uma superalimentação pós-natal precoce, que leva os animais na idade adulta a um aumento significativo do peso corporal. Sendo assim, nossos resultados corroboram os achados de outros pesquisadores ao salientar que o método de ninhada reduzida é eficiente para a indução da obesidade, tal modo que o grupo Osham apresentou um aumento significativo da massa corpórea e de gordura abdominal (RADIJA et al. 2010; SCHMIDT et al. 2001; MORRIS; VELKOSKA; COLE, 2005). Além do aumento de massa corpórea e de gordura abdominal, o perfil bioquímico aumentado para glicose e triglicérides encontrado nos animais obesos está de acordo com a classificação para o desenvolvimento de síndrome metabólica, dado que o aumento glicose e dos triglicérides acima do normal é um indicativo do desenvolvimento de diabetes do tipo 2 e de aterosclerose (WEISS e SHORE, 2004; LI; BOWERMAN; HEBER, 2005).

Em camundongos fêmeas, o ciclo reprodutivo é de curta duração (4 a 5 dias) e se caracteriza por quatro fases marcantes, proestro, estro, metaestro e diestro, com características morfológicas celulares distintos, identificáveis no esfregaço vaginal (GOLDMAN et al., 2007). Portanto constituem bom modelo para investigação de mudança do perfil hormonal. Gimenes Júnior (2013), demonstrou em seu trabalho que não há diferença estatística nos níveis séricos de estradiol nas fases que antecedem o diestro, deste modo não houve a necessidade de verificar em qual fase do ciclo nossas fêmeas dos grupos Csham e Osham estavam. A cirurgia de OVX induz a fase constante de diestro, através da redução significantes dos níveis séricos de estradiol e progesterona e é um dos métodos mais simples de induzir a menopausa em camundongos, uma vez que esses animais não passam pela menopausa (DE OLIVEIRA et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004;

RIFFO-VASQUEZ et al., 2007). Neste sentido, realizamos a OVX e após 21 dias do procedimento cirúrgico, confirmamos o sucesso da cirurgia por meio da análise dos níveis séricos encontrados no plasma sanguíneo em nossos animais, de modo que os níveis hormonais encontrados em nossos grupos OVX são significativamente reduzidos quando comparados ao seu respectivo grupo sham. Entretanto, podemos notar que com a indução da menopausa os níveis hormonais são mais altos em camundongos fêmeas obesas do que em não obesas, apoiando os achados por Freeman et al (2010), que mostrou que em mulheres após a menopausa, os níveis de progesterona foram mais baixos no geral, embora mais altos em mulheres obesas do que em não obesas (21 vs 12 pg / ml, sem sobreposição no IC95%). Deste modo, podemos dizer que o aumento de peso após a OVX, sendo ele dos animais controles ou obesos, corroboram os resultados encontrados por outros pesquisadores de que os baixos níveis de estrogênio, leva ao aumento peso corporal e glicemia basal (BAILEY e AHMED-SOROUR, 1980). Um estudo feito em camundongos fêmeas que induziram a depleção de estradiol por animais knockout para ER e/ou pela OVX e posteriormente aplicaram estradiol exógeno, demonstraram que os estrogênios regulam o metabolismo da glicose e dos lipídios. A deficiência de estrogênio promove uma disfunção no metabolismo que predisponente à obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2. Além disso, foi demonstrado em roedores que a aromatase, a principal enzima da produção de estrogênio, é uma das principais razões para que os camundongos knockout (ArKO) exibirem resistência à insulina, tolerância à glicose diminuída e aumento da gordura abdominal (JONES, et al. 2000). Dessa maneira, a ausência dos hormônios sexuais torna as fêmeas do grupo OVX, susceptíveis ao ganho peso (HONG, et al. 2009 e STUBBINS, et al. 2012).

Em algumas patologias, tal como a obesidade pode provocar a inflamação do parênquima pulmonar pode gerando alterações significativa na sua microestrutura, ou seja, estas alterações estruturais provocadas pela inflamação no parênquima pulmonar alteram, também, a mecânica ventilatória e, por consequência, o funcionamento do sistema respiratório de modo geral. Com o intuito de se investigar mais sobre essas patologias que causam alterações estruturais no parênquima pulmonar e por consequência na mecânica ventilatória inventou-se diversos ventiladores mecânicos, por meio de um conjunto de fisiologistas com os modelos matemáticos para auxiliar na compreensão e na busca de dados que permitam entender com propriedade a função pulmonar.

O flexiVent (SCIREQ®) é um desses ventiladores mecânicos criados para avaliar a função pulmonar e é muito utilizado na prática experimental, ou seja, ele é muito utilizado nos laboratórios de pesquisa de base. Este equipamento é utilizado principalmente para medir

a Raw e E em pequenos animais in vivo, frente a diferentes concentrações de MCh. O flexi-Vent injeta no pulmão do animal um volume de ar atmosférico conhecido, esse volume injetado gera uma pressão e essa pressão é processada pelo ventilador por meio de um transdutor. Em seguida, com a pressão e volume conhecidos, são obtidos os valores de Raw e E. Raw pode ser definida como a capacidade do sistema condutor de gás e dos tecidos em resistir ao fluxo aéreo (BATES, 2009). E é a força de recolhimento elástico do tecido pulmonar de retornar à sua forma original após ter sido “deformado” por uma força; é a variação da pressão pelo volume mobilizado ( $\Delta P/\Delta V$ ) (BATES, 2009, MORIYA, 2003). Na prática clínica, o termo elastância é geralmente substituído pelo seu recíproco matemático, a complacência:  $E = \Delta P/\Delta V = 1/C$  onde E é a elastância do sistema respiratório,  $\Delta P$  é a variação de pressão,  $\Delta V$  é a variação do volume e C é a complacência do sistema respiratório. Após o registro das medidas basais, realiza-se diferentes testes provocação utilizando substâncias que promovem alterações na mecânica ventilatória, tais como a MCh e Salb.

