



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

THAÍS SOARES FARNESI

**Avaliação do efeito imunomodulatório de agonistas de PPAR- γ no
recrutamento de eosinófilos**

Uberaba - MG

2011

THAÍS SOARES FARNESI

Avaliação do efeito imunomodulatório de agonistas de PPAR- γ no recrutamento de eosinófilos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração II: Imunologia, Microbiologia e Parasitologia.

Orientador: Profº Dr. Marcelo Henrique Napimoga

Uberaba, MG

2011

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

F249a Farnesi, Thaís Soares
Avaliação do efeito imunomodulatório de agonistas de PPAR-γ
no recrutamento de eosinófilos / Thaís Soares Farnesi. -- 2016.
112 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga

1. Inflamação. 2. PPAR gama. 3. Eosinófilos. 4. Prostaglandinas.
I. Napimoga, Marcelo Henrique. II. Universidade Federal do Triân-
gulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-002

THAIS SOARES FARNESI

AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DE AGONISTAS DE PPAR-GAMA NO RECRUTAMENTO DE EOSINÓFILOS.

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada na sua versão final em 27 de Abril de 2011, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração II: Imunologia, Microbiologia e Parasitologia.

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga
- Orientador -
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

Dr.ª Vanessa Carregaro
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Dr. Valdo José Dias da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

*A Deus, a minha mãe Shirley, a
meu pai Maurício, a minha irmã
Tássia e ao meu amor Ricardo que
sempre apoiaram meu esforço, pois
acreditam no meu sucesso e a todos
que acreditam que a ousadia e os
erros são o caminho para as grandes
vitórias.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente e acima de tudo, a Deus, minha fortaleza, pois com todas as dificuldades que se apresentaram diante de mim, foi com Ele e por causa Dele que consegui superar; sem Ele nada em minha vida seria possível.

A minha família por me amar incondicionalmente e acreditar tanto e às vezes mais do que eu em meus próprios sonhos. Amo vocês!!!

Ao meu amor, por me fazer enxergar que apesar das dificuldades sempre há uma solução para tudo, por me fazer sentir amada e segura para poder continuar minha jornada. Amo você!!!

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Henrique Napimoga, por confiar em mim e em minha capacidade, por me dar a oportunidade de fazer parte de seu grupo de estudos, por tornar mais ricas as nossas discussões científicas e por acima de tudo mostrar como é gratificante a vida científica. Minha eterna gratidão!!!

Ao Profº Valdo por seu “brilho no olhar” ao falar sobre sua pesquisa e por todos os esforços destinados às melhorias no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/UFTM.

A Profª Alessandra Bonacini Cheraim, pelo grande apoio e contribuição neste trabalho.

A Dra. Vanessa Carregaro, pelos ensinamentos e pela acolhida. Obrigada pelo convívio e aprendizado.

A Dra. Cristina Ribeiro por seus conselhos e por sempre me mostrar que sou capaz. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Virmondes Rodrigues, por me permitir utilizar as instalações do Laboratório de Imunologia para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa e me proporcionar o convívio com pessoas ímpares.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia pelos serviços prestados.

A Elizabete Perez por sua dedicação ao curso da Pós-Graduação e a nós alunos.

A todos os amigos da Imunologia, em especial, à Beatriz Coutinho, Bethânea Peghinni, Carlos Trindade, Cláudia Renata, Haline Ogata, Jéssica Liver, Patrícia Reis, Polyanna Miranda e Vanessa Beatriz, que sempre acompanharam de perto minha caminhada e que cada um com sua peculiaridade contribuíram enormemente para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e amigas Larissa Beatriz, Morgane Oliveira, Vivian, Juninho, Angelo Zafalon, Cátia, Rodolfo Leonel, Cláudia Queiroz, Marília Beatriz, Ana Keyla, Dayse Arduini e Keyla pela torcida constante.

Aos alunos dos Cursos de Pós-Graduação da UFTM, pelo convívio e troca de experiências durante as disciplinas cursadas e também pelos momentos de descontração.

Aos Professores da Pós-Graduação pela grandiosa contribuição.

Aos alunos de iniciação científica, Jhony e Claudiney, pela contribuição.

A Universidade de Uberaba, por ceder gentilmente os animais utilizados nesta pesquisa, bem como aos técnicos da instituição, Luís Fernando, Andréia, Cristiane e Rayane.

As agências de fomento CAPES e FAPEMIG pelo auxílio e apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”. (Albert Einstein), e sem ela não haveria ciência.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*
(Bertolt Brecht)

RESUMO

Farnesi, TS. Avaliação do efeito imunomodulatório de agonistas de PPAR- γ no recrutamento eosinofílico. [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

Eosinófilos são células essenciais nos processos inflamatórios alérgicos e parasitários, além de ser uma das principais células que expressam o receptor ativador de proliferação de peroxissomos-gama (PPAR- γ). Os ligantes de PPAR- γ regulam negativamente as células do sistema imune inato e adaptativo e excelentes resultados vêm sendo obtidos em diferentes modelos de doenças inflamatórias, sugerindo que estes ligantes possam ser utilizados como agentes terapêuticos em diferentes doenças. No entanto, há poucos estudos que avaliam o efeito destes ligantes e a relação com os eosinófilos e os processos alérgicos. Portanto, no presente estudo foram utilizados agonistas PPAR- γ , 15d-PGJ₂ e rosiglitazone (RGZ), a fim de avaliar seus efeitos no recrutamento eosinofílico e na regulação da eosinopoiese em um modelo de eosinofilia. Camundongos C57Bl/6 wild type (C57Bl/6 WT) e C57Bl/6 knockout para o gene da interleucina-17 (C57Bl/6 IL-17^{-/-}), receberam um implante de clara de ovo coagulada pelo calor (EWI), que induz uma inflamação eosinofílica. Transcorrido 15 dias os animais foram pré-tratados com diferentes doses de 15d-PGJ₂ (100, 300 e 1000 μ g/kg, de 12-12 hs, s.c.) e RGZ (1, 3 e 10mg/kg, de 24-24hs, v.o.), 30 minutos antes do desafio alérgico com ovalbumina (10ug/animal i.p.), sendo, então, avaliado o efeito destes fármacos no recrutamento eosinofílico 48hs após o desafio. As citocinas (IL-5, IL-33, IL-17 e IL-23) além da IgE, foram mensuradas, por ELISA, a partir do lavado peritoneal e do soro, respectivamente. De acordo com os resultados foi possível determinar que a 15d-PGJ₂ reduziu significativamente o recrutamento eosinofílico para a cavidade peritoneal (300 e 1000ug/kg), no entanto, apenas a dose de 1000ug/kg foi capaz de diminuir a eosinopoiese na medula. O RGZ também mostrou efeito similar, sendo a dose efetiva de 10mg/kg. A síntese de IL-5 foi diminuída após tratamento com 15d-PGJ₂ (1000ug/Kg) e RGZ (10mg/Kg) corroborando com a inibição do recrutamento eosinofílico, pois a IL-5 age seletivamente na linhagem eosinofílica, promovendo a eosinopoiese, recrutamento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos. Interessante que a IgE diminuiu apenas com a administração de 1000ug/Kg de 15d-PGJ₂. Neste modelo de eosinofilia também foi observada a diminuição na síntese de IL-33, IL-17 e IL-23. Os animais IL-17^{-/-} submetidos à cirurgia não conseguiram montar uma resposta alérgica, demonstrando a importância desta citocina na montagem do quadro inflamatório alérgico. Ambos os agonistas de PPAR- γ conseguiram modular a resposta eosinofílica, diminuindo a síntese tanto de citocinas específicas da resposta Th2 e de outros perfis, como do Th17, sendo a modulação da IgE foi observada apenas com a utilização de 15d-PGJ₂(1000ug/Kg). Com isso, nossos resultados sugerem que os agonistas de PPAR- γ , principalmente a 15d-PGJ₂, pode ser uma boa estratégia terapêutica em desordens mediadas por eosinófilos.

Palavras-chave: PPAR- γ , Eosinófilos, Prostaglandina, inflamação.

ABSTRACT

Farnesi, TS. Evaluation of the immunomodulatory effect of PPAR- γ agonists in the eosinophilic recruitment. [dissertation]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.

Eosinophils are essential cells in the allergic and parasitic inflammatory processes, as well as one of the main cells expressing the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR- γ). The PPAR- γ ligands negatively regulate the cells of the innate and adaptive immune system and present excellent results in different models of inflammatory diseases, suggesting the use of these ligands as therapeutic agents in different diseases. However, few studies have evaluated the effects of these ligands and the relationship with eosinophils and the allergic process. Thus, in this study we used the PPAR- γ ligands, 15d-PGJ₂ and rosiglitazone (RGZ), in order to evaluate the effects in the eosinophilic recruitment and the regulation of eosinopoiesis in an eosinophilic model. C57Bl/6 wild type (C57Bl/6 WT) and C57Bl/6 knockout for interleukin-17 (C57Bl/6 IL-17^{-/-}), received a subcutaneous implant of heat-coagulated egg white (EWI), that induced an eosinophilic inflammation. After 15 days the mice were received a pretreatment with different doses of 15d-PGJ₂ (100, 300 and 1000 μ g/kg, of 12-12 hs, s.c.) and RGZ (1, 3 and 10mg/kg, of 24-24hs, v.o.), 30 minutes before allergenic challenge with ovalbumin (10ug/animal i.p.), and so evaluated the effects of these drugs on eosinophilic recruitment, 48 hours after challenge. The cytokines (IL-5, IL-33, IL-17 and IL-23) and IgE were measured by ELISA, from the peritoneal fluid and serum, respectively. According with results were possible determinate 15d-PGJ₂ significantly reduced eosinophil recruitment to the peritoneal cavity (300 and 1000ug/kg), however only the dose of 1000ug/kg was able to down-regulate the bone marrow eosinopoiesis. The RGZ also showed similar effect, and the effective dose was 10mg/kg. The synthesis of IL-5 was decreased after treatment with 15d-PGJ₂ (1000ug/Kg) and RGZ (10mg/Kg) corroborating with the eosinophilic recruitment, since IL-5 acts selectively on the eosinophilic lineage, promoting eosinopoiesis, recruitment, activation and survival of the eosinophils. Interesting, the serum IgE was decreased only after the administration of 1000ug/Kg of 15d-PGJ₂. In this eosinophilia model, decreased synthesis of IL-33, IL-17 and IL-23 was also observed. The IL-17^{-/-} transgenic mice subjected to surgery failed to develop an allergic response, showing the importance of this cytokine to mount an allergic inflammatory response. Both PPAR- γ agonists are able to modulate the eosinophilic response, decreasing synthesis of Th2 specific cytokines and cytokines of others profiles, as Th17, and the IgE modulation were observed only with the use of 15d-PGJ₂ (1000ug/Kg). Thus, our results suggest that PPAR- γ agonists, mainly 15d-PGJ₂, could be a good therapeutic strategy for eosinophil-mediated disorders.

Key-Words: PPAR- γ , Eosinophils, Prostaglandin, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema simplificado da eosinopoiese.....	23
Figura 2 – Foto de Eosinófilos.....	27
Figura 3 – Diagrama esquemático dos eosinófilos e suas funções.....	28
Figura. 4 – Figura esquemática do eosinófilo.....	30
Figura 5 – Síntese esquemática de 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	38
Figura 6 – Esquema simplificado do Processo de Imunização e Desafio Alergênico.....	54
Figura 7 – Esquema simplificado do Tratamento com o Agonista Natural – 15d-PGJ ₂	55
Figura 8 – Esquema simplificado do Tratamento com o Agonista Sintético – Rosiglitazone.....	55
Figura 9 – Tempo para o recrutamento eosinofílico após desafio alergênico com OVA.....	62
Figura 10 – Rosiglitazone diminui o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese.....	64
Figura 11 – 15d-PGJ ₂ diminui o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese.....	66
Figura 12 – 15d-PGJ ₂ , mas não RGZ, é capaz de diminuir a concentração sérica de IgE.....	68
Figura 13 – Efeito dos agonistas de PPAR- γ na síntese de citocinas.....	70
Figura 14 – IL-17 é essencial para o recrutamento eosinofílico e para a eosinopoiese no modelo de EWI.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das Reações de Hipersensibilidades, de acordo com Coombs e Gell	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR	Hiperresponsividade das vias aéreas
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
AP-1	Proteína de Ativação-1
BAL	Lavado Broncoalveolar
BLTR	Receptor de Leucotrieno B ₄
BSA	Albumina Sérica Bovina
COX-	Ciclooxigenases
CRTH ₂	Receptor Químioatraente de Células Th ₂
DAB	Diaminobenzidina
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardia
ECP	Proteína Eosinofílica Catiônica
EDN	Neurotoxina derivada de Eosinófilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
EPO	Peroxidase Eosinofílica
EPX	Proteína Eosinofílica X
EWI	Egg Withe Implant
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a região Fc da IgE
Flt-3	FMS-liked tyrosine kinase 3
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocíticas
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GMPs	Progenitores de Granulócitos e Macrófagos
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular-1
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IL-17 ^{-/-}	Ausência do gene sintetizador de IL-17
IL-23R	Receptor para IL-23
IL5Rα	Receptor α para IL-5
LOX	Lipoxigenase

LPR	Reação de fase tardia
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MBP	Proteína Básica Maior
MCP-1	Proteína-1 Quimiotática de Monócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP-9	Metaloproteinase-9
NFAT	Fator Nuclear de Células T ativadas
NF-κB	Fator Nuclear κB
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG	Prostaglandina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPAR	Receptor Ativador de Proliferação de Peroxissomos
RGZ	Rosiglitazone
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Subcutânea
SCF	Fator de Célula Tronco
STAT	Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TCR	Receptor de Célula T
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador β
Th	Linfócito T “helper”, auxiliar
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tregs	Linfócito T Regulador
TXs	Tromboxano
v.o.	Via Oral
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular -1
WT	Wild Típe, selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	JUSTIFICATIVA	47
3	HIPÓTESE.....	48
4	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivo Geral	49
4.2	Objetivos Específicos.....	49
5	METODOLOGIA.....	51
5.1	Aspectos Éticos.....	51
5.2	Animais Utilizados	51
5.3	Ovalbumina coagulada pelo calor	53
5.4	Imunização e Desafio Alergênico	53
5.5	Administração dos agonistas de PPAR- γ	54
5.6	Avaliação da imunomodulação dos agonistas de PPAR- γ no modelo de eosinofilia	56
5.6.1	Obtenção das Células do Lavado Peritoneal	56
5.6.2	Obtenção das Células da Medula Óssea	56
5.6.3	Obtenção de Soro	57
5.6.4	Quantificação de Citocinas e Imunoglobulina	57
5.7	Técnica de Coloração	59
5.7.1	Preparo do Esfregaço e Coloração para Peroxidase Resistente ao Cianeto	59
5.8	Análise Estatística.....	59
6	RESULTADOS	61
6.1	Padronização do Modelo Experimental para Determinar o melhor dia de Análise para Experimentos Posteriores	61
6.2	Efeito do Agonista Sintético, Rosiglitazone, de PPAR- γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese.....	63
6.3	Efeito do Agonista Natural, 15d-PGJ ₂ , de PPAR- γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese	65
6.4	Avaliação da Síntese de Imunoglobulina E (IgE) frente à Ação Terapêutica do Agonista Natural e Sintético de PPAR- γ	67
6.5	Avaliação da Síntese de Citocinas frente à Ação Terapêutica dos Agonistas Naturais e Sintéticos de PPAR- γ	69

6.6	Efeito do Agonista Natural, 15d-PGJ ₂ , de PPAR-γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese em Camundongos Knockout para IL-17 (IL17 ^{-/-})	71
7	DISCUSSÃO	74
8.	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXO A.....	112

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é dividido em dois tipos de respostas: a imunidade inata e a adquirida. A imunidade inata é responsável pelas respostas iniciais e atua basicamente da mesma forma para as sucessivas e diferentes infecções, já a imunidade adquirida consegue diferenciar pequenas características entre os mais diversos antígenos, sendo mais específica do que a inata, por ativar mecanismos efetores humorais e celulares específicos. Entretanto, quando este sistema não funciona adequadamente pode levar a ocorrência de algumas doenças, que produzem uma reatividade alterada e conseqüente um dano maior ao organismo, sendo denominadas de hipersensibilidades, como é o caso das doenças alérgicas (BRUGIOLO, 2010; PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007; WILLS-KARP E HERSEY, 2003; SANTOS, 2008).

As hipersensibilidades foram classificadas, de acordo com Coombs e Gell, em quatro tipos (MAJNO e JORIS 2004; AVERBECK et al., 2007), de acordo com os mecanismos envolvidos (Tabela 1):

1) a hipersensibilidade imediata ou do tipo I, que é caracterizada por uma reação que se estabelece imediatamente após o contato com o alérgeno, sendo mediada por imunoglobulina E (IgE), que ativa mastócitos, basófilos e eosinófilos;

2) a hipersensibilidade tipo II ou reações por anticorpos citotóxicos, nas quais os anticorpos reagem com receptores ou antígenos associados à superfície da célula, levando ao dano tecidual, disfunção do receptor, ou ambos;

3) a hipersensibilidade tipo III ou reações por imuno-complexos, nas quais o dano é mediado por complexos imunes circulantes formados devido ao excesso de antígenos e;

4) a hipersensibilidade tipo IV, tardia ou celular, na qual os processos inflamatórios são iniciados por células T, ocorrendo sem a presença de anticorpos (WILLS-KARP E HERSEY, 2003; SANTOS, 2008; MAJNO e JORIS, 2004).

Tabela 1 – Classificação das Reações de Hipersensibilidades, de acordo com Coombs e Gell

Hipersensibilidade mediada por Anticorpo			Hipersensibilidade mediada por Célula
Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Hipersensibilidade Imediata mediada por IgE	Resposta Imune Humoral Citotóxica	Resposta Imune mediada por imuno-complexo	Hipersensibilidade tardia mediada por células T
- Rinite Alérgica - Asma brônquica	- Citopenia induzida por drogas	- Vasculite por imuno-complexo - Alveolite alérgica exógena	- Alergia de contato - Exantema induzido por drogas

Fonte: Adaptado de AVERBECK et al., 2007.

A hipersensibilidade imediata, comumente chamada de doença atópica ou alérgica, não tem relação com a existência obrigatória de um patógeno, podendo, então, ser causada por respostas imunes a antígenos ambientais, a presença de uma proteína inofensiva, como a ovalbumina, ou a um medicamento, como a penicilina (BARRADAS, 2010).

Vários antígenos que desencadeiam respostas alérgicas são proteínas ou substâncias químicas ligadas a proteínas as quais os indivíduos predispostos são repetidamente expostos. No entanto, não se sabe por que alguns antígenos induzem respostas Thelper 2 (Th2) mais fortes que outros. O que se sabe é que a ativação crônica e repetida dos linfócitos T conduz para a via Th2, uma vez que eles próprios secretam interleucina-4 (IL-4), a principal citocina indutora de Th2.

O mecanismo imunopatológico da hipersensibilidade tipo I é comum à doenças como a asma brônquica, a dermatite atópica e a rinite alérgica, todas caracterizadas por uma reatividade intensa a antígenos ambientais em indivíduos previamente sensibilizados, ou seja, expostos a estes antígenos, e com predisposição genética a desencadear respostas humorais e celulares com significativos aumentos de anticorpos da classe IgE (MAJNO e JORIS 2004) e recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, principalmente.

As reações de hipersensibilidade imediata induzem, no primeiro contato com o alérgeno, à diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ na subpopulação de células Th2, com conseqüente produção de citocinas, principalmente IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. A polarização em Th2 é dependente de IL-4, que funciona ativando o fator de transcrição STAT-6 (do inglês, "Signal Transducer and Activator of Transcription-6") que junto com os sinais dos TCRs (do inglês, T-cell receptors), induzem a expressão do fator de transcrição GATA-3, que atua como um regulador-mestre da diferenciação deste subtipo (Th2), aumentando a expressão dos genes das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, além de bloquear a diferenciação na subpopulação Th1 (JIANG, HARRIS e ROTHMAN, 2000; KUPERMAN e SCHLEIMER, 2008). Após a polarização das células T naíves ("virgens") para o perfil Th2, as citocinas secretadas por este perfil desempenham inúmeras funções. A IL-4 e IL-13 estimulam os linfócitos B, para que haja uma troca de classe, com produção de IgE alérgeno-específica, que se liga aos receptores FcεRI (receptor de alta afinidade para a região Fc da Imunoglobulina E) dos mastócitos e basófilos, sensibilizando-os. Em uma segunda exposição ao mesmo antígeno, há uma ligação cruzada com os anticorpos IgE ligados ao FcεRI que estão associados a estas células, e as mesmas são estimuladas e degranulam-se liberando vários mediadores pré-formados. A IL-5 ativa e recruta eosinófilos, um tipo de célula abundante em muitas reações de hipersensibilidade imediata; a IL-13 está associada ao desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas por estimular a produção de muco pelas células epiteliais e a IL-9 que é um quimioatraente e também ativador de mastócitos (BARNES, 2008; RENAULD, 2001).

As reações de hipersensibilidade imediata consistem basicamente de duas reações: (1) as reações de fase imediata ou precoce, que ocorre em segundos ou minutos após a reexposição ao alérgeno (AVERBECK et al., 2007) e onde há algumas alterações fisiológicas, como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e broncoconstrição da musculatura lisa visceral, formação de pápula e halo eritematoso, em decorrência da liberação de vários mediadores como a histamina, serotonina, PGD₂ (prostaglandina D₂), LTC₄ / LTD₄ (leucotrienos C₄ e D₄) e PAF (fator ativador de plaquetas), principalmente por mastócitos e basófilos; e (2) as reações de fase tardia (LPR, do inglês late-phase reaction), normalmente posterior às reações imediatas, que ocorrem 8 a 12hs após o contato (AVERBECK

et al., 2007), sendo caracterizadas por uma intensa infiltração de neutrófilos, basófilos, mas principalmente de células típicas destas reações, os eosinófilos e células Th2 (DEMONCHY et al., 1985; KAY, 1988; FREW e KEY, 1990; SIQUEIRA et al., 1997; FACINONE et al., 1997; MAJNO e JORIS 2004). As reações de fase tardia da hipersensibilidade imediata podem ser distinguidas da hipersensibilidade do tipo tardia ou tipo IV (DTH, do inglês Delayed-Type Hypersensitivity) por começar mais precocemente quando comparada à DTH e por possuir infiltrado inflamatório basicamente eosinofílico (DEMONCHY et al., 1985; FACINONE et al., 1997), ao contrário da DTH que é predominantemente notável a presença de linfócitos com perfil Th1 que secretam IFN- γ (interferon- γ) e conseqüentemente ativam macrófagos (CHER e MOSMANN, 1987; CZARNOBILSKA et al., 2007).

Houve um aumento significativo na prevalência de doenças alérgicas nas últimas 2 a 3 décadas (YAZDANBAKHSI et al., 2002). Muitas dessas doenças, como a asma brônquica e a rinite alérgica, são doenças que possuem alta prevalência, principalmente, em países desenvolvidos gerando alto impacto socioeconômico (WEISS e SULLIVAN, 2001; ACCORDINI et al., 2008), possivelmente explicável pela hipótese da higiene, na qual os indivíduos de países desenvolvidos estão expostos à uma baixa variedade de agentes infecciosos durante infância, o que favorece ao aumento das desordens atópicas uma vez não há uma regulação no balanço do desenvolvimento dos perfis Th1 e Th2 (SHEIK e STRACHAN, 2004; YAZDANBAKHSI et al., 2002; KRAMER et al., 2009).

A asma é uma desordem inflamatória crônica (RUSSO et al., 1997; DOHERTY e BROIDE, 2007), de etiologia multifatorial (SCHWARTZ, 2009) que afeta cerca de 300 milhões de indivíduos ao redor do mundo (BOUSQUET e KHALTAEV, 2007; BOUSQUET et al., 2010). É caracterizada por infiltrado inflamatório de células Th2, eosinófilos e mastócitos ativados (PASCUAL e PETERS, 2005; DOHERTY e BROIDE, 2007). A presença recorrente destas células inflamatórias e suas secreções nos tecidos culminam com a hiperresponsividade aérea (AHR, do inglês Airway Hyperresponsiveness), remodelamento aéreo, incluindo fibrose subepitelial e hiperplasia das células caliciformes e das fibras do músculo liso (PARK, 2010). Outra atopia normalmente associada à asma é a rinite alérgica que também possui alta prevalência, além de apresentar um intenso perfil

inflamatório das reações tardias da hipersensibilidade imediata, principalmente com um número maciço de eosinófilos.

A HEMATOPOIESE E A EOSINOPOIESE

A medula óssea é um tecido altamente especializado e tem por função auxiliar na manutenção e desenvolvimento das células-tronco hematopoiéticas (PAPAYANNOPOULOU e SCADDEN, 2008), que se auto-renovam, proliferam e se diferenciam para então se deslocarem para os tecidos periféricos e exercerem suas funções (BRYDER et al., 2006; ABUD, 2010). O estroma medular é formado pelas células reticulares, endoteliais, macrófagos, fibroblastos, adipócitos, células osteogênicas, células-tronco mesenquimais, citocinas, fatores de crescimento e secreção de proteínas da matriz celular (MAJUMDAR et al., 1998; TRAVLOS, 2006; WAGEY, 2008; ABUD, 2010).

A hematopoiese consiste na formação dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) (PINTO, 2007) e a medula óssea representa o principal órgão hematopoiético, sendo essencial para a renovação dos elementos sanguíneos como, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, eritroblastos, eritrócitos, megacariócitos e plaquetas (TRAVLOS, 2006).

A hematopoiese é mantida por células-tronco que são auto-renováveis, que além de gerarem novas células-tronco, geram um número equivalente de células progenitoras (PINTO, 2007), que possuem a capacidade de dar origem a todos os elementos hematopoiéticos, tanto de origem mielóide, que se diferenciam em granulócitos, eritrócitos, monócitos, células dendríticas e megacariócitos, quanto de origem linfóide, representada pelos linfócitos T e B, pelas células natural killer e também células dendríticas (BRYDER et al., 2006; TRAVLOS, 2006).

De acordo com METCALF (1977; 1993), os progenitores são capazes de formar colônias em meio semi-sólido (agar ou metilcelulose) contendo fatores de crescimento hematopoiéticos. Já precursores, formas mais avançadas de diferenciação, perderam a capacidade de iniciar o crescimento de colônia em meio semi-sólido, mas podem ser distinguidos com base na sua morfologia, nas suas reações citoquímicas e na expressão de marcadores imunológicos (WEISSMAN et al., 2001; SANTOS, 2008).

Os principais reguladores da hematopoiese são as diferentes citocinas hematopoiéticas (ZHU e EMERSON, 2002), que podem regular de forma geral todas as linhagens, induzindo a proliferação celular, como a IL-3 e o GM-CSF (do inglês, Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor) (BARRADAS, 2010), ou então atuam de forma mais específica promovendo a diferenciação linhagem-específica de algumas células, como a eritropoetina ou a trombopoetina (AKASHI, 2000) que direcionam a diferenciação para eritrócitos e plaquetas, respectivamente.

Um dos braços que as células-tronco hematopoiéticas podem originar são os precursores mielóides e dentre estes a linhagem eosinofílica. Alguns autores questionam essa origem propondo a existência de um progenitor comum a basófilos e eosinófilos, com exclusão das outras células granulocíticas e monocíticas, com base no padrão de expressão de IL5R α (do inglês, interleukin-5 receptor- α), receptor expresso principalmente em eosinófilo e basófilos, requerido para a ligação específica com a IL-5, (DENBURG et al., 1985; TUYSENS et al., 1992 e TAVERNIER et al., 1992). No entanto, alguns estudos demonstram que granulócitos e monócitos originam-se de um progenitor mielóide comum (ELSAS et al., 2003; ROTHENBERG et al., 2005; SANTOS, 2008).

A eosinopoiese (Figura 1) é um processo de diferenciação celular de progenitor a eosinófilo maduro com restrição progressiva do potencial de desenvolvimento e capacidade proliferativa (PINTO, 2007).

A diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em progenitores mielóides é influenciada por alguns fatores como Slf ou SCF (Stem Cell Factor ou ligante de c-kit ou ainda Steel Factor), ligante de Flt-3 (FMS-like tyrosine kinase 3), IL-3, IL-11, GM-CSF, eritropoetina e trombopoetina (AKASHI, 2000; OGAWA, 1993; PINTO, 2007). A via definitiva de diferenciação eosinofílica começa mesmo com a

resposta dos progenitores de granulócitos e macrófagos (GMPs) aos fatores SCF, IL-3, GM-CSF e IL-5 (IWASAKI et al., 2005; CLUTTERBUCK et al., 1989; SANDERSON, 1992; SINGH e SANDERSON, 1997; DEVEREUX e LINCH, 1988), sendo que IL-3 e GM-CSF regulam a eosinopoiese no estágios iniciais e intermediários, enquanto que a IL-5 age nos progenitores terminais e nas células maduras (SONODA, 1993), atuando na diferenciação terminal, crescimento, sobrevivência e função dessas células (GIEMBYCZ et al., 1999; BUSSE et al., 2001, COFFMAN et al., 1989; SANDERSON, 1992; LEE et al., 1997).

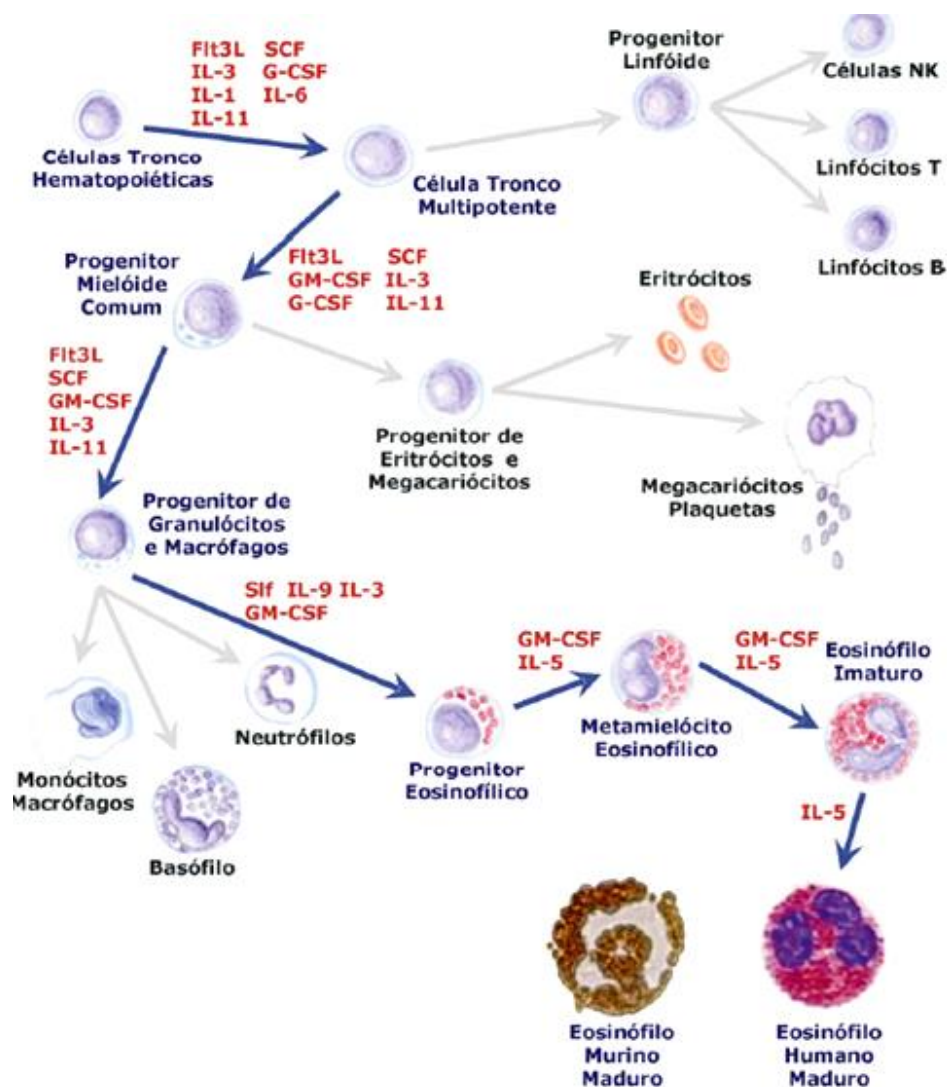


Figura 1 – Esquema simplificado da eosinopoiese. As setas em azul indicam as etapas de formação dos eosinófilos, enquanto que as citocinas em vermelho são as relacionadas com o processo de diferenciação. No final visualiza-se um eosinófilo humano, corado por giemsa, e um eosinófilo murino, revelado por reação histoquímica da peroxidase resistente ao cianeto.

Fonte: PINTO, 2007.

O GM-CSF, também aumenta o número de unidades formadoras de colônias eosinofílicas responsivas a IL-5, resultando num sinergismo. Além de estimular a diferenciação e a proliferação da linhagem eosinofílica, também prolonga a vida destas células *in vitro* (TOMAKI et al., 2002).

Muito se tem descrito sobre a importância da IL-3 e do GM-CSF na hematopoiese, mas pouco se sabe sobre o grau de contribuição destes fatores na inflamação eosinofílica. TOMAKI e cols (2002), realizaram experimentos com anti-IL-3 e com anti-GM-CSF em camundongos com eosinofilia alérgeno-induzida por ovalbumina, avaliando a eosinopoiese e a eosinofilia pulmonar e constataram um efeito suave no que diz respeito a diminuição da resposta eosinofílica e à eosinopoiese, quando comparado com os animais tratados apenas com anti-IL-5.

O GM-CSF, que é produzido por uma variedade de células, incluindo monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos e mastócitos (ABUD, 2010) é rotineiramente utilizado em tratamentos clínicos, para a estimulação da produção celular (METCALF, 2008).

A potencial contribuição de outras quimiocinas e citocinas, como a eotaxina e a IL-9, para a regulação da eosinopoiese tem sido apreciada de maneira crescente (BAGGIOLINI et al., 1997; RENAULD, 1998). A eotaxina é um potente e específico quimioatraente, atraindo os eosinófilos para os sítios da inflamação e das reações alérgicas, além de ser expressa nos sítios hematopoiéticos, promovendo o crescimento e diferenciação dos mastócitos (QUACKENBUSH et al., 1998, 1997). Após a maturação completa dos eosinófilos, a eotaxina em sinergia com a IL-5 promove a mobilização seletiva dos eosinófilos e de seus progenitores para a corrente sanguínea, com conseqüente migração para os sítios de inflamação alérgica (PALFRAMAN et al., 1998; LI et al., 2005).

Já a IL-9 foi originalmente identificada como um fator de crescimento para subpopulações de clones de células T em camundongos (UYTTENHOVE et al., 1988; TEMANN et al., 2006; DONG et al., 1999; RENAULD, 2001), e é um membro da família de citocinas com receptor comum de cadeia γ , incluindo IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 (NOELLE e NOWAK, 2010). Mais atividades da IL-9 em vários tipos celulares foram descritas, incluindo mastócitos, progenitores hematopoiéticos, eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais aéreas (LONGPHRE et al., 1999;

HULTNER e MOELLER, 1990; TEMANN et al., 2006). Além disso, a IL-9 promove a produção de IgE pelos linfócitos B (PETIT-FRERE et al., 1993; SOUSSI-GOUNNI et al., 2001), e parece promover a proliferação de progenitores eosinofílicos e induzir indiretamente a migração dessas células para os pulmões, como sugerido pela observação de DONG e cols (1999), em que a IL-9 aumenta a expressão da eotaxina e outras quimiocinas pelas células epiteliais pulmonares. De acordo com SOROOSH e DOHERTY (2009), as fontes de IL-9 são os mastócitos e os eosinófilos, mas a maior fonte são os linfócitos do perfil Th2, uma vez que estudos *in vivo* revelaram que a produção de IL-9 em resposta a um antígeno protéico é significativamente reduzida na ausência de células T, além de relatos indicando que há uma alta expressão dessa citocina em infecções parasitárias (FALLON et al., 2000; FAULKNER et al., 1998) e alérgicas (TEMANN et al., 2006).

A IL-5, uma glicoproteína de 124 aminoácidos, produzida por células Th2 ativadas e mastócitos, é considerada uma das citocinas mais importantes nos quadros alérgicos, uma vez que é responsável pela regulação da diferenciação, maturação e expansão dos eosinófilos na medula óssea (KOIKE e TAKATSU, 1994; DENBURG et al., 1999; KAY et al., 2003; ZABEAU et al., 2003), bem como na potencialização da mobilização destes para o sangue, além de amplificar o recrutamento tecidual deste leucócito (FOSTER et al., 2001). Estudos demonstraram que a administração intratraqueal de IL-5 é capaz de promover o acúmulo de eosinófilos no pulmão de cobaias *in vivo* e induzir quimiotaxia de eosinófilos em Câmara de Boyden *in vitro* (COLLINS et al., 1995). Outro estudo também demonstra que camundongos transgênicos para IL-5, apresentam, naturalmente, elevada eosinofilia sanguínea (DENT et al., 1990) e pulmonar (XAVIER-ELSAS et al., 2007), em contraste com camundongos deficientes em IL-5, que apresentam baixo número de eosinófilos no sangue e nos pulmões mesmo após provocação alérgica (FOSTER et al., 1996; SANTOS, 2008). A IL-5 também se mostrou um potente estimulante à diferenciação e proliferação eosinofílica em cultura líquida (YAMAGUCHI et al., 1990; SANDERSON, 1992).

A IL-5, como vimos, além de ter um papel central na mediação, na proliferação, na diferenciação e na inflamação eosinofílica, parece que sinergiza com outra citocina, a eotaxina, nos eventos alérgicos. A eotaxina, uma quimiocina isolada primeiramente do lavado broncoalveolar de porco, se liga seletivamente a um

receptor (CCR3) altamente expresso em eosinófilos, basófilos e mastócitos, contribuindo com a atração de eosinófilos (PAPLINSKA et al., 2007). Estudiosos demonstraram que, assim como a IL-5, a eotaxina regula o efluxo de células progenitoras da medula óssea (FOSTER et al., 2001), além de possuir papel crucial na eosinofilia tecidual, onde a co-expressão destas citocinas resultam em uma amplificação sinérgica do número de eosinófilos recrutados para a via aérea com aumento concomitante do número de eosinófilos circulantes (MOULD et al., 1997; FOSTER et al., 2001).

EOSINÓFILOS

Os eosinófilos desempenham importantes funções, como células efectoras, no mecanismo de defesa contra infecções parasitárias e reações alérgicas (ADAMKO et al., 2003; LEMANSKE e BUSSE, 2003; ELSAS et al., 2004; BARNES et al., 1988; GLEICH, 1990; BASCOM et al., 1989; KAY, 1985), além de poder mediar danos teciduais (ROTHENBERG, 1998), sendo portanto, considerado a principal célula efetora do perfil de resposta do tipo Th2.

Os eosinófilos são granulócitos polimorfonucleares, com núcleo bilobulado, no caso de eosinófilo humano (figura 2B), podendo, em algumas doenças, o número de lóbulos aumentar para mais que quatro, e têm de 8-15µm de diâmetro (SOKOL et al., 1987; GLEICH et al., 1992; GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999; WARDLAW et al., 1995; WELLER, 1991). Já em camundongos o núcleo se apresenta em forma de rosca (figura 2A), (PINTO, 2007; SANTOS, 2008). Normalmente, constituem de 1 a 3% das células nucleadas do sangue periférico humano (IWASAKI et al., 2005), sendo considerados células com tropismo por tecidos, e observadas em locais como o trato respiratório, gastrointestinal, genito-urinário inferior, pele (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999; ROTHENBERG, 1998; WELLER, 1991), timo, linfonodos e baço (BYSTROM et al., 2011).