A MCh é um broncoconstritor que promove a contração muscular pela ação em receptores colinérgicos muscarínicos (M1, M2 e M3). Sly et al (1995) demonstraram por meio de um experimento que utilizou cães filhotes, que o subtipo M3 localizados na musculatura lisa das vias aéreas, são alcançados mais facilmente pela MCh quando oferecida via endovenoso em relação a administração de MCh pela via inalatória. Os autores sugerem que pela via inalatória, a MCh precisa antes ser difundida pelo epitélio respiratório para então alcançar o receptor. O subtipo M1 é localizado no parênquima pulmonar (alvéolos) e são mais facilmente alcançados pela MCh na forma inalada e seriam eles os principais responsáveis pela resposta contrátil do parênquima pulmonar.

O Salb. que é um broncodilatador  $\beta_2$ -adrenérgico de curta duração, os receptores  $\beta$  adrenérgicos são divididos em 3 subtipos,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , sendo que o  $\beta_2$  modula o relaxamento da musculatura lisa vascular e do sistema respiratório (LYNCH e RYALL, 2008). Deste modo o Salb. pode ser utilizado para relaxar a musculatura lisa e melhorar a função pulmonar, quando há hiper-responsividade brônquica demonstrada por testes de broncoprovocação (WEINBERGER, 2002; HALFHIDE; EVANS; COURIEL, 2005).

As medidas realizadas pelo flexVent foram posteriormente analisadas e dentre essas medidas destacamos as alterações obtidas nos parâmetros de  $R_{tot}$ , Raw, C, E,  $\eta$ . Esses parâmetros serão discutidos de uma maneira associada, relacionando os resultados adquirido pelos grupos.

Os parâmetros de  $R_{tot}$  e Raw nas fêmeas Csham e COVx não apresentaram diferença estatística quando comparadas um com o outro. O grupo Osham apresenta níveis aumentados

após a nebulização de MCh nos parâmetros de  $R_{tot}$  e  $R_{aw}$ , no entanto apresentam uma redução em  $C$ . Estas alterações já eram esperadas, uma vez que esses dados foram apresentados por outros pesquisadores. Esses pesquisadores estabeleceram que essas alterações encontradas  $R_{tot}$  e  $R_{aw}$ , na mecânica ventilatória são causadas pela obesidade. A redução de  $C$  além de estar relacionada com da obesidade, pode também estar relacionada com a caixa torácica. Eles explicam, em parte, as reduções na  $C$  da parede torácica, na força muscular respiratória, no tamanho das vias aéreas periféricas, função e volumes pulmonares encontradas em indivíduos obesos e que podem conduzir a maior resistência das vias aéreas durante a respiração corrente (MCCLEAN et al., 2008; FARAH et al., 2011).

As alterações em  $R_{aw}$  (aumento) e  $C$  (redução) não é encontrada no grupo OOVx, pelo contrário, no grupo OOVx,  $R_{aw}$  e  $C$  são semelhantes aos do grupo controle ( $C_{sham}$  e/ou  $COVx$ ). Podemos sugerir nesse ponto que essa alteração ocorreu devido à ausência dos HSF, ou seja, a presença dos HSF na obesidade é prejudicial para a função pulmonar, uma vez que, na sua ausência, não houve resposta exacerbada na hiperresponsividade das vias aéreas ao teste com MCh.

Entretanto, os HSF em algumas doenças pulmonares, como a asma, têm função protetiva durante os anos reprodutivos. Contudo, quando se inicia a menopausa ou a pós-menopausa esse efeito é oposto, como visto por Troisi et al. (1995) que descreveram que mulheres na pós-menopausa têm um risco diminuído de desenvolver asma de novo, em comparação com as mulheres na pré-menopausa da mesma idade. Embora esses dados voltem a sugerir um papel dos esteroides sexuais nas alterações das exacerbações e gravidade da asma no momento da menopausa, como na gravidez, um simples papel deletério versus protetor dos esteroides sexuais femininos não pode ser facilmente atribuído (TOWNSEND, 2012).

Melgert et al. (2005) foram um dos primeiros a apontarem o comportamento contraditório dos HSF, por meio de experimentos com camundongos fêmeas, descobriram que as fêmeas são mais suscetíveis à doença das vias aéreas (por exemplo, induzidas por sensibilização e desafio à ovalbumina) quando comparadas aos machos, desse modo as fêmeas apresentam níveis mais altos de IgE, maior inflamação bronquiolar e resistência relativa ao glicocorticoide (CORTELING; TRIFILIEFF, 2004; SEYMOUR et al., 2002; HAYASHI; et al., 2003). Nestes modelos animais, os andrógenos parecem ter um papel protetor, sendo o estradiol pró-inflamatórios. Por exemplo, a castração no sexo masculino agrava a doença (HAYASHI; et al., 2003), enquanto a ovariectomia ou bloqueio do receptor de estrogênio (ER) nas mulheres a alivia (revertida por estradiols exógenos) (LIGEIRO DE OLIVEIRA, 2004).

Deste modo podemos sugerir que a ausência ou a presença dos HSF só é prejudicial ou benéfica quando se tem uma doença pré-existente, como por exemplo a obesidade. Townsend (2012) corrobora a nossa suposição, uma vez que, a ação dos HSF pode ser prejudicial ou benéfica quando se tem uma doença pré-existente citando doenças que afetam o sistema respiratório, tal como a asma, rinite alérgica, atopia, DPOC, FC, entre outras. Sendo assim, a ausência dos HSF na obesidade tem função protetiva para o sistema respiratório.

O parâmetro que analisa E apresentou o mesmo padrão de resposta ao da  $R_{tot}$ , com exceção do grupo COVx. Este grupo, quando comparado ao Csham, apresenta uma tendência na redução de E, ou seja, o grupo COVx expressa maior rigidez no tecido pulmonar quando comparado ao seu grupo controle. Esse resultado encontrado na mecânica ventilatória corrobora os dados encontrados na imunohistoquímica, no qual, houve uma redução na expressão relativa de ambas as isoformas de ERs. Essa tendência na redução de E, pode estar ligada diretamente com a função de  $ER\beta$  no pulmão, de modo que a redução na expressão relativa de  $ER\beta$  ativo, pode provocar uma redução no recuo do tecido elástico pulmonar. Massaro et al. (2004) em experimentos com camundongos fêmeas knockout para  $ER\beta$ , ou seja, esses camundongos fêmeas não apresentam o gene que codifica o  $ER\beta$ , obteve resultados semelhantes aos nossos. Além disso, os autores relacionaram em camundongos fêmeas knockout para  $ER\beta$ , o recuo do tecido elástico e a massa corpórea destes camundongos. Massaro et al. (2006) demonstraram por meio de experimentos em camundongos fêmeas knockout para  $ER\beta$  com 8 semanas, que esses animais possuem massa corpórea menor quando comparados ao seu grupo naive, ou quando é comparado ao grupo de camundongos fêmeas knockout para  $ER\alpha$ . No entanto, esse estudo contradiz parcialmente o que encontramos ao avaliarmos a massa corpórea dos nossos animais, podendo isso ocorrer devido a diferença de idade dos nossos camundongos no momento da experimentação, ou ao fato de que nossos camundongos COVx apresentam também uma diminuição dos  $ER\alpha$ , e como Massaro et al. (2006) afirma em seu trabalho que camundongos fêmeas knockout para  $ER\alpha$  demonstraram um ganho de peso quando comparados ao seu grupo naive e ao grupo knockout para  $ER\beta$ . Sendo assim, podemos induzir que aumento de peso dos nossos animais COVx deve-se a idade a qual eles foram manipulados e a redução do  $ER\alpha$ .

O parâmetro da histeresividade ( $\eta$ ) não é muito estudado, ele indica a razão de energia dissipada por ciclo em relação à armazenada (NAGASE; LUDWIG, 1998), ou seja, ela é calculada a partir da relação entre  $G_{tis}$  e  $H_{tis}$ , e seu valor aumenta à medida que o pulmão se torna mecanicamente heterogêneo. Assim, a histeresividade pode ser usada como indicativo

dessas heterogeneidades ventilatórias; além disso ela está diretamente relacionada aos componentes da matriz extracelular (SERRA, 2013; ROCCO, 2003).

Podemos observar nos nossos resultados que  $\eta$  apresenta uma redução significativa nas comparações entre Csham com COvx ( $p < 0,01$ ) e entre Osham com OOVx ( $p < 0,05$ ). Esse dado encontrado no faz sugerir que com redução expressiva dos HSF por meio da OVX há redução da heterogeneidade na ventilação, sendo esse um resultado positivo. Uma vez que a heterogeneidade ventilatória é causada por diversos fatores diferentes, por exemplo, colapso e superdistensão dos alvéolos, distorção dos alvéolos patente, edema, inflamação com infiltração de neutrófilos e células mononucleares e alterações no conteúdo de colágeno e fibra elástica (ROCCO, 2003).

O processo de remodelamento pulmonar envolve um constante processo de reparo e regeneração das estruturas da parede das vias aéreas e parece contribuir significativamente para a perda de função pulmonar, principalmente em pacientes com asma grave (IN'T VEEN; et al., 2000). Qualquer alteração na parede alveolar é provavelmente consequência da mudança na composição de colágeno do tecido (LANG et al., 1994). Em estudos anteriores no laboratório, foi observado pelo Western Blot do tecido pulmonar de camundongos machos, aumento da deposição de fibras colágenas pulmonares (TEIXEIRA, 2014). Neste trabalho, observamos um aumento da deposição de fibras colágenas pulmonares do tipo I nos animais obesos de ninhada reduzida (Osham), corroborando os dados de Teixeira et al. (2014) com seu trabalho em camundongos machos. Teixeira et al. (2014) também sugere um maior remodelamento pulmonar periférico nos animais obesos por ninhada reduzida, provavelmente decorrente de inflamação, pois as citocinas liberadas podem estimular a produção de fibras elásticas e de colágeno I por miofibroblastos e por outros mecanismos como desequilíbrio na síntese e degradação na matriz extracelular. As alterações encontradas na quantificação de fibras colágenas tipo I nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos em nosso estudo corrobora os achados de Teixeira et al. 2014 e os de Rocco et al. (2003). Estes últimos autores demonstraram, em camundongos machos que sofreram de lesão pulmonar aguda, alteração nos componentes da matriz extracelular e consequentes alterações na mecânica ventilatória. Desta forma, a relação entre o colágeno e a mecânica ventilatória existe também em camundongos fêmeas obesas.

Após a cirurgia de OVX notamos redução na quantidade de fibras colágenas. Essa redução ocorreu em ambos os grupos OVX (COVx e OOVx) e, portanto, nos leva a sugerir que a síntese/deposição/degradação de fibras colágenas pode ter como ator coadjuvante os hormônios sexuais, uma vez que, na sua ausência a quantidade de colágeno reduz ( $p < 0,01$ ).