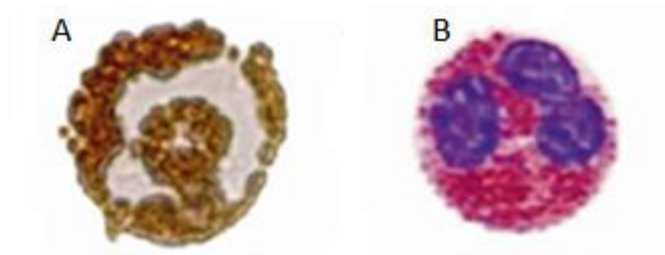


Figura 2 – Foto de Eosinófilos, em A) Eosinófilo maduro de camundongo corado pela técnica de peroxidase resistente ao cianeto; B) Eosinófilo maduro humano, corado com Giemsa.
Fonte: PINTO, 2007.

O primeiro relato da existência dos eosinófilos ocorreu, provavelmente, em 1846 por T. W. Jones, que observou células sangüíneas contendo grânulos grosseiros (JONES, 1993). No entanto, o mais provável é que ele tenha observado células da linhagem mais abundante do sangue periférico, os neutrófilos. Sendo assim, foi Paul Ehrlich, em 1879, quem observou células com numerosos grânulos citoplasmáticos com afinidade por corantes ácidos e as denominou de eosinófilos (JONES, 1993).

Estas células, como anteriormente discutido, originam-se de célula-tronco hematopoiética de linhagem mielóide, sendo, a IL-5 importante para a diferenciação, proliferação e maturação das mesmas na medula (KAY et al., 2003; ZABEAU et al., 2003). Quando ativadas são capazes de realizar fagocitose de pequenas partículas e bactérias (SANTOS, 2008), porém sua principal função é produzir, armazenar e liberar moléculas biologicamente ativas, como proteína eosinofílica catiônica (ECP), a proteína básica maior (MBP), neurotoxina eosinofílica, mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano A₂), fator ativador de plaquetas (PAF) e diversas citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), (GLEICH et al., 1993; WELLER, 1994; GLEICH, 2000; HOGAN et al., 2008; VALENT, 2009), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18; TGF- α/β (fator de crescimento tumoral) (KITA, 1996; ROTHENBERG e HOGAN, 2006). A maioria destas moléculas tem efeito pró-inflamatório, além de agir sobre o sistema de adesão, na modulação do tráfico celular e na ativação e na regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição muscular lisa. Alguns estudos indicam que os eosinófilos podem iniciar uma resposta imune antígeno-específica, agindo como células apresentadoras de antígenos (APCs), processando e apresentando uma variedade de antígenos microbianos, virais e parasitários (SHI, 2004) além de expressarem moléculas co-

estimulatórias MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 (AKUTHOTA et al., 2008; WALSH e AUGUST, 2009). Eles também regulam a polarização das células T através da síntese de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima envolvida no metabolismo oxidativo do triptofano, catalizando a conversão do triptofano em kynurenina (KYN), um regulador do balanço entre Th1 e Th2 (ROTHENBERG e HOGAN, 2006), além de ativar a degranulação de mastócitos e basófilos. As funções dos eosinófilos estão sumarizadas na Figura 3 abaixo (ROTHENBERG e HOGAN, 2006).

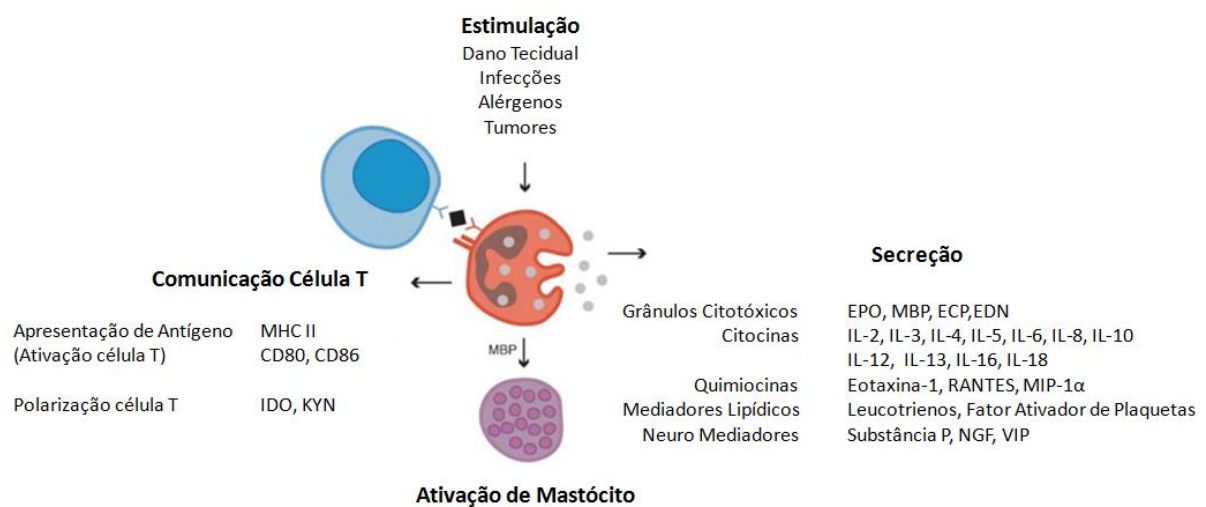


Figura 3 – Diagrama esquemático dos eosinófilos e suas funções.
Fonte: Adaptado de ROTHENBERG e HOGAN, 2006.

O recrutamento dos eosinófilos para sítios de inflamação alérgica depende de vários mecanismos para garantir a seletividade (BOCHNER, 2000; BOCHNER e SCHLEIMER, 2001; BROIDE e SRIMARAO, 2001). Várias citocinas e quimiocinas, incluindo as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e CCL17, têm mostrado induzir o recrutamento dos eosinófilos (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999). Além da eotaxina fortes evidências envolvem o receptor de leucotrieno B4 (BLTR) no recrutamento destas células para a cavidade peritoneal induzido por tioglicolato em camundongos (TAGER et al., 2000).

O recrutamento destas células para o tecido envolve a sensibilização do local para produção de quimiotáticos ativados em combinação com moléculas de

adesão. A $\alpha 4\beta 1$ integrina expressa nos eosinófilos apresenta-se particularmente *in vivo* (WEG et al., 1993), ligando à VCAM-1 expressa nas células endoteliais do vaso. As citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13, são capazes de reforçar a expressão de VCAM-1 e outras moléculas de adesão e rolamento pelas células endoteliais com o propósito de facilitar a fixação dos eosinófilos com a superfície do endotélio (WELLER et al., 2005).

Uma característica dos eosinófilos é a presença de muitos grânulos ovóides e esféricos, que ocupam aproximadamente 1/5 do citoplasma (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999). Quatro tipos de grânulos podem ser encontrados nos eosinófilos: os grânulos primários, os grânulos secundários ou específicos, os grânulos pequenos e os corpos lipídicos, como observado na Figura 4 (HOGAN et al., 2008; EGESTEIN et al., 2001). Durante a maturação da linhagem eosinofílica, mais precisamente no estágio de promielócito, já surgem os primeiros grânulos, denominados grânulos primários, dentro dos quais já se podem identificar várias proteínas como as dos cristais de Charcot-Leyden (EGESTEIN et al., 2001), a peroxidase eosinofílica (EPO), fosfatase ácida e arilsulfatase, e outras enzimas lisossômicas (ZUCKER-FRANKLIN, 1980), sendo estes grânulos precursores dos grânulos específicos (HARDIN e SPICER, 1970; GLEICH e LOEGERING, 1984).

Os grânulos secundários (WARDLAW et al., 1995), têm em seu interior quatro proteínas catiônicas citotóxicas: a Proteína Básica Maior (MBP, do inglês Major Basic Protein), a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP, do inglês Eosinophil Cationic Protein), a Peroxidase Eosinofílica (EPO, do inglês Eosinophil Peroxidase) e a Neurotoxina derivada do Eosinófilo (EDN, do inglês Eosinophil Derived Neurotoxin) (GLEICH e ADOLPHSON, 1986; WARDLAW et al., 1995; ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Além das proteínas catiônicas, há relatos de que nos grânulos específicos também há metais como o zinco (Zn), enzimas lisossômicas, pequenas quantidades de fosfatase alcalina, lecitina e fagocitina (GLEICH et al., 1992), fosfolipase, arilsulfatase, β -glucuronidase, ribonuclease e catepsina (PINTO, 2007).

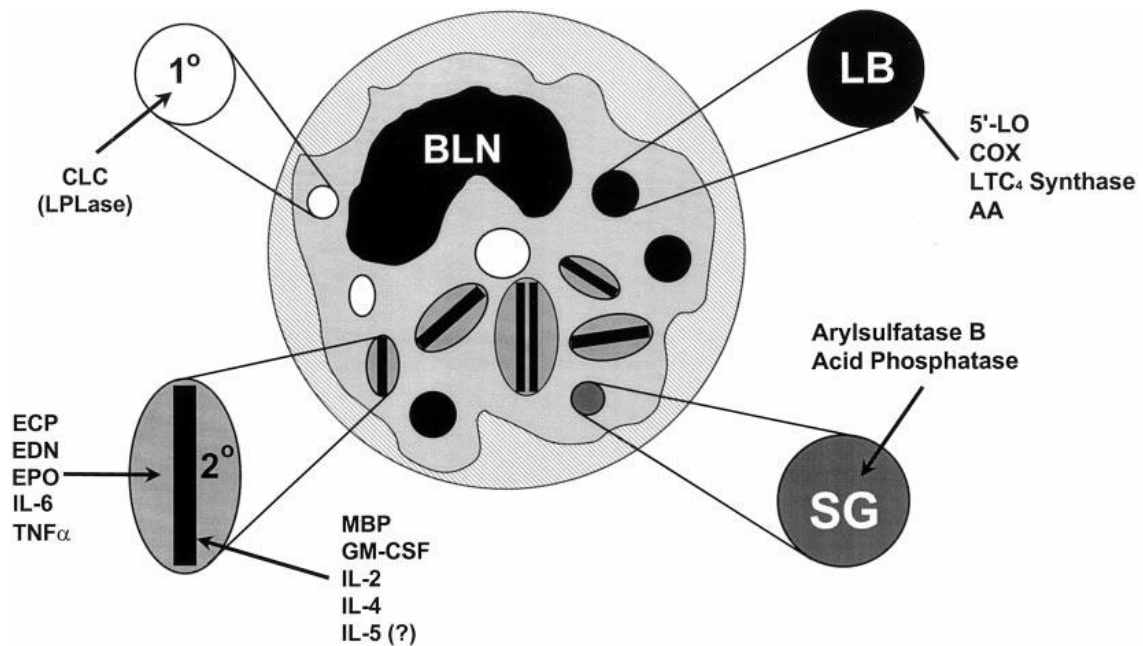


Figura. 4 - Figura esquemática do eosinófilo. Núcleo bi-lobulado (BLN); Grânulos Primários (1º) contendo cristais de Charcot-Leyden; Grânulos Secundários (2º) onde usualmente se encontram as proteínas citotóxicas dos eosinófilos, a MBP (proteína básica maior), a ECP (proteína catiônica eosinofílica), a EDN (neurotoxina derivada do eosinófilo e a EPO (peroxidase eosinofílica); Corpos Lipídicos (LB) que representam o sítio de biosíntese dos mediadores lipídicos; e os grânulos pequenos (SG) que armazenam a arilsulfatase B e ácido fosfatase; 5'-LO (5'-lipoxigenase); COX (cicloxigenase); LTC₄ Sintase (Leucotrieno C₄ sintase); AA (ácido araquidônico)
 Fonte: GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999.

Os grânulos pequenos contêm arilsulfatase, responsável pela degradação de glicosaminoglicanos (EGESTEIN et al., 2001), fosfatase ácida (PARMLEY e SPICER, 1974; DVORAK, 1991), catalase (IOZZO et al., 1982), além de outras enzimas. Já os corpos lipídicos são inclusões, de 0,5 a 2µm de diâmetro, ricas em lipídios não ligados à membrana, que aumentam em número quando o eosinófilo está ativado, sendo a principal fonte de ácido araquidônico (WELLER e DVORAK, 1985; WELLER et al., 1991). SCHAEFFER e cols (1973) e GINSEL e cols (1990) descrevem ainda que os eosinófilos possuem numerosas vesículas secretórias em seu citoplasma, que além de conter albumina, servem como compartimento de reserva para receptores e outras proteínas que possam ser “solicitadas” rapidamente após uma ativação celular (EGESTEIN et al., 2001).

Embora os eosinófilos estejam envolvidos no mecanismo de defesa do hospedeiro contra parasitas (CAPRON, 1992), eles podem induzir e causar disfunções e danos aos tecidos dos mamíferos através de uma variedade de

mecanismos que incluem a liberação de grânulos derivados de proteínas citotóxicas (GLEICH et al. 1988) e a geração de radicais livres (DAVIES et al. 1984). A liberação dos grânulos eosinofílicos ocorre gradualmente após estímulos farmacológicos ou imunológicos, onde se observa o esvaziamento total ou parcial dos grânulos (DVORAK, 1991; LOGAN et al., 2003).

A Proteína Básica Maior (MBP) corresponde a mais de 50% do total de proteínas isoladas nos grânulos secundários e é uma pequena proteína citotóxica que consiste em uma cadeia simples composta por 117 aminoácidos (ZUCKER FRANKLIN, 1988; SHURIN, 1995). É expressa em dois homólogos diferentes, a MBP1 e a MBP2. A MBP1 pode ser detectada nos grânulos de basófilos, apesar de bem menos expresso quando comparados com os eosinófilos (ACKERMAN et al., 1983). Os eosinófilos maduros perdem a capacidade de transcrever o mRNA que codifica a MBP, indicando que toda a MBP armazenada nos grânulos foram sintetizadas durante os primeiros estágios da eosinopoiese (POPKEN-HARRIS et al., 1998). Além disso, a MBP2 é expressa exclusivamente por eosinófilos (PLAGER et al., 2006). A MBP tem mostrado ser citotóxica para as vias aéreas e pode ser parcialmente responsável pelo dano tecidual associado com o infiltrado eosinofílico na mucosa brônquica na asma (FRIGAS et al., 1980; HISAMATSU et al. 1990; FURUTA et al. 2005). O efeito citotóxico da MBP é resultado do aumento da permeabilidade da membrana através das mudanças que na bi-camada lipídica (WASMOEN et al. 1988) culminam com a formação de poros (YOUNG et al., 1986).

A Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP) e a Neurotoxina Derivada Eosinófilo (EDN) são ribonucleases e tem mostrado possuir uma atividade antiviral (ROTHENBERG e HOGAN, 2006), além de possuírem alto grau de homologia e são as únicas em humanos e primatas, não sendo encontradas em outras espécies. Depois da síntese dessas ribonucleases, a ECP perde parte da sua atividade de ribonuclease, mas adquire atividade citotóxica, enquanto que a EDN permanece uma potente ribonuclease (ROSENBERG et al., 1995; BYSTROM e BISHOP-BARLEY, 2011). A ECP está presente na matriz dos grânulos específicos rodeando a MBP, é uma proteína de cadeia simples de polipeptídeos com 16 aminoácidos (WARDLAW et al., 1995; WELLER et al., 1991), sendo principalmente produzida durante a expansão terminal dos eosinófilos na medula óssea (BYSTROM e BISHOP-BARLEY, 2011). Possui atividades não-citotóxicas, como a supressão da

resposta T proliferativa e na síntese de imunoglobulinas pelas células B, induz a degranulação dos mastócitos e a estimulação da secreção de muco nas vias respiratórias e a produção de glicosaminoglicanos pelo fibroblastos humanos (VENGE et al., 1999).

A Neurotoxina Derivada do Eosinófilo (EDN), um outro membro da família de multigene RNase A (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999), também é conhecida como proteína eosinofílica X (EPX) (SLIFMAN et al., 1986), porque é capaz de induzir uma disfunção neurológica, quando injetada no cérebro de coelhos e ratos (GLEICH e ADOLPHSON, 1986). Possui alta homologia – 70% - com a ECP, sugerindo que estas duas proteínas derivam de um mesmo gene durante o desenvolvimento evolucionário (HAMANN et al., 1990). A EDN também tem sido identificada em basófilos, células mononucleares e em neutrófilos (ROSENBERG et al., 1989; TEN et al., 1991; WILDE et al., 1992).

Um dos principais grânulos, é a Peroxidase Eosinofílica (EPO), uma proteína com 2 cadeias, sendo uma cadeia leve de aproximadamente 15kDa e uma cadeia pesada de 2-55 kDa (CARLSON et al., 1985) e um membro da família das haloperoxidases (GIEMBYCZ e LINDSAY, 1999). É uma proteína distinta da mieloperoxidase dos neutrófilos e células mononucleares (JONES, 1993), sendo localizada na matriz dos grânulos secundários, associada à morte bacteriana. Quando combinada com o peróxido de hidrogênio constitui um potente sistema bactericida e helminticida, bem como se torna citotóxico para células tumorais e do hospedeiro (GLEICH e ADOLPHSON, 1986). Além disso, este mesmo sistema induz a degranulação não-citotóxica dos mastócitos e a liberação de histamina (HENDERSON et al., 1980), sendo também uma das proteínas utilizadas para a identificação dos eosinófilos (TEN et al., 1989).

EOSINÓFILOS, ALERGIA E OUTRAS CITOCINAS ENVOLVIDAS

Embora a resposta imune Th2 desempenhe um papel crucial na montagem e amplificação da inflamação nas doenças alérgicas (NIKAJIMA e HIROSE, 2010), existem fortes indícios da participação de outros perfis de citocinas no processo de desenvolvimento e sustentação desta doença.

Recentemente uma nova citocina da família IL-1, a IL-33, foi inicialmente identificada como um fator nuclear (NF) de vênulas do endotélio (NF-high endothelial venule) expresso abundantemente por células endoteliais nos tecidos linfóides (BAEKKEVOLD et al., 2003; CARRIERE et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2009). Posteriormente foi identificada sua expressão em uma variedade de células de tecidos estromais, predominantemente na pele, pulmões e sistema nervoso central, sugerindo desempenhar um papel fisiopatológico nestes órgãos (STOLARSKI et al., 2010).

KUROWSKA-STOLARSKA e colaboradores (2008) demonstraram que em animais que foram induzidos à inflamação das vias aéreas com ovalbumina, expressaram níveis consideráveis de IL-33 nas células epiteliais pulmonares e em macrófagos. Por ser, também, um importante indutor de citocinas Th2 e mediadores inflamatórios, a IL-33, pode desempenhar um papel patogênico nas inflamações alérgicas, pois foi demonstrado que após ser administrada por via intranasal, em animais naïve, os mesmos apresentaram eosinofilia e altas concentrações de IL-5, IL-13, quimiocinas, IgE, além de aumento da produção de muco bem como hiperreatividade das vias aéreas (SCHMITZ et al., 2005; KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; KONDO et al., 2008). Devido a IL-33 estar envolvida com a produção de citocinas do perfil Th2, STOLARSKI e cols (2010) demonstraram que em culturas de células progenitoras hematopoiéticas esta citocina age diretamente na estimulação da diferenciação da linhagem eosinofílica de maneira dependente de IL-5, além de estimular as funções dos eosinófilos, e segundo SCHNEIDER et al., 2009, agindo também nas atividades dos basófilos quanto a síntese de citocinas como IL-6, IL-13 e a IL-4, que realçam a adesão, a expressão de integrina, a degranulação e a

sobrevida dos basófilos (LIEW et al., 2010). Terapias experimentais com anticorpos monoclonais anti-IL-33 demonstraram prevenir a asma em um modelo experimental (LIU et al., 2009). Estes achados sugerem que a sinalização promovida pela IL-33, tem um papel crucial nas doenças alérgicas inflamatórias.