No entanto, a redução de fibras colágenas no grupo OOVx pode ser apontada como benéfica a esse grupo, dado que, como visto anteriormente, o aumento de colágeno no grupo Osham é prejudicial para funcionalidade respiratória, pois provoca um maior remodelamento pulmonar. Deste modo, com a redução significativa dos HSF esse remodelamento não acontece. Como dissemos anteriormente, os HSF são contraditórios, uma hora tem comportamento protetivo, como vimos no nosso grupo COVx, visto que na sua ausência houve uma piora na mecânica ventilatória.

No grupo OOVx o qual passou pela indução da obesidade, o comportamento dos HSF é oposto ao encontrado no grupo COVx, ou seja, a sua ausência é benéfica, posto que na sua ausência houve uma melhora da mecânica ventilatória. Rizk et al. (2007) correlacionou os HSF com o tecido conjuntivo periuretral feminino e a capacidade desses hormônios para induzir alterações estruturais ou funcionais em componentes individuais, por exemplo o colágeno I e III presente nos vasos sanguíneos periuretrais. Foram verificadas evidências para o envolvimento de estrogênio e / ou progesterona no controle urinário, pois na sua ausência deste os camundongos fêmeas desenvolveram o quadro de incontinência urinária, demonstrando mais uma vez o papel contraditório dos ERs na fisiologia feminina.

A expressão relativa de ERs encontrada em nossos resultados está de acordo com o visto pela literatura. As isoformas ER $\alpha$  ER $\beta$  são encontradas no pulmão, sendo que a isoforma ER $\alpha$  é abundante quando comparado a ER $\beta$  (LUBAHN, 1993; KREGGE, 1998). Nossos resultados também apontam que não existe uma diferença significativa entre o grupo Csham e Osham na expressão relativa de ambas isoformas, demonstrando assim que a obesidade não altera a expressão relativa de ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos pulmões. Após a cirurgia de OVX, nossos camundongos fêmeas demonstraram uma redução na expressão relativa de ambas as isoformas ativas. A redução de ER $\alpha$  está relacionada ao aumento de peso, já a redução de ER $\beta$  está relacionada com a manutenção do peso (MASSARO; MASSARO, 2004). Sendo assim, podemos relacionar o aumento de peso dos animais do grupo COVx com a redução de ER $\alpha$ , porém esse aumento de peso não foi tão significativo devido à redução de ER $\beta$ , mantendo assim, um equilíbrio no peso de COVx quando comparado ao grupo OOVx. Entretanto, a quantidade de ER $\beta$  do grupo OOVx é significativamente maior quando comparamos com o grupo COVx ( $p < 0,0001$ ) e tais resultados faz acreditar que haja relação entre o aumento expressivo do peso do grupo OOVx e a expressão relativa de ER $\beta$ . Apesar da expressão relativa de ER $\beta$  estar diminuída em comparação ao grupo Osham, não está nem próximo da expressão relativa de ER $\beta$ , quando comparamos os grupos Csham vs. COVx.

O gráfico da relação da dosagem sérica de estradiol e expressão relativa de ERs indicou ser esta relação hormônio-receptor dependente. Uma vez que, após a OVX existe uma redução drástica da dosagem sérica de estradiol e por consequência uma diminuição proporcional na expressão relativa de ambos os ERs. Sendo assim, redução do estradiol na corrente sanguínea provoca uma diminuição na expressão relativa de ambas as isoformas de ER ativas.

Aparentemente o ER $\alpha$  se relaciona diretamente com a deposição de colágeno tipo I nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos, visto que após a OVX diminui a deposição de colágeno tipo I e a expressão relativa de ER $\alpha$  ativo no tecido pulmonar. É observado também, no gráfico de relação entre ER $\beta$  e a deposição de colágeno tipo I uma redução, porém ele não evidencia uma clara relação entre o ER $\beta$  e a deposição de colágeno tipo I. Esses dados encontrados, nos fazem sugerir que existe uma relação direta e proporcional entre somente entre colágeno tipo I e ER $\alpha$ .

O gráfico que relaciona a deposição de colágeno tipo III nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos com a expressão relativa de ER $\beta$  ativo demonstra uma relação entre esses dois fatores. Deste modo, sugerimos que existe uma relação entre a deposição de colágeno tipo III e a expressão relativa de ER $\beta$  ativo, dado que eles apresentam comportamento diretamente proporcional um ao outro. Portanto, podemos dizer que os gráficos de relação ilustram bem a hipótese de que a expressão relativa de ERs pode estar relacionada com a dosagem sérica de estradiol, o peso dos animais, com a mecânica ventilatória e com colágeno.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados discutidos nos levam as conclusões:

- Os resultados da mecânica ventilatória revelaram que a obesidade em fêmeas de camundongos *Swiss* altera os parâmetros ventilatório, tais como  $R_{tot}$ ,  $R_{aw}$  e a histeresividade, principalmente no teste provocativo de broncoconstrição, indicando que a obesidade provoca uma hiperresponsividade pulmonar. No entanto, os animais obesos ovariectomizados não manifestaram esse comportamento no teste provocativo de broncoconstrição e broncodilatação. Tais resultados nos levam a sugerir que os hormônios sexuais femininos alteram os parâmetros encontrados na mecânica ventilatória ( $R_{tot}$  e  $R_{aw}$ ), interferindo diretamente nos receptores muscarínicos e  $\beta$  adrenérgicos ou nas suas ações.
- Salientamos que a obesidade interfere na secreção/degradação de colágeno do tipo I e total resultando em aumento dos mesmos. No entanto, nos animais obesos ovariectomizados apresentaram o mesmo padrão encontrado no grupo *Csham* ou seja, os animais obesos ovariectomizados demonstram uma redução na secreção/degradação de colágeno tipo I. Essa redução nos leva a sugerir que o modo como a secreção/degradação de colágeno no pulmão ocorre pode estar relacionado com a quantidade de estradiol no plasma sanguíneo e na expressão de  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ . Deste modo, constatamos a existência entre o colágeno tipo I com a expressão  $ER\alpha$  e entre o colágeno tipo III com a expressão de  $ER\beta$ . Ainda, a quantificação de  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  revelou uma relação entre os receptores de estradiol e o seu nível hormonal plasmático, ou seja, uma relação hormônio receptor-dependente.

Finalmente, sendo assim, podemos concluir que existe uma relação entre a obesidade e os hormônios sexuais femininos, especificamente o estradiol, com o sistema respiratório e que esses dois fatores exercem uma influência sobre a função pulmonar.

## REFERÊNCIAS

- BAILEY, C.J., AHMED-SOROUR, H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 19, p.475. 1980.
- BATES, J.H.T.; ALLEN, G.B. The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. **Ann of Biom Eng**, v. 34, n. 3, p.384-392, 2006.
- BATES, J. H. T. et al. Measurements of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 488-492, 1989.
- BATES, J.H.T. Lung mechanics. **An Inverse Modeling Approach**. New York: Cambridge, p. 220, 2009.
- BEHR, G.A; SCHNORR, C. E; MOREIRA, J.C. Increased blood oxidative stress in experimental menopause rat model: the effects of vitamin A low-dose supplementation upon antioxidant status in bilateral ovariectomized rat. **Fundam Clin Pharmacol**. v.26, p. 235-249, 2012a.
- BEHR, G.A; SCHONORR. C.E; SIMÕES-PIRES, A; LOSBÔA, L; e FREY, B.N. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. **Fundam Clin Pharmacol**. v.26, p. 235-249, 2012b.
- BENTO, A. M; HERSHENSON, M. B. Airway remodeling: potential contributions of sub-epithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. **Allergy Asthma Proc**, v. 19, p. 353-358, 1998.
- BERNARDIS, L. L; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, p.527-528, 1968.
- BEYNON, H. L. C; GARBETT, N. D; BARNES, P. J. Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone. **The Lancet**, v.13, p.370-371, 1988.
- BLEASE, K. et al. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. **Respir Res**, v.1, p. 54-61, 2000.
- BOLOGNIA, J.L. Aging skin. **The American Journal of Medicine**, v.98, p. 99-103, 1995.
- BONDS, R.S; MIDORO-HORIUTI, T. Estrogen effects in allergy and asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 13, n.1, p.92–99, 2013. doi:10.1097/ACI.0b013e32835a6dd6.
- BRINTON, R.D. Investigative models for determining hormone therapy-induced outcomes in brain: evidence in support of a healthy cell bias of estrogen action. **Ann NY Acad Sci**, v.1052, p.57–74, 2005.
- BROWN, R.E; et al. Mechanical connections between elastin and collagen. **Connect. Tissue Res**. v. 30, p. 295–308, 1994.

CALLE, E.E; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 579-591, 2004.  
**Care Med**, v. 169, p. 963-968, 2004.

CAREY M. A; et al. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 293, p. 272-278, 2007.

CASTILLO, C; et al.. Effects of ovariectomy and growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. **Biogerontology**, v.6, n.1, p. 49-60, 2005.

CASTILLO, C; et al. Effect of isoflavone administration on age-related hepatocyte changes in old ovariectomized female Wistar rats. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 13, n.7, p. 468-476, 2006.

CHAKIR, J; et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 6, p. 1293 - 1298, 2003.

CHEN, B. et al. Tidal breathing pattern differentially antagonizes bronchoconstriction in C57BL/6J vs. A/J mice. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 249-255, 2006.

CHOI, M.S; et al. Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF- $\beta$  signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB irradiated human fibroblast. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, p. 127-137, 2007.

COOK, M.J. The Anatomy of the Laboratory Mouse. **Elsevier**, p.143, 1965.

CORTELING, R; TRIFILIEFF, A. Gender comparison in a murine model of allergen-driven airway inflammation and the response to budesonide treatment. **BMC Pharmacology**, v.4, n.3, 2004.

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

DE OLIVEIRA, A.P; et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung e-selectin in rat. **Respiratory Research**, v. 11, 2010.

DEECHER, D; ANDREE, T.H, SLOAN, D; SCHECHTER, L.E. From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experience hormonal changes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 3-17, 2008.

DELGADO, J; BARRANCO, P; QUIRCE, S. Obesity and asthma. **J Invest Allergol Clin Immunol**, v. 18, n. 6, p. 420-425, 2008.

- DENNERSTEIN, L; et al. Mood and the menopausal transition. **J Nerv Ment Dis**, v. 187, p. 685-691, 2000.
- EVANS, W. J. Exercise, nutrition and aging. **Journal of nutrition**, v. 122, p. 796-801, 1992.
- FARAH, C. S. et al. Obesity Is a Determinant of Asthma Control Independent of Inflammation and Lung Mechanics. **Chest**, v. 140, n. 3, p. 659-666, 2011.
- FINCH, C.E; FELICIO, L.S; MOBBS, C.V; NELSON. J.F. Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. **Endocr Rev**, v. 5, p. 467-497, 1984.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 216-229, 2006.
- FORMIGUERA, X.; CANTON, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, p. 1125-1146, 2004.
- FRANSSEN, F. M. E. et al. Obesity and the lung: 5 Obesity and COPD. **Thorax** v. 63, p. 1110-1117, 2008.
- FRASER, R.S. Histology and Gross Anatomy of the Respiratory Tract. In: HAMID, Q; et al. Symptoms associated with menopausal transition and reproductive hormones in midlife. **Obstet Gynecol**, v.110, p. 230-240, 2007.
- FUENTES, N., SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol** . v. 116, p.135-170, 2019. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.0001.
- FUQUA S. A; et al. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 59, p. 5425-5428, 1999.
- GERMAIN, P; et al. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 685-704, 2006.
- GIBBS, C.J; et al.. Premenstrual exacerbation of asthma. **Thorax**, v.39, p.833-836, 1984.
- GIMENES JÚNIOR, J.A. **Papel dos hormônios sexuais femininos na inflamação pulmonar aguda e na reatividade das vias aéreas após intilação nasal de LPS em camundongos**. 2013. Tese (Doutorado pelo Instituto de Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo,, 2013.
- GOLDMAN, J.M., MURR, A.S., COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth defects research. Pat B. **Developmental and reproductive toxicology**, v.80, p. 84-97, 2007.
- GOMEZ-LLORENTE M. A; et al. Obesity and Asthma: A Missing Link. **Int J Mol Sci**, v.7, n.18, p.1490, 2017.