Além da participação de linfócitos Th2 nas doenças alérgicas, há também os linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17, que são definidos como uma nova subpopulação (Th17), e são comumente relacionados à diversas doenças auto-imunes e inflamatórias, que não podiam ser completamente explicadas pelo paradigma Th1/Th2, como a artrite reumatóide (DUARTE et al., 2010), a encefalomielite experimental e a doença inflamatória intestinal (FUJINO et al., 2003; PARK et al., 2009). E segundo HARRINGTON e colaboradores (2005) o desenvolvimento das células Th17 ocorre independentemente da ativação dos fatores transcripcionais envolvidos na polarização de Th1 (T-BET, STAT-4, STAT-1) e de Th2 (STAT-6 e GATA-3), sendo a presença de IL-23 crucial para o desenvolvimento dos linfócitos Th17. A IL-23, um membro da família IL-12, demonstra atuar na expansão, na sobrevivência e na manutenção das células Th17, indicando que o eixo IL-23-Th17 desempenha um papel chave nas doenças inflamatórias, incluindo as doenças atópicas, como a asma (NAKAJIMA et al., 2010).

Há ainda estudos que demonstram que para a orquestração desta subpopulação (Th17) há a participação de outras citocinas. Como a IL-6, responsável pela inibição da diferenciação das células T reguladoras (Tregs) e pela indução de ROR γ t, um fator de transcrição requerido para o desenvolvimento de Th17 (IVANOV et al., 2006; SONDEREGGER et al., 2008). A IL-1 β e o TGF- β , que apesar da literatura indicar ser um fator crucial para diferenciação de Tregs (BETELLI et al., 2006), é capaz de aumentar a expressão de IL-23R, (receptor da IL-23), conferindo responsividade à IL-23 (MANGAN et al., 2006).

A IL-17 age em células teciduais, especialmente em células epiteliais de tecidos inflamados (SOUWER et al., 2010). Alguns estudos sugerem que esta citocina desempenha um papel na sustentação das doenças alérgicas (SOUWER et al., 2010). Em 2001, o grupo de WONG dosou algumas citocinas em pacientes asmáticos e controles saudáveis e observaram que o nível plasmático de IL-17 estava aumentado nos asmáticos quando comparados com os controles. Já MOLET

et al. (2001) demonstrou que na saliva e no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos o número de células IL-17 positivas é significativamente maior em comparação aos controles, além de relatar pela primeira vez, que os eosinófilos das vias aéreas destes mesmos pacientes asmáticos também são uma fonte potencial de IL-17, sugerindo uma amplificação da resposta inflamatória na doença alérgica.

PROSTAGLANDINAS – MEDIADORES LIPÍDICOS

Os lipídeos, juntamente com as proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, são as principais macromoléculas biológicas. Geralmente apresentam alto valor calórico e são os principais constituintes das membranas biológicas e podem atuar como mediadores capazes de agir sobre células alvo que apresentam receptores específicos (CANAVACI, 2007).

Os metabólitos oriundos da oxidação do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (PAF) são exemplos de mediadores lipídicos. Com uma ação parácrina estes metabólitos, derivados de fosfolipídios presentes na membrana celular ou em compartimentos intracitoplasmáticos como os corpos lipídicos, apresentam um importante efeito regulatório sobre as células do sistema imunológico (PERES et al, 2005; VENKATESH et al., 2006; LANGE et al., 2006; CANAVACI, 2007), através da liberação de citocinas e quimiocinas (NICOLETE, 2008).

O ácido araquidônico, que é um ácido graxo essencial, é liberado a partir dos lipídios de membrana e outros ésteres lipídicos pela ação de enzimas como a fosfolipase A₂ (PLA₂). O ácido araquidônico livre pode gerar diversos metabólitos biologicamente ativos, chamados eicosanóides (CANAVACI, 2007), basicamente por duas vias enzimáticas distintas, que se distribuem de modo variável em células diferentes. As prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) se formam pela via das ciclooxigenases (COX) -1 ou -2, ao passo que os leucotrienos (LTs), as lipoxinas

(LXs) e os ácidos hidroxi-eicosatetraenóico (HETE) e hidroperoxi-eicosatetraenóico (HPETE) se formam pela via das lipoxigenases (LOX) (ROCCA e FITZGERALD, 2002).

A metabolização do ácido araquidônico pelas lipoxigenases (5-, 12-, 15-lipoxigenase) sendo a 5-lipoxigenase a mais estudada, leva à síntese dos leucotrienos (leucotrieno B₄, C₄, D₄ e E₄) que participam de inúmeras doenças inflamatórias e/ou alérgicas (BERGER et al., 2007; SHIMIZU, 2009).

Por terem sido primeiramente descobertas e isoladas no líquido seminal, como secreção da próstata, as prostaglandinas foram assim denominadas, sendo que o sufixo “glandinas” é associado à glândula. Atualmente sabe-se que as PGs estão presentes em todos os tecidos, exercendo várias funções e que após sofrerem ciclização pelas ciclooxigenases formam um anel ciclopentano (BELL-PARIKH et al., 2003).

A nomenclatura das prostaglandinas descreve dez grupos moleculares específicos, designados pelas letras A – J, que se caracterizam por variações nos grupos funcionais ligados ao anel ciclopentano.

A síntese das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico livre começa pela oxigenação e ciclização de um anel pentano, através da ação das ciclooxigenases, levando a formação de um endoperóxido instável, a PGG₂, que logo é reduzida a PGH₂, sob a ação da peroxidase. Prostaglandinas sintases de células específicas catalisam a conversão de PGH₂ em produtos finais biologicamente ativos, como PGE₂, PGF₂, PGD₂, e tromboxano A₂ (ROCCA e FITZGERALD, 2002; CANAVACI, 2007; ZINGARELLI e COOK, 2005).

Em geral, as prostaglandinas contribuem para a inflamação, promovendo a vasodilatação, extravasamento vascular, dor, podendo regular a diferenciação de linfócitos B, e outros perfis, como linfócitos Th17 e T reguladores (CRUZ, 2004) além da ativação de células do sistema imune (linfócitos T) durante a resposta inflamatória, que são responsáveis pela captura, fagocitose de antígenos e secreção de citocinas e quimiocinas. Além disso, as PGs têm efeitos importantes sobre os músculos lisos, sistema nervoso, sistema gastrointestinal dentre outros (TSUBOI et al., 2002; SCHER e PILLINGER, 2005).

Além dos efeitos descritos acima, os mediadores neoformados têm múltiplos efeitos, transitórios, vasoativos, quimiotáticos e ativadores sobre leucócitos e plaquetas (BARRADAS, 2010).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) sinergiza nos sítios inflamatórios, com outros mediadores solúveis da inflamação como a histamina e a bradicinina induzindo ao aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia (USHIKUBI et al., 2000), além de ser o principal produto da ciclooxigenase em uma série de processos fisiológicos, cujos resultados podem ter efeitos tanto anti quanto pró-inflamatórios (HATA e BREYER, 2004). Estudos sugerem que esta PG modula a polarização em Th2, uma vez que na presença de PGE₂, células dendríticas produzem menor quantidade de IL-12, e conseqüentemente menores níveis de IFN- γ são gerados (KAPSENBERG et al, 1999; VIEIRA et al., 2000). Outros pesquisadores demonstraram que células dendríticas de pacientes alérgicos produzem mais PGE₂, do que àquelas comparadas dos indivíduos controles (LONG et al., 2004).

A prostaglandina D₂ (PGD₂), que é sintetizada em vários tecidos, é a principal prostaglandina liberada por mastócitos, e medeia a vasodilatação e/ou vasoconstrição, broncoconstrição, inibe a agregação plaquetária, além de modular respostas alérgicas e a quimiotaxia de linfócitos Th2 e eosinófilos (ELLIS et al., 1979; LEWIS et al., 1981; ALVING et al., 1991; ITO, 1989; DUMITRASCU, 1996; HERSCHMAN, 1996; MATSUOKA et al., 2000; HIRAI et al., 2001; KANAOKA e URADE, 2003). De acordo com MATSUOKA et al. (2000) esta prostaglandina parece estar intimamente relacionada ao desenvolvimento de doenças alérgicas, uma vez que animais deficientes no receptor para este mediador apresentam menores concentrações de IgE após sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA).

Estudos recentes demonstraram a descoberta da 15-deoxy- Δ ^{-12,14} -PGJ₂ (15d-PGJ₂), uma prostaglandina ciclopentânica, que exerce efeitos anti-inflamatórios sobre o sistema imune (SCHER e PILLINGER, 2005; ZINGARELLI e COOK, 2005; NAPIMOGA et al, 2008a). A produção das PGs ciclopentânicas está relacionada com a resposta celular ao estresse (atividade cicloprotetora) com atividade anti-proliferativa (CRUZ, 2004).

A síntese da 15d-PGJ₂ inicia-se com a ação seqüencial de três enzimas (SCHER e PILLINGER, 2005), que culminam com a formação da PGH₂ que é logo convertida em PGD₂ sob a ação de uma enzima específica, a PGD sintase, mostrando que a 15d-PGJ₂ é derivada da PGD₂. A PGD₂ sofre, espontaneamente, uma desidratação no anel ciclopentano formando a PGJ₂. Mais uma desidratação, catalizada pela presença de albumina leva à produção de Δ ¹²-PGJ₂ e quando não há a presença de albumina há a formação da 15-deoxy- Δ ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂) (ZINGARELLI e COOK, 2005). Na Figura 5, observamos um esquema da síntese da família da PGJ₂, com seus principais precursores.

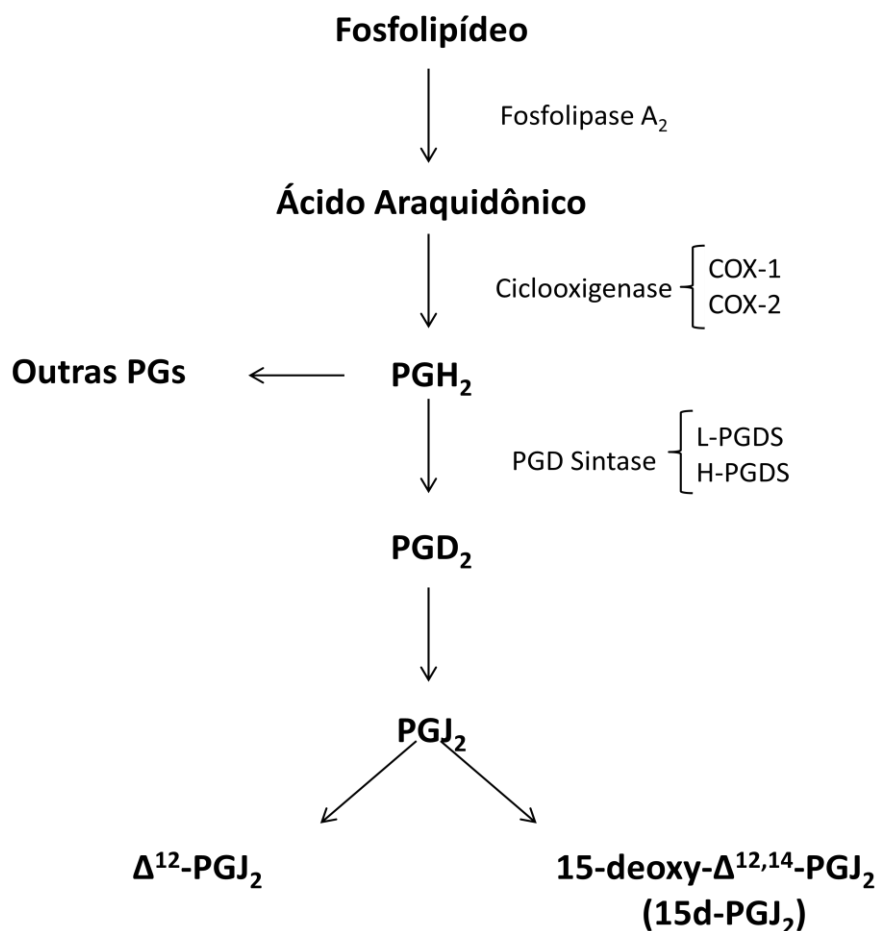


Figura 5 – Síntese esquemática de 15-deoxy- Δ ^{12,14}-PGJ₂.
Fonte: Adaptado de MIWA et al., 2004

Uma vez sintetizadas as PGs são liberadas ou exportadas para o espaço extracelular, agindo de maneira autócrina ou parácrina (SCHER e PILLINGER, 2005).

Apesar de se conhecer os mecanismos intracelulares de ação dos agonistas do PPAR- γ , não se conhece ao certo os mecanismos pelos quais a 15d-PGJ₂ entra nas células, mas acredita-se que seja por meio de transporte ativo ou então pelo auxílio dos receptores de membrana DP₁ e DP₂, este último também conhecido como CRTH₂ (do inglês, Chemoattractant Receptor on Th2 Cells) (NARUMIYA e FUKUSHIMA, 1986; SCHER e PILLINGER, 2005). O receptor DP₂ tem sido identificado expresso exclusivamente em células Th2, células T citotóxicas, eosinófilos e basófilos (HIRAI et al, 2001), podendo desempenhar um papel na inflamação alérgica através da indução do recrutamento quimiotático e/ou ativação de células Th2, eosinófilos e basófilos (TANAKA et al., 2004).

RECEPTORES ATIVADORES DE PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS (PPAR)

Receptores ativadores de proliferação de peroxissomos (PPARs, do inglês, peroxisome proliferator-activated receptors) são membros de uma superfamília de receptores nucleares (LEMBERGER, 1996; NAPIMOGA et al., 2008a), que são encontrados em muitos tipos celulares, incluindo células musculares lisas vasculares, monócitos, macrófagos, fibroblastos e precursores da medula óssea humana (GREENE et al., 1995; BRAISSANT et al., 1996; SCHER e PILLINGER, 2005), funcionando como fatores transcricionais que controlam a regulação de genes pró-inflamatórios. Há três diferentes isoformas descritas em mamíferos, os quais são codificados por diferentes genes além de possuírem diferentes promotores, são eles: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR- γ (MANGELSDORF et al., 1995; ZHU et al., 1995; ZINGARELLI e COOK, 2005). As três isoformas possuem padrões distintos em relação à distribuição celular e de tecidos.

Originalmente, sabia-se que o PPAR- γ era expresso em adipócitos e hepatócitos, porém atualmente, o PPAR- γ é encontrado em macrófagos, monócitos, miócitos, fibroblastos, células precursoras de medula (BRAISSANT et al., 1996) e linfócitos B (PADILLA et al., 2000). Outras células também expressam o receptor PPAR- γ , sendo HARRIS e PHIPPS (2001), os primeiros a relatarem a expressão de PPAR- γ , em linfócitos T naives e ativados de camundongos, assim como o estudo de UEKI e cols (2003), que identificaram, pela primeira vez, a sua expressão em eosinófilos humanos em cultura estimulados ou não com IL-5.

O PPAR- γ é importante na regulação da proliferação dos adipócitos, aceleração da degradação dos leucotrienos, carcinogênese, arteriosclerose, inflamação e proliferação celular (ZINGARELLI e COOK, 2005). Acredita-se que o PPAR- γ em estado inativado esteja conjugado com proteínas co-repressoras, localizado no citoplasma ao invés do núcleo (BISHOP-BAILEY e HLA, 1999). A ligação do PPAR e seus agonistas induzem a dissociação do PPAR de seus repressores, e permite a interação com co-ativadores (por exemplo; receptores esteróides), o que resulta na translocação deste do citoplasma para o núcleo (ZHU et al., 1997). O resultado desta translocação é a ativação da expressão ou repressão de uma variedade de genes (NEGISHI e KATOH, 2002).

Existem agonistas naturais de PPAR- γ (15d-PGJ2) e também uma grande variedade de agonistas sintéticos, sendo que os mais utilizados pertencem a classe das drogas antidiabéticas dos glitazones, utilizado no tratamento da diabetes tipo 2 (YKI-JARVINEN, 2004). Estão incluídas nesta classe drogas como rosiglitazone, pioglitazone, ciglitazone e troglitazone. Os glitazones têm função hipoglicemiante através da estimulação do receptor PPAR- γ (BERGER et al., 1996). Nos últimos anos, entretanto, inúmeros estudos têm demonstrado que os benefícios terapêuticos dos agonistas de PPAR- γ vão além do uso contra o diabetes, aumentando a evidência do potencial antiinflamatório contra uma variedade de modelos experimentais que variam de pancreatite a sepse (BELVISI et al., 2006), reduz lesões artríticas e a reabsorção óssea em ratos (KOUFANY et al., 2008), efeito antiinflamatório (NAPIMOGA et al., 2008a; ALVES et al., 2011), inibidor da dor inflamatória (NAPIMOGA et al., 2008b; PENA-DOS-SANTOS et al., 2009) além de

evidências do possível emprego destes agonistas a fim de minimizar a reabsorção óssea na doença periodontal (DI PAOLA et al., 2006; HASSUMI et al., 2009) e inflamações cerebrais (SAITO et al., 2007).

PPAR- γ e outros membros dessa superfamília caracterizam-se pela necessidade de se ter um ligante antes de sua ativação. Uma vez ativados pelos ligantes agonistas, como a 15d-PGJ₂ e os glitazones, o PPAR- γ forma um heterodímero com o receptor de ácido retinóico (RXR) implicando em três mecanismos de repressão dos genes pró-inflamatórios. Estes mecanismos incluem o recrutamento de co-ativadores que inibem a ativação de vários fatores de transcrição, que promoveriam um aumento na expressão de moléculas de adesão, moduladores apoptóticos e mediadores inflamatórios (ZINGARELLI e COOK, 2005), como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), ativador de proteína-1 (AP-1), transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STATs) e fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (RICOTE et al, 1998a; SCHER e PILLINGER, 2005); incluem, também, a capacidade de ligação direta do PPAR- γ -RXR com o NFAT, com as subunidades p50 e p65 do NF- κ B, com a proteína kinase ativada por mitógeno (MAP-kinase) e com a c-Jun kinase amino terminal (JNK), que reprimem a expressão de genes pró-inflamatórios (ZINGARELLI e COOK, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que a ativação do PPAR- γ pela 15d-PGJ₂ produz efeitos anti-inflamatório. Estudos com monócitos/macrófagos demonstraram que o agonista natural do PPAR- γ , a 15d-PGJ₂, pode ser a responsável pela inibição de genes que codifica IL-1 β , TNF- α , iNOS, metaloproteinase 2 e ciclooxygenase-2 (JIANG et al., 1998; RICOTE et al., 1998b; RICOTE et al, 1999; NAPIMOGA et al, 2008a). Estas observações vislumbram a possibilidade dos agonistas de PPAR- γ serem um potencial composto terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias. Entretanto, outros estudos não conseguiram demonstrar o efeito inibitório da 15d-PGJ₂ com relação a expressão de TNF- α e IL-6 em culturas de monócitos/macrófagos (THIERINGER et al., 2000). Em estudo realizado utilizando o rosiglitazone, um agonista sintético do PPAR- γ , os autores não conseguiram reduzir a secreção de IL-8 após estimulação com LPS em linhagem celular monocítica, mas observaram a diminuição da expressão de metaloproteinase-9 (MMP-9).

Em estudo recente, Zingarelli et al. (2007) demonstrou *in vitro* que os agonistas do PPAR- γ , ciglitazone e a 15d-PGJ₂, modulam a sinalização intracelular em modelo de isquemia e reperfusão. Os autores demonstraram que o ciglitazone diminui a ativação do ligante de transcrição do DNA, o fator NF- κ B que inibe em seqüência a atividade da proteína IKK, fundamental para a transcrição do DNA. Em consequência desta diminuição, os autores sugerem que devido a inibição do fator NF- κ B pelo ciglitazone, ocorre a diminuição da síntese de TNF- α e, conseqüentemente, reduz a infiltração de neutrófilos, sugerindo uma modulação negativa desta citocina e das moléculas de adesão ao nível genético.

Foi demonstrado que monócitos pré-incubados com rosiglitazone modula negativamente a reorganização da polimerização de actina devido a estimulação da sinalização de Ca²⁺ e inibição da fosforilação da via Akt, importante para o início do processo (SINGH et al., 2005). Dados do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o agonista natural do receptor PPAR- γ , diminui o infiltrado inflamatório, especialmente os neutrófilos, devido entre outros fatores, a diminuição da expressão de ICAM-1 no endotélio dependente de óxido nítrico (NAPIMOGA et al., 2008a). Em outro estudo de nosso grupo, o agonista de PPAR- γ , a 15d-PGJ₂, inibiu a dor inflamatória através da estimulação da liberação de opióides por macrófagos (NAPIMOGA et al., 2008b). Thompson et al. (2007) sugere que o efeito antiinflamatório do rosiglitazone é devido à capacidade deste em estimular a produção de IL-10 de células dendríticas e linfócitos T CD4+.