GRAZIOTTIN, A; SERAFINI, A. Depression and the menopause: why antidepressants are not enough? **Menopause Int.**, v. 15, p. 76-81, 2009.

GU, J. –W; et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 10, p. 910-917, 2011.

GUSTAFSSON, J. Å. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p. 5925–5930, 1996.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed. 11, 2006.

HALFHIDE, C.; EVANS, H. J.; COURIEL, J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, 2005.

HALL, J.M., MCDONNELL, D.P. The Estrogen Receptor  $\beta$ -Isoform (ER $\beta$ ) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER $\alpha$  Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. **Endocrinology**. v.140, n.12, p. 5566–5578, 1999.

HANTOS, Z., et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 168–178, 1992.

HAYASHI, T; et al. Less Sensitivity for Airway Inflammation in Males than Females in BLAB/c Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, n.6, p.563-567, 2003.

HILL, J.O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocr Ver**. v. 27, n. 7, p. 750-761, 2006.

HONG, J; et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, v.8, n.11, p.1-5, 2009.

HOYER, P.B; et al. Mechanisms of ovotoxicity induced by environmental chemicals: 4-vinylcyclohexene diepoxide as a model chemical. **Adv Exp Med Biol**, v. 500, p. 73–81, 2001.

HUSSAN, F; et al. Curcumin Protects against Ovariectomy-Induced Bone Changes in Rat Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, p.1-7, 2012.

INT'VEEN, J. C. et al. Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 1902–1906, 2000.

JARVIS, D., LEYNAERT, B. The association of asthma, atopy and lung function with hormone replacement therapy and surgical cessation of menstruation in a population-based sample of English women. **Allergy**, v.63, p.95–102, 2008.

JENSEN, E.V; et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 59, p.632-638,1968.

- JONES, M.E; et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, n.23, p.12735-12740, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C; COSSERMELLI, W; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v. 41, p.267–274, 1978.
- KAMPA M; et al. The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer? **Hormones (Athens)**, v. 12, n.1, p. 69–85, 2013.
- KIELTY, C.M.; SHERRATT, M.J.; SHUTTLEWORTH, C.A. Elastic fibres. **J. Cell Sci.** v. 115, p. 2817–2828, 2002.
- KOEHLER K. F; et al. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. **Endocr Rev**, v. 26, p. 465-478, 2005.
- KOENIG, S. M. Pulmonary complications of obesity. **Am J Med Sci**, v. 321, p. 249–279, 2001.
- KREGE J. H; et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 15677–15682, 1998.
- KUIPER, G. G. J. M; et al. The effects of estrogen on pulmonary artery vasoreactivity and hypoxic pulmonary vasoconstriction: Potential new clinical implications for an old hormone. **Crit Care Med**, v.36, n.7, p.2174-2183, 2008.
- LANG, M.R; et al. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and nonemphysematous lungs. **Thorax**, v. 49, p. 319-326, 1994.
- LAPA, M. S; JÚNIOR, R. R; FISS, E. Bronchial hyperresponsiveness in patients with gastroesophageal reflux disease. **J Bras Pneumol**, v.31, ed.4, p.286-91, 2005.
- LASOTA A; DANOWSKA-KLONOWSKA D. Experimental osteoporosis – different methods of ovariectomy in female white rats. **Rocz Akad Med Bialymst**, v.49, n. 1, p.129–131, 2004.
- LEAN, M; LARA, J; HILL, J. O. ABC of obesity: Strategies for preventing obesity. **BMJ**, v. 333, p. 959–962, 2006.
- LEENERS, B; GEARY, N; TOBLER, P.N; ASARIAN L. Ovarian hormones and obesity. **Hum Reprod Update**, v.23, n. 3, p.300–321, 2017.
- LEUNG Y. K; et al. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 13162-13167, 2006.
- LI, Z.; BOWERMAN, S.; HEBER, D. Health Ramifications of the Obesity Epidemic. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 85, n. 4, p. 681-701, 2005.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P; et al. Regulation of allergic lung inflammation in the rats: interaction between estradiol and corticosterone. **Neuroimmunomodulation**, v.11, p.20-27, 2004.

LIZCANO, F; GUZMÁN, G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. **BioMed Research International**, p. 1-11, 2014.

LUBAHN D. B; et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 11162–11166, 1993.

LYNCH, G. S; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 729-767, 2008.

MASSARO D; MASSARO G. D. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, p. 866-870, 2006.

MASSARO D; MASSARO G. D. Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, p. 1154-1159, 2004.

MATSUO, N. et al. A Case of Menstruation Associated Asthma - Treatment With Oral Contraceptives. **CHEST**, v. 116, p. 252–253, 1999.

MCALEXANDER, M. A. et al. Vagotomy reverses established allergen-induced airway hyperreactivity to methacholine in the mouse. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 212–214, p. 20–24, 2015.

MCCLEAN, K. M. et al. Obesity and the lung: 1 Epidemiology. **Thorax**, v. 63, p. 649–654, 2008.

MCKINLAY, S.M., BRAMBILLA, D.J, POSNER, J.G. “Reprint of” The normal menopause. **Maturitas**, v.61, p. 4-16, 2008.

MELGERT, B.N; et al. Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice. **Clin Exp Allergy**, v. 35, p.1496–1503, 2005.

MERCER, R.R; CRAPO, J.D. Distribuição espacial das fibras de colágeno e elastina nos pulmões. **J Appl Physiol**, v. 69, p. 756-765, 1990.

MIQUEL, J; et al. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 42, n. 3, p. 289-306, 2006.

MONTES G.S. Biologia estrutural das fibras dos sistemas colágeno e elástico. **Cell Biol** v.20, p. 15–27,1996.

- MORIYA, H.T. **Contribuições não lineares e aproximação do domínio do tempo do modelo de fase constante na mecânica respiratória em camundongos.** 112f. (Tese). Doutorado em Engenharia Biomédica – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2003.
- MORRIS, M., VELKOSKA, E., COLE, T. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. **Experimental Physiology**, v. 90, n.5, p. 697-702, 2005.
- NAGASE, T.; LUDWIG, M.S. Antigen-induced responses in lung parenchymal strips during sinusoidal oscillation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, n.2, p. 176-181, 1998.
- NAKAMURA, H., KANAI, C., MIZUHIRA, V. An electron stain for elastic fibers using orcein. **J Histochem Cytochem**, v.25, p. 306–308, 1977.
- NEGRI EM, MONTES GS, SALDIVA PHN E CAPPELOZZI VL. Remodelação arquitetônica na doença pulmonar intersticial aguda e crônica: fibrose ou fibroelastose. **Histopathology**, v. 37, p. 393-401, 2000.
- NELSON, D.L., COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry, 6th ed. **Basingstoke: Macmillan Education**, 2013.
- NEZIRI, B. et al. The impact of bilateral vagotomy on the physostigmine-induced airway constriction in ferrets. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 242, p. 102–10, 2017.
- NIELSEN, M.J., KARSDAL, M.A. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin Structure, **Function and Biomarkers**, p. 21-30, 2016.
- OGDEN, C. L. et al. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2087–2102, 2007.
- OHARA, H. et al. Comparison of Quantity and Structures of Hydroxyproline-Containing Peptides in Human Blood after Oral Ingestion of Gelatin Hydrolysates from Different Sources. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 55, p. 1532-1535, 2007.
- PARAMESWARAN, K.; TODD, D. C.; SOTH, M. Altered respiratory physiology in obesity. **Can Respir J**, v. 13, p. 203–210, 2006.
- PAYNE A. H, HALES D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocr Rev**, v. 25, p. 947-970, 2004.
- PEREZ-MARTIN, M; et al. Estradiol and soy extract increase the production of new cell in the dentate gyrus of old rats. **Experimental Gerontology**, v.40, n.5, p.450-453, 2005.
- PHILLIPS, G. B; PINKERNELL, B. H; JING, T. Y. Relationship between serum sex hormones and coronary artery disease in postmenopausal women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, p. 695-701, 1997.

QUTAYBA, H.; JOANNE, S.; JAMES. M. **Physiologic Basis of Respiratory Disease**. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc, 2005.

RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, M. J. Maternal Overnutrition Impacts Offspring Adiposity and Brain Appetite Markers-Modulation By Postweaning iet. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 905-914, 2010.

RAMSEY T. L; et al. Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. **Endocrinology**, v. 145, p. 149-160, 2004.

REAL, F. G. Lung function, respiratory symptoms, and the menopausal transition. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 1, p. 72-80, 2007.

REAL, F.G; et al. Lung function, respiratory symptoms, and the menopausal transition. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n.1, p. 72-80, 2008.

REBER, L. L. et al. A Dissociated Glucocorticoid Receptor Modulator Reduces Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a Mouse Model of Asthma. **J Immunol**, v. 188, n. 7, p. 3478-3487, 2012.

REED SD, SUTTON EL. **Menopause**. ACP Medicine, p. 1-19, 2011.

RIFFO-VASQUEZ, Y; et al. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v.37, p.459-470, 2007.

RIITTA KAARTEENAHO-WIIK; et al. Type I and III collagen protein precursors and mRNA in the developing human lung, **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 1, p. 567-574, 2004.

RITTIÉ L. **Methods Mol Biol**, v.1627, p.287-308, 2017.doi:10.1007/978-1-4939-71138\_19

RIZK, D.E.E., MENSAH-BROWN, E.P., CHANDRANATH, S.I. ET AL. **Urol Res**, v. 31, p. 147; 2007. doi: 0.1007/s00240-003-0306-5

ROCCO P.R.M, et al. Mecânica dos tecidos pulmonares e matriz extracelular na lesão pulmonar aguda. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p. 1067-1071, 2001.

ROCCO, P.R.M, et al. Efeito do corticosteróide na remodelação do parênquima pulmonar em uma fase inicial da lesão pulmonar aguda. **Am J Respir Crit Care Med**, v.168, p. 677-684, 2003.

RUBIN, A. S. et al. Hiperresponsividade brônquica. **J Pneumol**, v.28, n.3, p.101-121, 2002.

SAJI S, et al. Expression of estrogen receptor (ER) (beta) cx protein in ER (alpha) - positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. **Cancer Res**, v. 62, p. 4849-4853, 2002.

SCHMIDT, I. et al. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, p. 1168–1174, 2001.

SERRA, D.S. **Alterações pulmonares e hiper-reatividade brônquica produzidas pela exposição subaguda e subcrônica a gases da exaustão da combustão do glicerol em ratos**. 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas); Centro de Ciências da Saúde; Universidade Estadual do Ceará, 2013.

SEYMOUR, B.W; et al. Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. **Dev Immunol**, v. 9, p. 47–54, 2002.