Embora haja, na literatura, a descrição do papel dos PPARs em várias doenças inflamatórias, o possível papel dos PPARs na doença inflamatória alérgica, como a asma, foi descrito em 2003 (TRIFILIEFF et al., 2003). Com o auxílio de técnicas de imunofluorescência de biopsias de tecido broncoalveolar obtido de pacientes asmáticos, Benayoun et al. (2001), demonstraram que os eosinófilos e os macrófagos são as principais células que expressam os receptores PPAR- γ na submucosa broncoalveolar. Além disso, a expressão do PPAR- γ estava aumentada nos pacientes asmáticos se comparados aos pacientes que não apresentavam tal condição. Ward e colaboradores (2002) demonstraram que a 15d-PGJ₂ é capaz de induzir a apoptose de eosinófilos de maneira independente de PPAR-gama, provavelmente envolvendo o NF- κ B. Outro estudo sugere que a ativação de PPAR- γ suprime a expressão da COX-2 prevenindo a ativação e a translocação do NF- κ B.

Além disso, PACIENZA e cols (2010), mostraram pela primeira vez, que a 15d-PGJ₂ tem um efeito regulatório negativo na sobrevivência dos progenitores hematopoiéticos. Agonista sintético de PPAR- γ , ciglitazone, diminuiu consideravelmente a produção de IgE e a eosinofilia, com concomitante diminuição de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (WOERLY et al., 2003).

Atualmente não existem tratamentos inteiramente satisfatórios para a asma alérgica, e o controle da doença se baseia no controle dos sintomas e por isso os glucocorticóides, que são potentes agentes antiinflamatórios, vêm sendo adotados. Além disso, os glucocorticóides também são empregados no tratamento da asma e outras doenças inflamatórias crônicas, por inibirem principalmente a migração celular (DAS et al., 1997; GETTING et al., 1997). Para se estudar os mecanismos envolvidos no recrutamento de eosinófilos em diferentes modelos experimentais, pesquisadores têm utilizado glucocorticóides, que são capazes de bloquear a liberação e/ou a ação de diferentes mediadores (LAPA e SILVA et al., 1995; WHELAN, 1996; EUM et al. 1996), interferindo assim no recrutamento eosinofílico. Embora os glucocorticóides sejam drogas amplamente usadas para o tratamento destas doenças, há pacientes que com a retirada do medicamento apresentam uma exacerbação dos sintomas ou ainda desenvolvem um quadro de resistência à ação terapêutica dos glucocorticóides (MURPHY et al, 2010), além de estarem associados com efeitos sistêmicos adversos (RICHARDS et al., 2010).

Os agonistas naturais de PPAR- γ , assim como os sintéticos, podem ser boas ferramentas terapêuticas na intervenção da asma e doenças alérgicas, uma vez que possivelmente possam beneficiar os portadores destas doenças não apenas na melhora dos sintomas, mas através da atuação nos mecanismos patológicos, como ocorre com o ciglitazone que é capaz de inibir os efeitos das quimiocinas liberadas pelas células epiteliais (SERHA e DEVCHAND, 2001), ou seja, age como componente antiinflamatório, impedindo a migração celular.

IMPLANTE DE CLARA DE OVO COAGULADA: UM IMPORTANTE MODELO DE EOSINOFILIA ALÉRGICA

Os estudos em modelos animais são essenciais para o melhor entendimento fisiológico e imunopatológico das diversas doenças que acometem o homem. E é a partir disso que é possível o desenvolvimento de novas e efetivas terapias e drogas que auxiliarão o tratamento das mais diversas doenças.

No entanto, nenhum modelo experimental reproduz todas as características das doenças humanas, sendo então freqüentemente questionado sobre a validade destes modelos. Em uma doença como a asma alérgica, uma doença complexa, esses questionamentos fazem parte da rotina. No entanto, os pesquisadores tentam focar nos caminhos que geram a inflamação alérgica através da sensibilização e do desafio dos animais com uma variedade de proteínas estranhas (BATES et al., 2009), levando ao desenvolvimento das principais características da doença, como a resposta imune alérgica, caracterizada principalmente pela eosinofilia e pelo aumento de produção de imunoglobulinas (EPSTEIN, 2004).

Os camundongos são a espécie de escolha na indução do modelo de alergia, pois eles apresentam algumas características que os tornam viáveis, como serem pequenos, o que facilita o manuseio, rápida reprodução além da possibilidade de manipulação genética, produzindo animais transgênicos e com deleções gênicas (TORRES et al., 2005). Dentre as linhagens de camundongos, a mais comumente usada é a BALB/c, uma vez que estes animais exibem uma tendência geneticamente determinada para desenvolver uma resposta imune desviada para Th2 (BRUGIOLO, 2010). No entanto, LU e cols (2010) encontraram, após indução com OVA, inflamação eosinofílica (na medula óssea, sangue e pulmão) semelhante tanto na linhagem Balb/C quanto na C57Bl/6.

Vários protocolos têm sido empregados, mas a maioria dos modelos de indução de alergia utiliza uma sensibilização sistêmica com diferentes tipos de proteínas associados à um adjuvante, seguida por um período de novo desafio, que

consiste na re-exposição do animal frente ao antígeno (ZOSKY e SLY, 2007; SCHRÖDER e MAURER, 2007). Um dos antígenos empregados é a proteína ovalbumina (OVA), um alérgeno alimentar que apesar de não representar um alérgeno pulmonar relevante no homem, é um dos antígenos mais empregados em modelos experimentais de alergia, devido a facilidade para sua obtenção e capacidade de induzir resposta imune mediante imunização, que é claramente mediada por linfócitos Th2 juntamente com infiltrado eosinofílico e alta produção de imunoglobulinas OVA-específicas, além da produção de citocinas do perfil Th2, como a IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (CASTRO, 2010). Alguns adjuvantes como o hidróxido de alumínio são conhecidos por promover o desenvolvimento do fenótipo Th2 (BREWER et al., 1999), mas há outros, como o adjuvante completo de Freund, que promovem uma resposta baseada no perfil Th1, além disso os adjuvantes podem levar à exclusão dos modelos animais, uma vez que podem afetar o mecanismos de sensibilização dos alérgenos (ZOSKY e SLY, 2007).

A asma é uma doença pulmonar crônica onde o proeminente infiltrado eosinofílico é um dos traços característico da doença (MARTIN et al., 1996). Assim é interessante um modelo que mimetize isto. Apesar dos diversos modelos já descritos na literatura, todos eles requerem o uso de adjuvantes nas imunizações e alguns deles não apresentam a resposta típica da fase tardia da hipersensibilidade tipo I, como a que ocorre nos humanos (PRETOLANI e VARGAFTIG, 1993).

Um modelo experimental descrito por FACINONE e cols em 1997, o modelo de implante de clara de ovo (em inglês, Egg White Implant – EWI), reproduz as reações de fase tardia da hipersensibilidade imediata, que é caracterizada por recrutamento de leucócitos, principalmente os eosinófilos e células Th2, com síntese de imunoglobulina alérgeno-específica, e inflamação, para o local de inoculação do antígeno na estimulação alérgica.

A eosinofilia que se desenvolve é de base alérgica, uma vez que a provocação destes animais por via respiratória com ovalbumina 15 dias após a cirurgia leva ao desenvolvimento de intensa eosinofilia pulmonar, e ao surgimento de hiperreatividade broncopulmonar, que lembram os achados histológicos e funcionais da asma humana. 48h após a provocação alérgica com 600 µg de ovalbumina intratraqueal, o grupo de animais implantados (EWI) apresentou uma porcentagem

de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) bastante elevada (35%), inclusive se comparada a um grupo de animais imunizados com ovalbumina - alúmen (10.4%) (SIQUEIRA et al., 1997).

Várias vantagens são descritas para o modelo de EWI: que é um modelo de fácil manuseio, barato, de fácil reprodutibilidade em diferentes linhagens de diferentes espécies, como em ratos; não requer o uso de adjuvantes ou imunização com múltiplos estímulos; o alérgeno persiste por longo período de tempo no animal, o que se assemelha à exposição alergênica contínua como a presente no meio ambiente, possui um perfil associado ao padrão Th2, induz lesões pulmonares de longa duração como as encontradas nos humanos com asma, além de eosinofilia na medula óssea (SIQUEIRA et al, 1997; RUSSO et al., 1997). Sendo assim a indução da eosinofilia pelo modelo de EWI induz uma sensibilização contra a OVA de longa duração, o que torna este modelo de estudo estável no que diz respeito à ao recrutamento eosinofílico e à eosinopoiese, uma vez que a eosinofilia está presente por mais de 30 dias (CHERAIM et al, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Os ligantes de PPAR- γ demonstraram regular negativamente as células do sistema imune inato e adaptativo, além de apresentarem excelentes resultados em diferentes modelos *in vivo* de doenças inflamatórias, vislumbrando o uso destes ligantes como possíveis agentes terapêuticos nas diferentes doenças. Entretanto, pouco se sabe sobre o uso destes ligantes e a relação com os eosinófilos e os processos alérgicos.

3 HIPÓTESE

Com base nos dados já descritos, nossa hipótese é de que os agonistas sintéticos e naturais de PPAR- γ possuem efeito imunomodulatório sobre a eosinopoiese e sobre o recrutamento eosinofílico, sendo também um potencial agente terapêutico em doenças inflamatórias mediadas por intenso infiltrado eosinofílico.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Confirmar a validade do modelo de eosinofilia quanto ao recrutamento de eosinófilos para a cavidade peritoneal à eosinopoiese em camundongos, após os mesmos sofrerem um implante subcutâneo de clara de ovo coagulada pelo calor (Egg White Implant, EWI), e avaliar se os agonistas de PPAR- γ , a 15d-PGJ₂ e Rosiglitazone, possuem atividades inibitórias sobre o recrutamento eosinofílico.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Confirmar a especificidade da resposta à ovalbumina em animais imunizados (EWI);

4.2.2 Avaliar se a 15d-PGJ₂ e o Rosiglitazone possuem atividade antiinflamatória no modelo de EWI;

4.2.3 Avaliar se a administração de 15d-PGJ₂ e de Rosiglitazone influenciam na liberação de citocinas, no acúmulo de eosinófilos para a cavidade peritoneal e na eosinopoiese destes camundongos;

4.2.4 Determinar a curva dose-resposta de ambas as drogas, 15d-PGJ₂ e Rosiglitazone, através da contagem do número de eosinófilos para o foco inflamatório (peritônio) assim como avaliar a eosinopoiese (medula óssea);

4.2.5 Quantificar as citocinas no lavado peritoneal, pelo método de ELISA;

4.2.6 Quantificar a imunoglobulina IgE no soro destes animais, pela técnica de ELISA;

4.2.7 Avaliar o papel da IL-33, da IL-17 e da IL-23 no recrutamento eosinofílico, pela técnica de ELISA.

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (ANDERSEN, 2004; MEZADRI *et. al*, 2004). O Projeto de Pesquisa do presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba (CEP-UNIUBE) sob o protocolo nº 049/2009 (Anexo A).

5.2 Animais Utilizados

Neste trabalho foram utilizados camundongos isogênicos machos, da linhagem C57Bl/6 selvagem (C57Bl/6 WT) e C57Bl/6 IL17^{-/-}, com peso médio de 20g e entre 6 a 8 semanas de idade, sendo que os animais C57Bl/6 WT foram provenientes do Biotério Central da Universidade de Uberaba e os animais C57Bl/6 IL17^{-/-} oriundos do Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo claro/escuro 12h), e com alimento e água *ad libitum*.

Para o delineamento experimental definimos os seguintes grupos experimentais:

GRUPOS CONTROLES:

- Animais C57Bl/6 WT operados sem implante de OVA (SHAM) + desafio com PBS¹.
- Animais C57Bl/6 WT operados sem implante de OVA (SHAM) + desafio com OVA².
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com PBS.
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA.
- Animais C57Bl/6 IL-17^{-/-} operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA.

GRUPOS DE TRATAMENTO COM AGONISTAS DE PPAR- γ :

- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 100 μ g/Kg de 15d-PGJ₂³.
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 300 μ g/Kg de 15d-PGJ₂.
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 1000 μ g/Kg de 15d-PGJ₂.
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 1mg/kg de RGZ⁴.

¹ Phosphate Buffered Saline 1x – diluente das drogas

² Ovalbumina - 10 μ g/animal

³ Agonista Natural de PPAR- γ

⁴ Agonista Sintético de PPAR- γ (RGZ = Rosiglitazone)

- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 3mg/kg de RGZ.
- Animais C57Bl/6 WT operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 10mg/kg de RGZ.
- Animais C57Bl/6 IL-17^{-/-} operados com implante de OVA (EWI) + desafio com OVA + 1000µg/Kg de 15d-PGJ₂.

5.3 Ovalbumina coagulada pelo calor

Clara de ovo de galinha liofilizada (ITO AVICULTURA, BRASIL) foi dissolvida em água destilada,, a uma concentração final de 100g/L, e dispensada 45µL por poço em uma placa de 96 poços (4,5mg/well). A coagulação pelo calor se deu em microondas (90 segundos a 900W). Os pellets formados foram recuperados e desidratados em etanol absoluto por 48hs. Os pellets desidratados foram armazenados a temperatura de 4°C até o uso. Os fragmentos de clara de ovo coagulada pelo calor foram reidratados em PBS 1x por 2 horas antes da implantação nos animais (CHERAIM et al, 2008).

5.4 Imunização e Desafio Alergênico

A imunização foi avaliada em camundongos Balb/c e C57Bl/6 e C57Bl/6 IL17^{-/-}, após a aplicação do modelo de implante subcutâneo de clara de ovo (ovalbumina) como descrito por Cheraim et al. (2008).

No dia 0, os animais foram anestesiados intraperitonealmente, com tribromoetanol (250mg/Kg), fez-se uma tricotomia e assepsia no local com álcool iodado 0,1% antes da incisão. Uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita, e colocou-se um fragmento de ovalbumina coagulada pelo calor no tecido subcutâneo do dorso dos animais (sendo estes animais definidos como: Egg White Implant – EWI), antes de suturar o corte. Transcorridos 15 dias, uma estimulação alergênica foi realizada através administração intraperitoneal de ovalbumina (10ug/animal diluída em 200µL de PBS). A concentração de ovalbumina utilizada para a estimulação alergênica foi baseada em trabalho prévio (CHERAIM et al., 2008). Animais controle foram submetidos à cirurgia sem a inoculação do implante de ovalbumina, sendo denominados animais SHAM. A eutanásia dos animais ocorreu 48 horas após a estimulação alergênica dos mesmos. Sendo que para a definição do melhor dia para a eutanásia, fez uma curva de recrutamento eosinofílico em 24hs, 48hs e 72hs, estabelecendo-se 48hs como o dia em que houve o maior recrutamento destas células para a cavidade peritoneal. Na Figura 6 é possível observar um esquema simplificado da imunização.

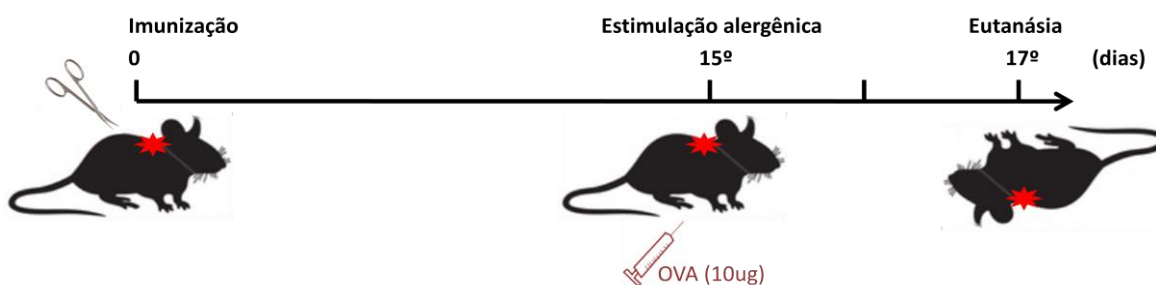


Figura 6 – Esquema simplificado do Processo de Imunização e Desafio Alergênico.

5.5 Administração dos agonistas de PPAR-γ

Para investigar os efeitos dos fármacos aqui empregados sobre a migração de eosinófilos induzida pela ovalbumina, a administração das drogas deu-

se no 15º dia após a imunização dos animais, sendo o esquema de tratamento feito da seguinte forma: (a) os animais foram pré-tratados, por via subcutânea, com diferentes doses de 15d-PGJ₂ (100 µg/Kg, 300 µg/Kg; 1000 µg/Kg) 30 minutos antes da estimulação alérgênica e a cada 12 horas após, sendo a migração eosinofílica avaliada 48 horas após este desafio (Figura 7). Em um grupo de animais utilizou-se PBS como controle (veículo do fármaco); (b) o grupo tratado com o agonista sintético, rosiglitazone, recebeu, por via oral, também diferentes doses do fármaco (1mg/Kg; 3mg/Kg; 10mg/Kg), 30 minutos antes da estimulação e 24 horas após, sendo a avaliação da migração eosinofílica realizada 48 horas após o desafio com ovalbumina intraperitonealmente (Figura 8).

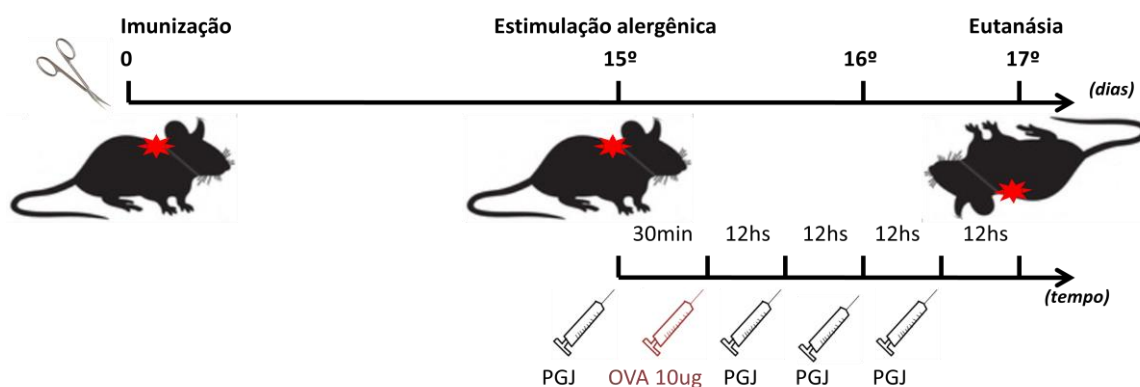


Figura 7 – Esquema simplificado do Tratamento com o Agonista Natural – 15d-PGJ₂.

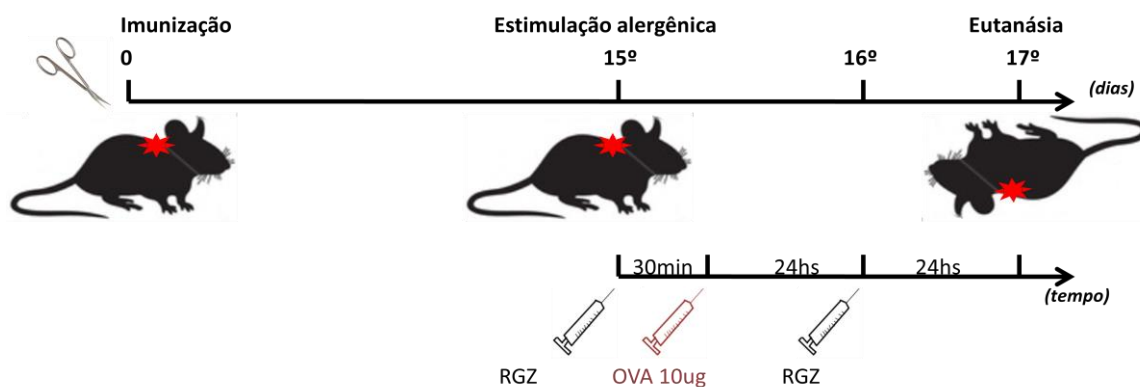


Figura 8 – Esquema simplificado do Tratamento com o Agonista Sintético – Rosiglitazone.