SHALABY, K. H. et al. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. **Respiratory Research**, v. 11, p. 82, 2010.

SHUESSLER, T.F.; BATES, J.H.T. A computer-controlled research ventilator for a small animals: design and evaluation. **IEE Trans Biomed Eng**, v. 42, p. 860-866, 1995.

SIEGFRIED J. M, Smoking Out Reproductive Hormone Actions in Lung Cancer, **Mol. Cancer Res**, 2014.

SIN, D.D.; JONES, R.L.; MAN, S.F. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. **Arch Intern Med**, v. 162, p. 1477-1481, 2002.

SLY, P.D; et al. Pirenzepine blunts the pulmonary parenchymal response to inhaled methacoline. **Pulmonary pharmacology**, v.8, n.2-3, p. 123-129, 1995.

SPEYER, C. L. et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.288, p.881–890, 2005.

STICE, L.P; et al. Estrogen, agingans the cardiovascular system. **Future Cardiol**, v.5, p. 93-103, 2009.

STUBBINS, R.E., HOLCOMB, V.B., HONG, J., NÚÑEZ, N.P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **Eur J Nutr**, v.51, p.861-870, 2012.

SUKI, B.; BATES, J. H. T. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 163, p. 33-43, 2008.

SZOEKE, C.E; et al. The relationship of reports of aches and joint pains to the menopausal transition: a longitudinal study. **Climacteric**, vol.11, n.1, p. 55-62, 2008.

TAM A; et al. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. **BMC Women's Health**, 2011.

TANAKA, R.; AL-JAMAL, R.; LUDWIG, M.S. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. **J. Appl. Physiol**. v. 91, p. 2314–2321, 2001.

TANAKA, R.; LUDWIG, M. S. Changes in viscoelastic properties of rat lung parenchymal strips with maturation. **J. Appl. Physiol.** v. 87, p. 2081–2089, 1999.

TEIXEIRA, V. P. **Estudo da resistividade das vias aéreas em camundongos obesos.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

TEIXEIRA, V. P. et al. Postnatal overnutrition in mice leads to impaired pulmonary mechanics in response to salbutamol. **J Physiol Sci**, 2015. doi: 10.1007/s12576-015-0417-0

THOMAS C, GUSTAFSSON JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 11, p. 597-608, 2011.

TOMODA, K., HIROSHI, K., SHIGEYOSHI, O. **Distribution of Collagen Fiber Orientation in the Human Lung** .v. 296, n. 5, p.846-850, 2013.

TOWNSEND E.A, MILLER V. M, PRAKASH Y. S. Sex differences and sex steroids in lung health and disease, **Endocr. Rev**, v.33, n.1, p. 1–47, 2012.

TOWNSEND, E.A; et al. Estrogen increases nitric-oxide production in human bronchial epithelium. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 339, n.3, p. 815–824, 2011. doi:10.1124/jpet.111.184416.

TOWNSEND, E.A; et al. Rapid effects of estrogen on intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in human airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 298, p.521–530, 2010.

TRESGUERRES, J. a F; et al. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, p.318-326, 2008.

TROISI, R.J., SPEIZER, F.E., WILLETT, W.C., TRICHOPOULOS, D., ROSNER, B. Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma: a prospective cohort study. **Am J Respir Crit Care Med**, v.152, p.1183–1188, 1995.

TULLBERG-REINERT, H; JUNDT, G. **Histochemistry**, v. 112, p. 271, 1999.

UITTO, J; et al. Collagen, elastic fibers, and extracellular matrix of the dermis, In: WOLFF K; et al. (Ed). **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008.

VARMA, S., ORGEL, J.P., SCHIEBER, J.D. **Biophys J**, v. 12, n.111, p. 50-6, 2016. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.038.

VEGETO E; et al. Estrogen receptor-alpha as a drug target candidate for preventing lung inflammation. **Endocrinology**, v. 151, p. 174-184, 2010.

VERMA M. K; MIKI Y, SASANO H. Sex steroid receptors in human lung diseases, **J. Steroid Biochem. Mol. Biol**, v. 127, n. 216–222, 2011.

- VERMEULEN, A, et al. Estradiol in elderly men. **Aging Male**. v. 5, p. 98–102, 2002. doi:10.1080/tam.5.2.98.102.
- WANG, Z; et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, p. 1023-1027, 2005
- WEINBERGER, M. Airways reactivity in patients with CF. **Clin Rev Allerg Immunol**, v. 23, n. 1, p. 77-85, 2002.
- WEISS, S. T., SHORE, S. Obesity and asthma: directions for research. **Am J Respir Crit WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Obesity: preventing and managing the global epidemic report of **WHO consultation on Obesity**. Geneva, 1998.
- WOODS, N.F., SMITH-DIJULIO, K., PERCIVAL, D.B. et al. Depressed mood during the menopausal transition and early postmenopause: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. **Menopause**, v.15, p.223–32, 2008.
- WOODS, N.F., SMITH-DIJULIO, K., PERCIVAL, D.B. et al. Symptoms during the menopausal transition and early postmenopause and their relation to endocrine levels over time: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. **J Womens Health (Larchmt)**, v.16, p.667–77, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION SCIENTIFIC GROUP. Research on the Menopause, **WHO Technical Services Report Series 670**. Geneva: World Health Organization: 1981.
- YUAN, H; et al.. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. **J. Appl. Physiol**. v. 89, p. 3–14, 2000.
- ZHANG, Z., TENG, C.T. Estrogen receptor-related receptor\_1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene. **J Biol Chem**, v.275, p.20837–20846, 2000.
- ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M.; FAFPE, D.S. Fisiologia da Respiração. In: Aires, M.M. (Org.). **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 623-639, 2008.