5.6 Avaliação da imunomodulação dos agonistas de PPAR- γ no modelo de eosinofilia

5.6.1 Obtenção das Células do Lavado Peritoneal

A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical, sendo a cavidade peritoneal lavada com 3mL de PBS acrescido de EDTA, com o auxílio de uma seringa de 10mL e agulha 25x7, sendo a contagem total de células realizada pelo método de coloração com solução de Azul de Türk, em hemocitômetro manual (Câmara de Neubauer). A contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga (Cytospin® 3; Shandon Lipshaw Inc; Pittsburgh, Pennsylvania, EUA), os quais foram submetidos à coloração para peroxidase resistente ao cianeto (TEN *et al.*, 1989) e contra-coloração em Hematoxilina de Harris sendo as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Uma parte do volume coletado durante o lavado foi armazenada a -70°C, para posterior dosagens das citocinas.

5.6.2 Obtenção das Células da Medula Óssea

Após a eutanásia dos animais, por deslocamento cervical, e assepsia do local, os dois fêmures de cada animal foram retirados com auxílio de material cirúrgico estéril (pinças e tesouras), e transferidos para uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro (CORNING) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 1% de soro fetal bovino. O canal medular foi lavado com o meio de cultura contido na placa, utilizando-se uma seringa de 10 mL e agulha 25x7. Após esse procedimento, a

suspensão celular foi transferida para um tubo de 50 mL (Falcon®), homogeneizada e preparada para a contagem pelo método de coloração com solução de Azul de Türk, em hemocítômetro manual.

A contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga (Cytospin® 3; Shandon Lipshaw Inc; Pittsburgh, Pennsylvania, EUA), os quais foram submetidos à coloração para peroxidase resistente ao cianeto (TEN *et al.*, 1989) e contra-coloração em Hematoxilina de Harris sendo as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x).

5.6.3 Obtenção de Soro

O soro dos animais foi obtido do sangue total colhido através de punção do plexo venoso retro orbital, a centrifugação à 1200 rpm por 5 minutos, para a separação do soro, e este foi armazenado em eppendorfs e congelados a -70°C para posterior dosagem da IgE.

5.6.4 Quantificação de Citocinas e Imunoglobulina

As citocinas (IL-5, IL-33, IL-17 e IL-23) foram quantificadas a partir de alíquotas da suspensão obtida no lavado peritoneal. Já a dosagem de imunoglobulina (IgE) foi feita a partir de soro obtido do sangue total dos animais, sendo ambas dosagens feitas por ensaio imunoenzimático (ELISA), tipo sanduíche, utilizando anticorpos comercialmente disponíveis (R&D Systems e BD OptEIA™, BD

Pharmingen, USA). Placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (Corning Star) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura (100µL/poço) contra cada citocina e imunoglobulina (anti-IL-5; anti-IL-23; anti-IL-33 e anti-IL-17A: R&D Systems e anti-IgE: BD OptEIA™, BD Pharmingen, USA) diluídos em tampão de sensibilização e incubadas overnight à 4°C (IgE) ou em temperatura ambiente (demais citocinas). Após a incubação foram feitas sucessivas lavagens com tampão de lavagem (tampão fosfato acrescido de Tween20, Sigma, St. Louis, MO) e as mesmas foram secadas por inversão. Adicionamos em cada poço PBS contendo 1% de BSA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) e incubamos por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio os poços foram novamente lavados e secados, seguindo com a adição de 100 µL das amostras coletadas previamente para a quantificação. A curva-padrão com as citocinas recombinantes possuem 8 pontos, em diluições seriadas, com pico máximo de 100ng/ml (IgE), de 1000pg/ml (IL-33 e IL-17), de 2000pg/ml (IL-5) e de 2500pg/ml (IL-23). Após a incubação da placa contendo as amostras e os recombinantes foram cobertas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente o procedimento de lavagem foi repetido e adicionado 100 µl em cada poço dos respectivos anticorpos de detecção biotinilado, diluídos em tampão de bloqueio na concentração que varia de 100ng/ml a 800ng/ml. Percorrido 2 horas de incubação à temperatura ambiente novo ciclo de lavagens foi realizado, e em seguida feito a amplificação da reação com adição de 100 µl de estreptoavidina (streptavidin-HRP) em cada poço por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após novo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 µl de solução de substrato, contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB) (BD, Pharmigen, San Diego, CA), e as placas foram incubadas novamente por 20 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. As reações foram bloqueadas adicionando à cada poço 50 µl solução de parada contendo ácido sulfúrico (H₂SO₄) à 0,8%. A densidade ótica foi avaliada utilizando leitor de microplacas (Thermoplate TO Reader) em 450 nm e a concentração das citocinas e imunoglobulina calculadas a partir da curva-padrão. Todos os procedimentos realizados seguiram as instruções dos fabricantes.

5.7 Técnica de Coloração

5.7.1 Preparo do Esfregaço e Coloração para Peroxidase Resistente ao Cianeto

As células oriundas da medula óssea e do lavado peritoneal foram citocentrifugadas - citocentrífuga Cytospin® 3 (Shandon Lipshaw Inc; Pittsburgh, Pennsylvania, EUA), por 5 minutos a 700rpm. As células presentes nas lâminas foram coradas pela técnica descrita e desenvolvida por Ten e colaboradores (1989), onde à solução de PBS adiciona-se o cromógeno DAB – diaminobenzidine (Sigma), juntamente com cianeto de potássio 600mM (pois a peroxidase do eosinófilo de camundongo é a única resistente à adição de cianeto ao sistema) e peróxido de hidrogênio à 30%. Este tampão foi adicionado sobre as células e incubado por aproximadamente 30 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente as células foram lavadas com PBS e contra coradas com Hematoxilina de Harris por 10 minutos. Os eosinófilos corados por esta técnica aparecem como células marcadas com um precipitado marrom nos seus grânulos citoplasmáticos e um núcleo corado em roxo pela hematoxilina, enquanto as demais células, mesmo que possuam peroxidase, aparecem coradas apenas de roxo, pois suas peroxidases são inativadas pelo cianeto, permitindo assim a fácil diferenciação entre os eosinófilos e as demais células.

5.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados por uma distribuição normal e depois submetidos a One-way Analysis of Variance (ANOVA) seguido de Teste de

Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos foram construídos e analisados estatisticamente usando o programa GraphPad Prism versão 4 para Windows, sendo os dados expressos em média $\pm$ o desvio padrão.

6 RESULTADOS

6.1 Padronização do Modelo Experimental para Determinar o melhor dia de Análise para Experimentos Posteriores

Trabalhos anteriores que padronizaram a técnica de imunização por meio de implante de clara de ovo, estabeleceram que o melhor dia para a administração de ovalbumina (OVA) intraperitoneal seria o 15º dia após o implante (SIQUEIRA et al., 1997), e que a concentração ideal, de OVA, utilizada na estimulação alérgica (ou 2º desafio) para a indução da eosinofilia seria de 10ug por animal (CHERAIM et al, 2008). Para comprovarem a relação entre a duração da sensibilização induzida pelo implante de clara de ovo, e a magnitude da migração eosinofílica seguida do desafio, os trabalhos prévios citados desafiaram animais EWI e SHAM com ovalbumina (10ug/animal) em diferentes tempos (15, 21 e 30 dias) e definiram o 15º dia como dia de maior migração de eosinófilos, sendo que nos outros dias não observaram uma diferença estatística na migração celular, considerando, assim, a existência de uma resposta tempo-dependente. Além disso, observaram que a indução da eosinofilia pelo modelo de EWI induz uma sensibilização contra a OVA de longa duração (CHERAIM et al, 2008), o que torna este modelo de estudo estável no que diz respeito à migração eosinofílica e à eosinopoiese.

Em nosso estudo, os animais foram então submetidos à imunização através de implante de clara de ovo (EWI) seguida por uma estimulação alérgica com 10ug/animal de ovalbumina no 15º dia, injetada intraperitonealmente, conforme modelo de eosinofilia estabelecido por CHERAIM et al (2008). Foi avaliado o recrutamento dos eosinófilos para a cavidade peritoneal em diferentes períodos - 24hs, 48hs e 72hs, pela técnica da lavagem do líquido peritoneal seguida de contagem diferencial dos eosinófilos por meio da coloração da peroxidase resistente ao cianeto (TEN et al., 1989). Observamos então que o número de eosinófilo que migraram para a cavidade peritoneal deu-se, estatisticamente, 24 horas ($p < 0,01$), 48

horas ($p<0,01$) e 72 horas ($p<0,01$). No entanto, concluímos que o melhor dia para análise dos resultados dos experimentos posteriores seria no 2º dia, ou seja, 48 horas após a estimulação alérgica com OVA, conforme demonstra a Figura 9, uma vez que foi demonstrada diferença significativa quando comparada com os demais tempos (48hs para 24hs ($\#p<0,05$) e 48 para 72hs ($\#p<0,05$)).

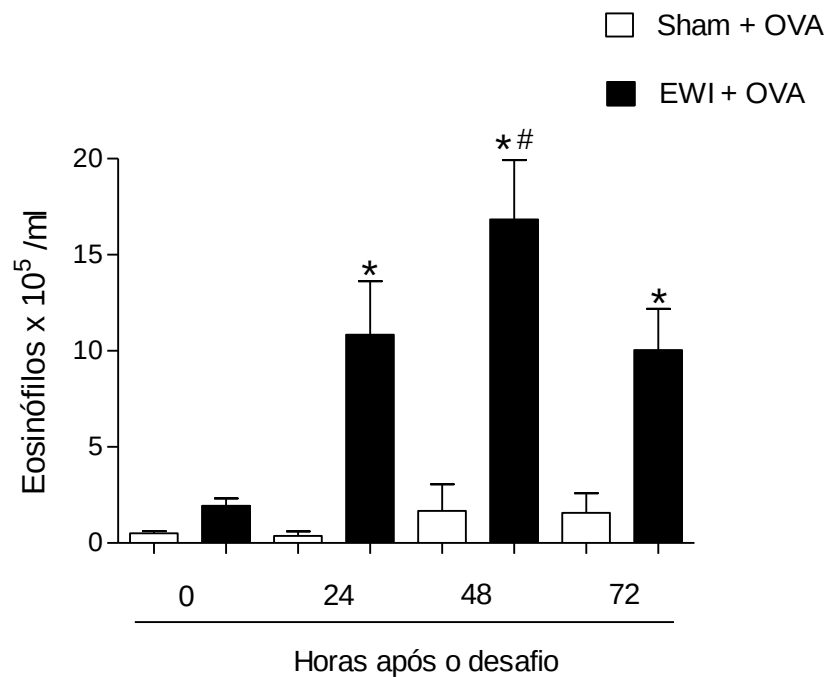


Figura 9 – Tempo para o recrutamento eosinofílico após desafio alérgico com OVA. Os animais submetidos ou não (SHAM) ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 µg/animal i.p.). O recrutamento eosinofílico foi determinado por contagem celular a partir do lavado peritoneal em 24, 48 e 72 horas após o desafio. * $p<0,01$ comparados com o grupo Sham + OVA; # $p<0,05$ comparado com os grupos EWI + OVA 24hs e EWI + OVA 72hs; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média $\pm$ SD e representam 6 animais/grupo.

6.2 Efeito do Agonista Sintético, Rosiglitazone, de PPAR- γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese

Novos grupos de animais foram imunizados, pela técnica de EWI, e desafiados com ovalbumina intraperitonealmente, 15 dias após a imunização. Estes grupos foram tratados com um agonista sintético de PPAR- γ , comercialmente vendido para tratamento de portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, o rosiglitazone (Avandia®, GlaxoSmith Kleine).

Foram utilizadas três concentrações diferentes do fármaco (1mg/kg; 3mg/kg e 10mg/kg), a qual foi diluída, previamente, em PBS e administrada por via oral, 30 minutos antes do desafio intraperitoneal de OVA, e a cada 24 horas por 48 horas. Após este período determinamos o recrutamento eosinofílico para a cavidade peritoneal e a eosinopoiese, através da técnica de lavagem do líquido peritoneal e da coleta das células da medula com posterior contagem diferencial, pela técnica de Ten e cols (1989).

No Figura 10, painel A, observamos que os grupos EWI submetidos ao 2º desafio apresentaram uma eosinofilia peritoneal significativamente maior que os grupos controles (SHAM e EWI, as três barras à esquerda; # $p < 0,05$ em comparação com EWI sem OVA). No entanto, nos animais tratados com rosiglitazone observamos uma diminuição acentuada do recrutamento eosinofílico para o peritônio, nas 3 doses utilizadas (* $p < 0,05$), quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tratamento. Não houve diferença significativa entre cada uma das três doses utilizadas ($p > 0,05$). Além do fármaco diminuir o recrutamento eosinofílico para o peritônio após o desafio com OVA, também foi observada uma modulação na diferenciação de eosinófilos que ocorre na medula óssea (Figura 10, painel B), no entanto, apenas as dosagens de 3 mg/kg (* $p < 0,05$) e 10mg/kg (* $p < 0,05$) foram efetivas, não havendo também diferença significativa entre as mesmas. Como controle positivo utilizamos as contagens oriundas de animais EWI submetidos à estimulação alergênica com OVA, já como controles negativos utilizamos animais SHAM, ou seja, que foram submetidos ao estresse cirúrgico, porém sem

implantação da clara de ovo coagulada, que foram desafiados com PBS 1x (veículos de diluição da droga e da OVA) ou com OVA, além de animais EWI desafiados com PBS 1x.

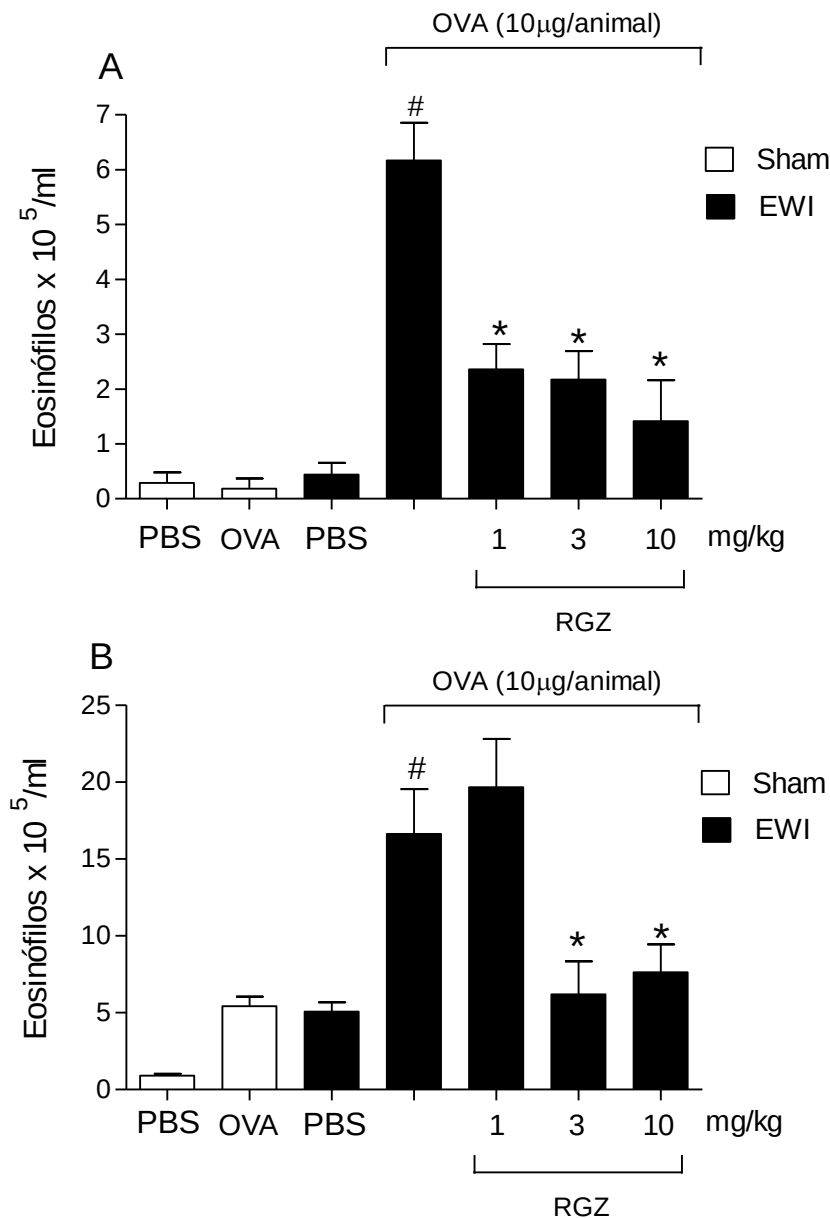


Figura 10 – Rosiglitazone diminui o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese. Os animais submetidos ou não (SHAM) ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 µg/animal i.p.) ou PBS. Os animais do grupo EWI foram pré-tratados com rosiglitazone (1, 3, ou 10 mg/Kg, v.o. de 24 em 24 horas), 30 minutos antes do desafio com OVA. Os eosinófilos foram recuperados da cavidade peritoneal (A) ou medula óssea (B), a partir do lavado peritoneal ou lavado medular, respectivamente, 48 horas após o desafio alérgico com OVA. # p<0,05 comparado com os grupos controles; * p<0,05 comparados com o grupo EWI - desafiado com OVA sem tratamento; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média ± SD e representam 6 animais/grupo.

Como observado, o agonista sintético de PPAR- γ , rosiglitazone, foi capaz de imunomodular negativamente o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese, nos animais EWI após estimulação alérgica, com a administração das doses de 3 e 10 mg/kg.

6.3 Efeito do Agonista Natural, 15d-PGJ₂, de PPAR- γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese

Novo grupo de animais foi submetido à cirurgia para o implante de clara de ovo coagulada, na região dorsal. Transcorridos 15 dias os animais foram então submetidos ou não a um segundo desafio com OVA (10ug/animal), por meio de aplicação intraperitoneal. Os grupos que foram tratados com a 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), por via subcutânea, 30 minutos antes do estímulo alérgico com OVA. E devido a meia vida da droga, tempo este já estabelecido por nosso grupo de estudo (NAPIMOGA et al., 2008a), a mesma foi administrada de 12 em 12 horas por 48 horas.

Utilizamos três diferentes concentrações da 15d-PGJ₂, a saber: 100 μ g/Kg; 300 μ g/Kg e 1000 μ g/Kg. A definição destas dose foi feita com base em estudos do nosso laboratório, sendo a mesma diluída em solução de PBS. A avaliação se deu por contagem das células provindas do lavado peritoneal e da medula óssea, que após citocentrifugação foram submetidas à coloração de peroxidase resistente ao cianeto com contracoloração com Hematoxilina de Harris, sendo a leitura diferencial feita em hemocítômetro manual.

Com o tratamento dos animais EWI-OVA com a 15d-PGJ₂, com reforço feito de 12 em 12 horas, observamos que este fármaco foi capaz de inibir o recrutamento eosinofílico para a cavidade peritoneal (Figura 11 – painel A) frente as doses de 300 e 1000 μ g/Kg de 15d-PGJ₂, quando comparado com o grupo controle (EWI-OVA) sem tratamento, sendo que não houve nenhuma diferença estatística

entre as dosagens. Já quando analisamos os dados obtidos através da contagem de células obtidas da medula óssea (Figura 11 – painel B), notamos que o fármaco foi capaz de inibir a eosinopoiese apenas com a dosagem de 1000µg/Kg (*p<0,05) de 15d-PGJ₂, quando comparado com o grupo EWI-OVA, reduzindo quase que ao mesmo nível que àquele grupo que não recebeu estímulo alergênico EWI-PBS.

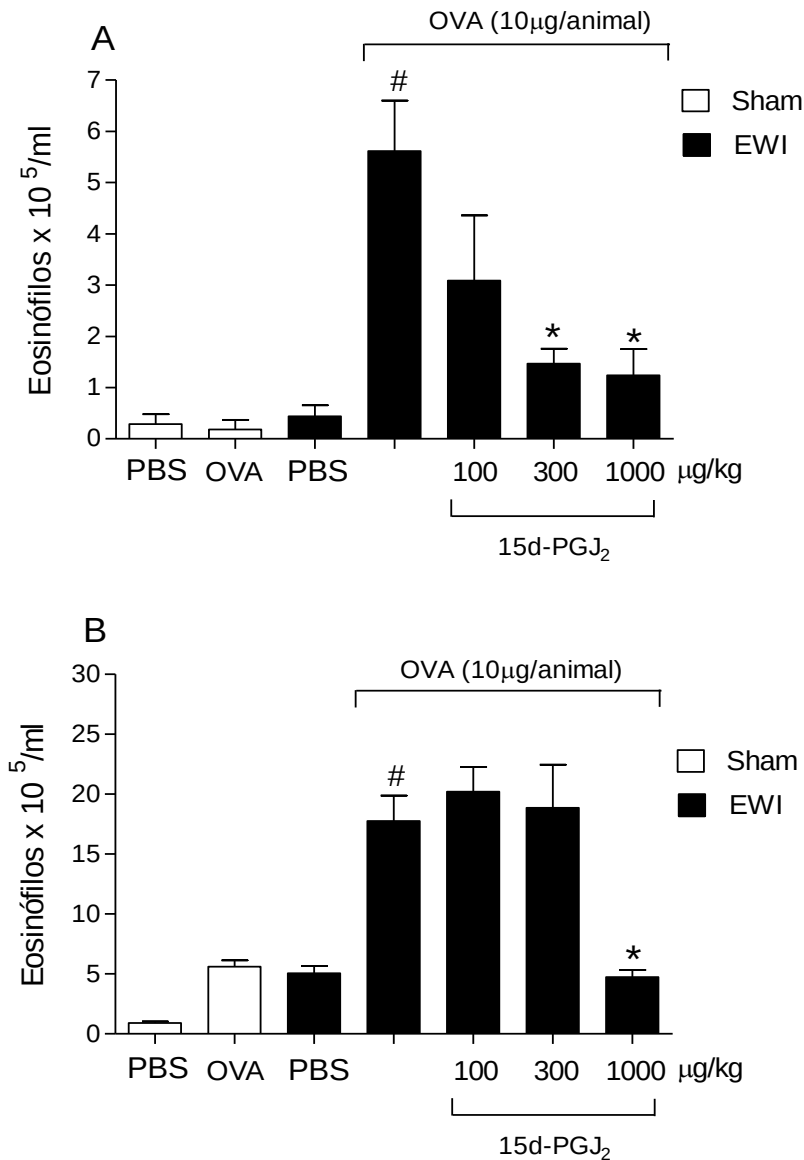


Figura 11 – 15d-PGJ₂ diminui o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese. Os animais submetidos ou não (SHAM) ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 µg/animal i.p.) ou PBS. Os animais do grupo EWI foram pré-tratados com 15d-PGJ₂ (100, 300, ou 1000 µg/Kg, s.c., de 12 em 12 horas), 30 minutos antes do desafio com OVA. Os eosinófilos foram recuperados da cavidade peritoneal (A) ou medula óssea (B), a partir do lavado peritoneal ou lavado medular, respectivamente, 48 horas após o desafio alergênico com OVA. # p<0,05 comparado com os grupos controles; * p<0,05 comparados com o grupo EWI - desafiado com OVA sem tratamento; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média ± SD e representam 6 animais/grupo.

A 15d-PGJ₂ é capaz de diminuir o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese, assim como o RGZ, porém parece provocar uma diminuição mais acentuada da eosinofilia.

6.4 Avaliação da Síntese de Imunoglobulina E (IgE) frente à Ação Terapêutica do Agonista Natural e Sintético de PPAR- γ

Em condições alérgicas, um dos principais marcadores da resposta imune, além da eosinofilia, é a produção de imunoglobulina E pelas células B, que é tida por alguns autores como o marco das doenças atópicas, como a asma. A IgE ao se ligar aos receptores Fc ϵ RI dos mastócitos, resultam na síntese e liberação de uma variedade de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (HAMELMANN e GELFAND, 2001).

Como vimos nos resultados expostos anteriormente, os agonistas de PPAR- γ , 15d-PGJ₂ e rosiglitazone, demonstraram capacidade em imunorregular negativamente tanto a migração eosinofílica (Figuras 10A e 11A) para o sítio do estímulo alergênico quanto o processo de maturação da linhagem eosinofílica (Figuras 10B e 11B), em diferentes concentrações, no entanto apenas a dose de 1000 μ g/Kg de 15d-PGJ₂ foi capaz de atenuar consideravelmente a eosinopoiese.

Para avaliarmos a concentração de imunoglobulina E, contida do soro oriundo da coleta de sangue obtido por punção do plexo orbital dos animais tratados tanto com RGZ quanto com 15d-PGJ₂ por 48 horas desafio alergênico com OVA. Após o procedimento observamos que o agonista sintético de PPAR- γ não conseguiu induzir uma diminuição na síntese de IgE, apesar de termos observado que o mesmo foi capaz de atenuar a eosinofilia e a eosinopoiese. Já os animais que receberam 15d-PGJ₂ notamos uma diminuição significativa na síntese de IgE apenas para a dose de 1000 μ g/Kg (*p<0,05), como observado na Figura 12.

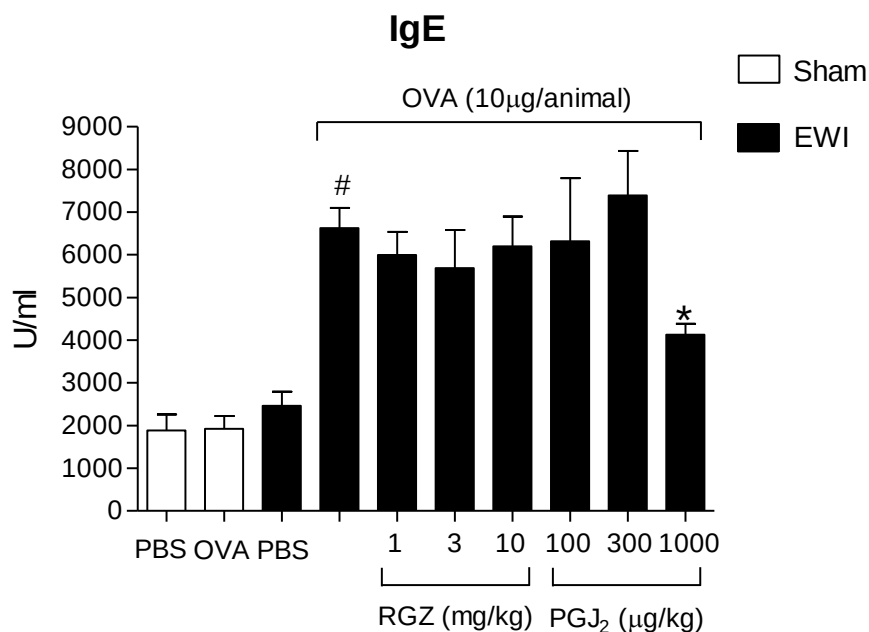


Figura 12 – 15d-PGJ₂, mas não RGZ, é capaz de diminuir a concentração sérica de IgE. Os animais submetidos ou não (SHAM) ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 µg/animal i.p.) ou PBS. Os animais do grupo EWI foram pré-tratados com diferentes doses de 15d-PGJ₂ (100, 300, ou 1000 µg/Kg, s.c., de 12 em 12 horas) e de rosiglitazone (1, 3, ou 10 mg/Kg, v.o. de 24 em 24 horas), 30 minutos antes do desafio com OVA. 48 horas após o desafio alérgico, o sangue foi coletado por punção do plexo venoso e centrifugado para obtenção do soro, que foi utilizado para a dosagem dos níveis de IgE, por meio de ELISA. # p<0,05 comparado com os grupos controles; * p<0,05 comparados com o grupo EWI - desafiado com OVA sem tratamento; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média ± SD e representam 6 animais/grupo.

Concluimos que a dose eficaz, capaz de proporcionar a diminuição do recrutamento eosinofílico, da eosinopoiese e da síntese de imunoglobulina E é a de 1000µg/Kg de 15d-PGJ₂.

6.5 Avaliação da Síntese de Citocinas frente à Ação Terapêutica dos Agonistas Naturais e Sintéticos de PPAR- γ

Na tentativa de compreender os mecanismos de migração eosinofílica para o sítio alergênico, frente ao tratamento com agonistas de PPAR- γ , foram dosadas citocinas, a partir do lavado peritoneal, que sabidamente fazem parte deste mecanismo, como a IL-5, e outras que se mostram importantes no cenário das doenças alérgicas.

As dosagens se deram a partir do lavado peritoneal, pela técnica de ELISA. Observamos que uma das principais citocinas envolvidas na diferenciação, maturação, crescimento, sobrevivência e migração dos eosinófilos, a IL-5, apresentou-se significativamente diminuída frente ao tratamento com os agonistas de PPAR- γ (Figura 13, painel A), apenas com as doses de 10mg/kg de RGZ (* $p < 0,05$) e 1000 μ g/kg de 15d-PGJ₂ (* $p < 0,05$). A diminuição nos níveis de IL-5 corrobora com os achados anteriores quanto a inibição do recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese, uma vez que estas células são as maiores produtoras desta classe de interleucina.

A mesma diminuição foi observada em relação a IL-33, uma citocina da família da IL-1, responsável por regular a ativação de basófilos e mastócitos, que mostrou-se diminuída nas dosagens feitas após tratamento com 10mg/kg e 1000 μ g/kg de RGZ e 15d-PGJ₂, respectivamente, como visualiza-se no painel B da Figura 13.

Outras citocinas parecem estar envolvidas com a resposta alérgica, como a IL-17 e a IL-23, no entanto, o que se sabe sobre suas atividades neste tipo de resposta é que além de participarem na montagem da resposta Th2, algumas células envolvidas nos processos alérgicos, como basófilos, eosinófilos e mastócitos são capazes de sintetizarem estas citocinas (CASTRO, 2010). Dessa forma o tratamento foi capaz de imunomodular negativamente a produção de tais citocinas, que se apresentaram significativamente diminuídas para as doses de 3 e 10mg/kg de RGZ (painel C e D, Figura 13), e 300 e 1000 μ g/kg de 15d-PGJ₂ (painel C, Figura 13) para a IL-17 e de 1000 μ g/kg para a IL-23 (painel D, Figura 13B).

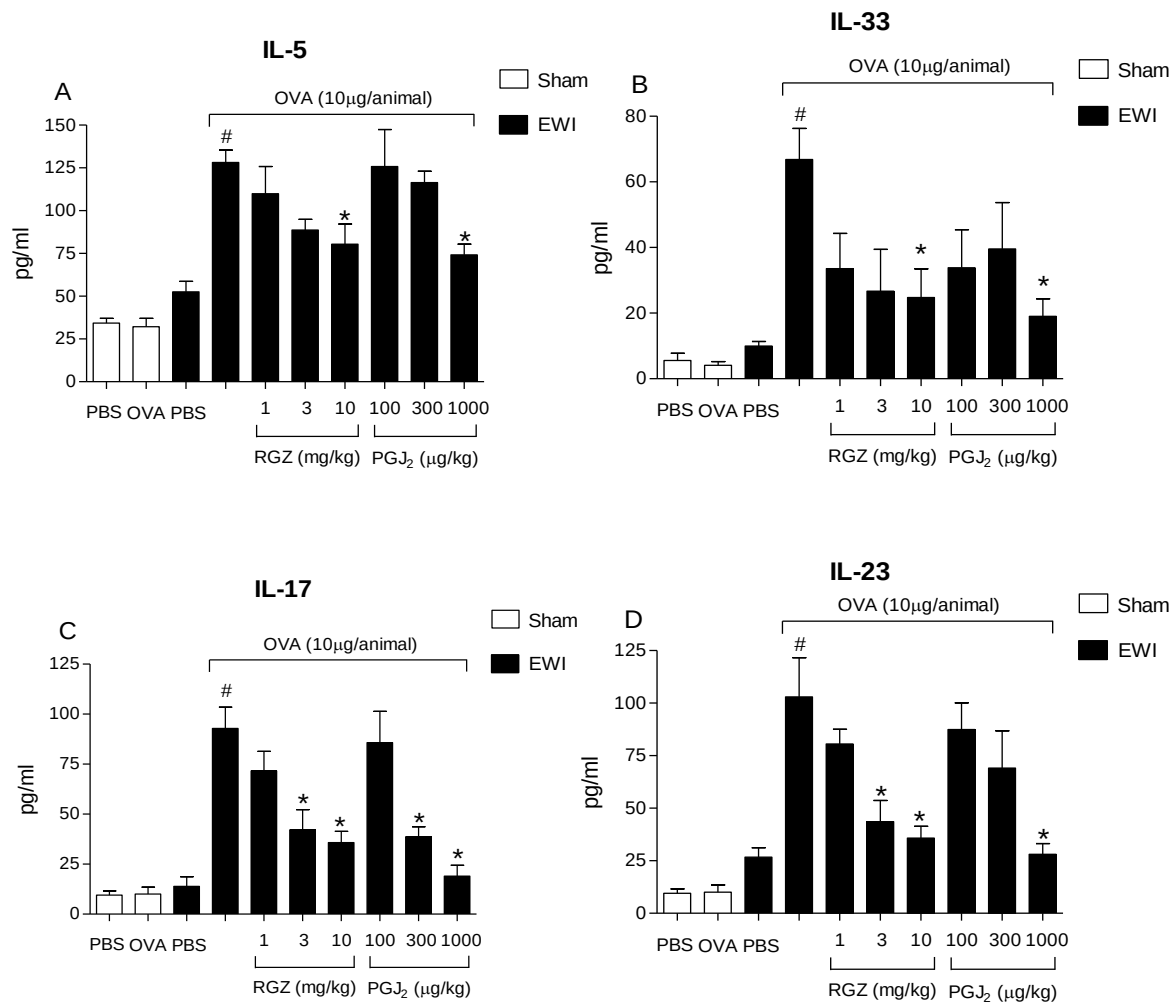


Figura 13 – Efeito dos agonistas de PPAR- γ na síntese de citocinas. Os animais submetidos ou não (SHAM) ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 μ g/animal i.p.) ou PBS. Os animais do grupo EWI foram pré-tratados com diferentes doses de 15d-PGJ₂ (100, 300, ou 1000 μ g/Kg, s.c., de 12 em 12 horas) e de rosiglitazone (1, 3, ou 10 mg/Kg, v.o. de 24 em 24 horas), 30 minutos antes do desafio com OVA. 48 horas após o desafio alérgico, uma fração do lavado peritoneal foi coletada para a dosagem dos níveis de IL-5(A), IL-33(B), IL-17(C) e IL-23(D), por meio de ELISA. # $p < 0,05$ comparado com os grupos controles; * $p < 0,05$ comparados com o grupo EWI - desafiado com OVA sem tratamento; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média $\pm$ SD e representam 6 animais/grupo.

6.6 Efeito do Agonista Natural, 15d-PGJ₂, de PPAR- γ sobre o Recrutamento Eosinofílico e a Eosinopoiese em Camundongos Knockout para IL-17 (IL17^{-/-})

Como nas dosagens para IL-17 observamos uma diminuição nos níveis de síntese desta citocina frente ao tratamento com os agonistas de PPAR- γ e a literatura relata que esta citocina é importante na montagem da resposta eosinofílica, decidimos, então, analisar a interação da resposta alérgica em animais transgênicos naturalmente deficientes na produção IL-17 (IL-17^{-/-}), os quais foram tratados com o agonista natural, 15d-PGJ₂, na dose de 1000 μ g/Kg.

Animais C57Bl/6 IL-17^{-/-} e C57Bl/6 WT foram submetidos à cirurgia para implante de clara de ovo coagulada (EWI) e após 15 dias, foi feito um pré-tratamento com 15d-PGJ₂ com reforço de 12 em 12 horas (1000 μ g/kg), antes da estimulação alérgica com OVA (10 μ g/animal) e avaliou-se o recrutamento eosinofílico e a diferenciação medular desta linhagem, por meio de contagem total e diferencial pela técnica de hemocítômetro manual em câmara de Neubauer.

Os resultados obtidos nos mostraram que os animais WT conseguiram montar uma resposta alérgica e que com a administração da droga houve uma redução significativa da eosinofilia tanto no local de estímulo alérgico (* $p < 0,05$) quanto na medula óssea (* $p < 0,05$), corroborando os achados da eficácia dos agonistas de PPAR- γ nas doenças alérgicas.

Com os resultados dos animais IL-17^{-/-}, podemos notar que a IL-17 sugere ser de extrema importância na montagem da resposta Th2, uma vez que os animais IL-17^{-/-} EWI-OVA sem tratamento não conseguiram desenvolver eosinofilia nem no local do estímulo alérgico nem na medula óssea. Sendo assim não conseguimos visualizar nenhum efeito modulatório da 15d-PGJ₂ nestas cepas, como observa-se na Figura 14, painel A e B.

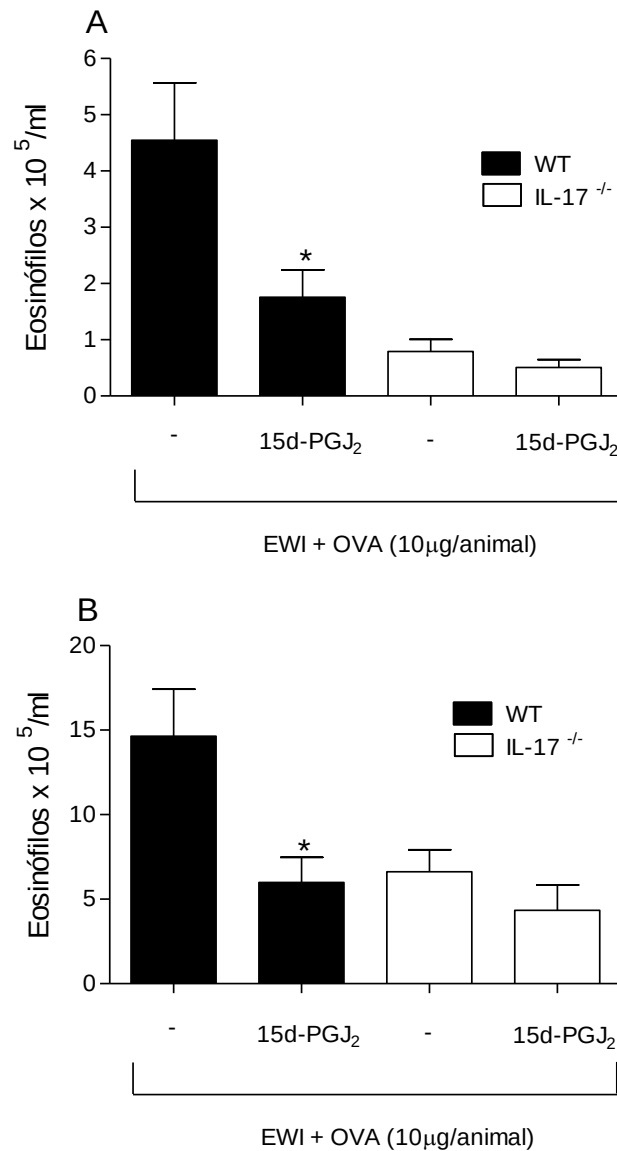


Figura 14 – IL-17 é essencial para o recrutamento eosinofílico e para a eosinopoiese no modelo de EWI. Animais WT e IL-17^{-/-}, foram submetidos ao implante de clara de ovo coagulada (EWI) foram desafiados, 15 dias após a cirurgia, com OVA (10 μg/animal i.p.), e foram pré-tratados com 1000 μg/Kg, (s.c., de 12 em 12 horas) de 15d-PGJ₂, 30 minutos antes do desafio com OVA. Os eosinófilos foram recuperados da cavidade peritoneal (A) ou medula óssea (B), a partir do lavado peritoneal ou lavado medular, respectivamente, 48 horas após o desafio alergênico com OVA e contados em Câmara de Neubauer. # p<0,05 comparado com o grupo controle EWI-desafiado com OVA sem tratamento; ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média ± SD e representam 6 animais/grupo.

Isso nos permite dizer que além do perfil Th2 existente na hipersensibilidade imediata, há também a participação de outras subpopulações de células T, como a Th17, que se mostrou fundamental para a montagem da resposta

alérgica neste modelo experimental, além de sugerir uma importante via pela qual os agonistas de PPAR-gama exercem sua atividade imunoregulatória.

7 DISCUSSÃO

Embora a maioria dos trabalhos descritos na literatura utilizem modelos experimentais que mimetizam a doença alérgica, principalmente a asma alérgica, quanto ao sítio da inflamação, com hiperresponssividade brônquica, com intenso infiltrado inflamatório no tecido pulmonar e produção de anticorpos específicos, estes achados só são possíveis com a utilização de adjuvantes que auxiliam na manutenção do antígeno, impedindo o rápido processamento do mesmo. No entanto, no presente trabalho, decidimos adotar um modelo de eosinofilia (EWI, Egg White Implant) em que o alérgeno persiste no animal por longo período se assemelhando à exposição contínua que acontece no ambiente, sem a utilização de adjuvantes, produzindo uma resposta alérgica típica, com intenso infiltrado eosinofílico e produção de imunoglobulina alérgeno-específica, e de longa duração, mantendo assim a confiabilidade e a estabilidade da resposta alérgica montada, conforme demonstrado em trabalhos prévios (SIQUEIRA et al., 1997; CHERAIM et al., 2008) e por nós ao induzirmos a estimulação alergênica com ovalbumina intraperitonealmente. A eosinofilia observada na cavidade peritoneal reflete uma ação combinada de vários eventos, como a eosinopoiese, a migração a partir medula óssea e a sobrevida destas células no sangue periférico, sendo por isso uma variável que avalia de forma indireta a ação dos agonistas de PPAR- γ .

Assim como ocorre no ambiente nós demonstramos que para se estabelecer uma resposta alérgica, é fundamental que ocorra uma primeira exposição ao antígeno, para que o mesmo faça contato com o sistema imune e monte a resposta, e posteriormente um segundo contato com o mesmo antígeno para que a resposta se exacerbe.

Nós comprovamos que neste modelo, após a provocação alergênica, há a presença de fatores essenciais também presentes nas respostas alérgicas humanas, como a eosinofilia no sítio alérgico, indução da eosinopoiese, a migração celular, o aumento de citocinas específicas e IgE, assim como alguns autores que utilizaram outros modelos experimentais combinados com o uso de adjuvantes encontraram (RADINGER et al., 2007; COYLE et al., 1996; GASPAR-ELSAS et al.,

1997; GASPAR-ELSAS et al., 2000), permitindo assim confiabilidade quanto aos dados obtidos a fim de se avaliar o tratamento dos animais.

As respostas contra infecções parasitárias e contra estímulos alérgicos tendem a um perfil de resposta Th2, onde a principal célula efetora é o eosinófilo (WALSH e AUGUST, 2009). Os eosinófilos possuem grânulos específicos responsáveis pela maioria das suas funções efetoras, dentre estes a peroxidase do eosinófilo, que também é utilizada como marcação para demonstrar células maduras e/ou ativadas e sua infiltração nos tecidos inflamados juntamente com seus produtos estão correlacionados com a severidade das doenças alérgicas (FOSTER et al., 2001). Durante o processo de eosinopoiese está muito bem definido que há a participação de inúmeros fatores de crescimento, dentre eles a IL-5 cuja presença é fundamental para a diferenciação e também para a migração eosinofílica para o sítio inflamatório. Nós demonstramos que níveis aumentados de IL-5 condizem com aumento da eosinofilia peritoneal e serve de estímulo para o aumento da produção destas células na medula óssea após o estímulo alergênico. A mesma correlação foi observada por outros estudiosos que não só correlacionaram o achado em outros modelos experimentais (GASPAR-ELSAS et al., 1997; TOMAKI et al., 2000), mas relataram que em pacientes asmáticos há um aumento dos progenitores eosinofílicos na medula óssea devido ao estímulo pela IL-5, que também se encontra elevada nos níveis plasmáticos (DENBURG et al., 1999).

Os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos (PPARs), especificamente, o PPAR- γ , além de atuar na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos (DAYNES e JONES, 2002) está correlacionado a inúmeras doenças como inflamação, doenças metabólicas, arteriosclerose e tumores malignos (ISHINO et al., 2008).

A descrição da imunomodulação das células do sistema imune pelos agonistas sintéticos e naturais de PPAR- γ , são bastante contraditórias devido a existência de relatos tanto sobre efeitos pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios (MONNERET et al., 2002). No entanto fortes evidências sobre o potencial antiinflamatório destes agonistas são cada vez mais sólidas, como demonstrado por nosso grupo de pesquisa que relatou que em um modelo experimental de inflamação aguda em tecido mesentérico induzido por carragenina, a migração

neutrofílica diminuiu após tratamento com agonista natural de PPAR- γ , a 15d-PGJ₂, por diminuir moléculas que auxiliam no rolamento e na adesão tecidual dos neutrófilos (NAPIMOGA et al., 2008a), além de conseguir inibir a dor inflamatória (NAPIMOGA et al., 2008b; PENA-DOS-SANTOS et al., 2009). Apesar de não se saber exatamente por qual caminho os agonistas de PPAR- γ entram nas células onde vão exercer suas funções, muitos apostam que seja por meio de alguns receptores utilizados pela PGD₂, os receptores DP₁ e DP₂, que estão presentes também em eosinófilos (MONNERET et al., 2001; HIRAI et al., 2001; MONNERET et al., 2002), e cuja ativação pode levar a migração celular. Outro ponto importante a se destacar é que muito dos efeitos antiinflamatórios observados pela ação da 15d-PGJ₂ é devido a estimulação do PPAR- γ , que antagoniza a ativação de alguns fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1 e STAT-1 (RICOTE et al., 1998b), responsáveis, dentre muitas coisas, pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

Na hipersensibilidade imediata, as doenças alérgicas são comumente associadas com inflamações crônicas caracterizadas por infiltração e acúmulo de eosinófilos, células T e mastócitos (SOUWER et al, 2010), e os efeitos dos agonistas de PPAR- γ são pouco relatados, sendo assim o nosso interesse em avaliar esta interação uma vez que apostamos nos mesmos como fármacos promissores no que diz respeito à imunorregulação.

Como muito bem descrito na literatura, diversas citocinas (IL-5; IL-4; IL-13), moléculas de adesão (integrinas β 1-; β 2-; β 3-) e quimiocinas (eotaxina; RANTES e MCP-1, do inglês monocyte chemotactic protein-1) influenciam diretamente o tráfico dos eosinófilos para o sítio inflamatório (revisado por ROTHENBERG e HOGAN, 2006; NIE et al., 2005).

Ao avaliarmos a interação dos agonistas de PPAR- γ observamos que os animais EWI que foram tratados com rosiglitazone e com 15d-PGJ₂, conseguiram diminuir a eosinofilia no sítio alérgico bem como a eosinopoiese. Nosso grupo acredita que a interação destes agonistas possa diminuir a expressão de algumas moléculas de adesão, além de diminuir a IL-5 o que em conjunto possa justificar a diminuição da migração eosinofílica para o sítio inflamatório, assim como demonstrado no estudo de outro modelo inflamatório que diminuiu a migração neutrofílica por diminuir a expressão de uma integrina, a ICAM-1 (NAPIMOGA et al.,

2008a). HAMMAD e cols (2004) demonstraram que células dendríticas que foram incubadas previamente com agonistas sintéticos de PPAR- γ (rosiglitazone e ciglitazone) foram capazes de inibir a resposta eosinofílica, devido à ativação deste receptor. Outro relato (FUKUI et al., 2009) também demonstra que após a administração de ciglitazone em animais induzidos à rinite alérgica houve diminuição da eosinofilia e da síntese de IL-5, justifica o menor recrutamento dos eosinófilos. NIE e colegas (2005) demonstraram por meio de estudos *in vitro* que as células musculares dos tecidos das vias aéreas humanas (HASM, do inglês human airway smooth muscle) incubadas com troglitazone ou com 15d-PGJ₂ são capazes de inibir a produção de MCP-1 e eotaxina mas que quando há uma co-incubação com o agonista natural de PPAR- γ e glucocorticóide nota-se uma inibição aditiva destas quimiocinas. Estes achados juntamente com nossos resultados comprovam nossa hipótese do agonista natural de PPAR- γ ser uma alternativa terapêutica em quadros inflamatórios alérgicos nos quais os eosinófilos são as células principais.

O processo de eosinopoiese envolve inúmeras citocinas (GM-CSF, IL-5 e IL-3) e inúmeros eventos até a formação da célula madura, e conforme nossos resultados a diminuição da diferenciação dos eosinófilos se deve claramente a diminuição do principal fator estimulador da diferenciação desta linhagem celular, a IL-5, uma vez que há correlação da diminuição da IL-5 com o número de células EPO positivas na medula, além disso, notamos uma menor eosinopoiese nos animais que foram tratados com a 15d-PGJ₂ do que os que receberam RGZ. Outra possível explicação para o fenômeno é que a ativação de PPAR- γ tanto por agonistas sintéticos (ciglitazone) quanto por agonistas naturais (15d-PGJ₂) inibem a produção de GM-CSF e G-CSF pelas células musculares das vias aéreas, indicando um controle no desenvolvimento das inflamações alérgicas uma vez que estes dois fatores contribuem para a potencialização e prolongamento do infiltrado inflamatório (PATEL et al., 2003). O receptor PPAR- γ , também, foi identificado em diferentes tipos de células hematopoiéticas, incluindo células CD34⁺, monócitos/macrófagos, linfócitos e megacariócitos (GREENE et al., 2000; AKBIYIK et al., 2004) e alguns trabalhos vêm relatando uma ação direta dos agonistas de PPAR- γ sobre os precursores hematopoiéticos, onde a 15d-PGJ₂ diminuiu significativamente a formação BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM e CFU-MK, além de inibir a formação das unidades formadoras, induziu a apoptose dos precursores ao diminuir a expressão

de Bcl-xL, uma proteína anti-apoptótica, e caspase-3, indicando a via pró-apoptótica mitocondrial (PACIENZA et al., 2010).

Outra característica da hipersensibilidade imediata é a síntese de imunoglobulinas específicas contra o antígeno, principalmente a imunoglobulina E, que é sintetizada por linfócitos B que foram estimulados por alérgenos, como a ovalbumina. Normalmente estas imunoglobulinas se encontram sensibilizando os mastócitos e basófilos através da ligação ao receptor FcεRI, e após novo encontro com o antígeno específico, ativam estas células levando à degranulação das mesmas e desencadeando toda a resposta alérgica, sendo, portanto importante na indução da hipersensibilidade imediata (HAMELMANN et al., 1999). Pouco se sabe sobre a real função da IgE, mas seus níveis se encontram aumentados no soro e no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos, sendo também correlacionada, juntamente com os eosinófilos, com o aumento da incidência e da severidade da doença (revisado por HAMELMANN et al., 1999). No presente trabalho nós demonstramos que apenas o agonista natural de PPAR-γ, a 15d-PGJ₂, na dose de 1000μg/kg, foi capaz de reduzir significativamente a síntese de IgE nos animais EWI. Apesar do nosso achado alguns autores relatam que outros glitazones, como o ciglitazone e o pioglitazone, foram capazes de diminuir significativamente os níveis plasmáticos de IgE quando comparados com seus controles, além de diminuírem a secreção de IL-4, uma citocina fundamental para a troca de isotipo para IgE (WOERLY et al., 2003; NARALA et al., 2007). FUJIMURA et al. (2002) relataram que o tratamento com 15d-PGJ₂ é capaz de reduzir a expressão do receptor FcεRI impedindo desta forma uma menor ligação de IgE, e conseqüentemente menor liberação dos mediadores responsáveis pelas manifestações da inflamação alérgica. Já MIYAZAKI e cols (2002) em seus experimentos sugerem que a 15d-PGJ₂ inibe a troca de classe de IgE pelos linfócitos B, por suprimir a fosforilação de STAT-6, um dos fatores responsáveis pela troca da cadeia pesada ε para a síntese de IgE.

Vimos até então que os agonistas de PPAR-γ atuam na imunorregulação dos principais eventos da hipersensibilidade imediata, inibindo a migração eosinófila e a eosinopoiese além de modular negativamente a síntese de IL-5 e IgE.

As principais citocinas do perfil Th2 (IL-5, IL-4 e IL-13) são responsáveis por toda a orquestração deste tipo de resposta imune, no entanto, diversos relatos evidenciam a participação de outras citocinas no desenvolvimento e manutenção da hipersensibilidade imediata.

Aqui nós demonstramos que, na indução alérgica com OVA, além da participação da IL-5 outras citocinas como a IL-33, IL-23 e IL-17 também desempenham papéis importantes. Muitos relatos mostram que a IL-33 pode induzir a eosinofilia *in vivo* e *in vitro* (SCHMITZ et al., 2005; KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; KONDO et al., 2008). As principais fontes de IL-33 são as células endoteliais e epiteliais (SCHMITZ et al., 2005; MOUSSION et al., 2008), sendo talvez uma das justificativas para pacientes asmáticos apresentarem altos níveis desta citocina no soro e nos pulmões (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009). Fato curioso sobre a participação desta citocina na resposta alérgica é que o receptor da IL-33, o ST2, é expresso preferencialmente em células do perfil Th2 e não Th1 (XU et al., 1998; CARTER et al., 2001), e em eosinófilos (KIM et al., 2010) realçando a produção de IL-5 e IL-13 independentemente da presença de IL-4 (revisado por LIEW et al., 2010). A IL-33 também é capaz de aumentar a produção de IgE e produção de muco bem como induzir a ativação com posterior degranulação de mastócitos sensibilizados previamente por moléculas de IgE (PUSHPARAJ et al., 2009), além de estimular a diferenciação em eosinófilos de células progenitoras hematopoiéticas (STOLARSKI et al., 2010). Estes são apenas alguns dos motivos que vislumbram a IL-33 como novo alvo em potencial para o controle das doenças alérgicas, uma vez que inúmeras terapias tentam controlar a eosinofilia por intermédio da secreção de citocinas clássicas do perfil Th2. No entanto, quase não há descrições na literatura de terapias cujo alvo seja a IL-33, nem tão pouco sua correlação com os agonistas de PPAR- γ , sendo, portanto, nós, o primeiro grupo a relatar tal interação.

Como esperado, após a estimulação alérgica com ovalbumina houve o desenvolvimento de uma resposta com perfil Th2 clássico (aumento de IL-5, eosinofilia no sítio alérgico, indução de eosinopoiese) com conseqüente elevação de IL-33, confirmando que realmente a IL-33 está intimamente relacionada à este perfil. Após o tratamento com rosiglitazone e com 15d-PGJ₂, observamos que os agonistas de PPAR- γ também são capazes de diminuir a síntese de IL-33.

Acreditamos que a combinação da atenuação de diversos fatores (eosinofilia, eosinopoiese e síntese de IgE) envolvidos neste tipo de resposta, propicie a melhora no quadro alérgico, no entanto cabe destacar, com os dados aqui obtidos, que a atuação da IL-33 provavelmente não se estenda ao controle da síntese de imunoglobulina E, conforme descrito por alguns autores, uma vez que apesar de observamos uma diminuição da síntese desta citocina frente ao tratamento com rosiglitazone (dose de 10mg/kg) não observamos diminuição na síntese de IgE para a mesma dose, o que demonstra ser um processo independente de IL-33. Com relação ao agonista natural acreditamos que o mesmo exerça seu papel atuando diretamente sobre os linfócitos B, inibindo a síntese de IgE, e não por intermédio da ação de IL-33. Conforme achado de PADILLA e colaboradores (2000) os agonistas sintéticos (troglitazone e ciglitazone) possuem efeitos antiproliferativo 10 vezes menos potente do que a 15d-PGJ₂ sobre as células B, por induzir menos a apoptose desta linhagem.

As diversas doenças existentes eram primariamente classificadas, do ponto de vista imunológico, pelo paradigma Th1/Th2. No entanto, já se demonstrou que os linfócitos T CD4⁺, podem originar inúmeros perfis, de acordo com as citocinas secretadas e necessárias para indução ou não da polarização destas células além da ativação ou não de certos fatores transcricionais. Com o descobrimento dos “novos perfis”, houve um reboiço no meio científico, e a possibilidade de se explicar o que não podia ser respondido pelo paradigma inicial e percebeu-se mais uma vez a complexidade da orquestração destas células.

Na hipersensibilidade imediata, uma resposta imune caracterizada principalmente pela presença de células do perfil Th2, cujo fator de transcrição GATA-3 é considerado um regulador mestre responsável pela polarização deste perfil. Comprovação esta feita em modelos experimentais de asma onde a diminuição da expressão de GATA-3 reduziu a síntese de citocinas Th2 e IgE (ZHANG et al., 1999). Apesar do nosso atual conhecimento, os padrões de diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ não são tão distintos quanto pareciam ser. Uma prova disso é a plasticidade dessas células relatada em alguns trabalhos onde se detectou a síntese de algumas citocinas típicas pelo perfil Th17 nas doenças alérgicas (WONG et al., 2001) e mais recentemente o relato de que um fator transcricional intimamente relacionado ao perfil Th17, o STAT-3, em cooperação

com o STAT-6, é requerido para a determinação do fenótipo Th2 (STRITESKY et al., 2011). A principal fonte de IL-17 são os linfócitos T, no entanto trabalhos já relataram que os eosinófilos também são fontes de IL-17 (MOLET et al., 2001).

O papel da IL-23 na inflamação das vias aéreas não é muito bem compreendido, mas muitos acreditam que ela exerça um papel fundamental na estabilização e na expansão das células Th17 e auxilie no desenvolvimento e função das células Th2, pois animais transgênicos que expressavam quantidades aumentadas de IL-23R exibiram maior infiltrado eosinofílico e produção de citocinas Th2 após desafio com OVA, ao passo que aqueles animais deficientes em IL-23 tiveram uma menor inflamação. Estudos *in vitro* também demonstraram que a deficiência de IL-23 inibiu a diferenciação em Th2 de células T oriundas de animais transgênicos IL-23R (revisado por SOWER et al., 2010). Outros autores relataram em 2008 que a IL-23 sozinha é capaz de induzir a o recrutamento eosinofílico e a produção de citocinas tipo Th2 nas vias aéreas de camundongos (WAKASHIN et al, 2008).

É sabido que a presença de IL-17 é mais comumente relacionada a doenças inflamatórias autoimunes, como a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatóide, no entanto nós demonstramos, no presente trabalho, que há uma elevada síntese desta citocina em um modelo de eosinofilia experimental, assim como de IL-23, uma citocina requerida na polarização do perfil Th17, o que corrobora os achados de outros autores, que relataram a presença destas citocinas em doenças alérgicas. Outro dado importante achado na pesquisa foi de que animais IL-17^{-/-} não conseguiram desenvolver uma resposta alérgica Th2, com intenso infiltrado eosinofílico, o que possivelmente possa ser explicado pelo fato da presença de IL-17 ser crucial para a orquestração ou sustentação do perfil Th2.

Existem muitos relatos acerca da imunomodulação dos agonistas naturais e sintéticos de PPAR- γ nos mais diversos modelos experimentais, no entanto nenhum que estabeleça a relação dos agonistas naturais com a síntese ou secreção de IL-17 e IL-23 em um modelo de eosinofilia. Apenas o trabalho de KLOTZ e seus colaboradores (2009) é que identificaram que o agonista sintético de PPAR- γ , o pioglitazone, ao ativar o receptor PPAR- γ foi capaz de inibir a diferenciação das células Th17 em um modelo experimental de doença auto-imune do sistema nervoso

central, sem no entanto, relatar os níveis das citocinas desta linhagem celular. No mesmo ano outro grupo (PARK et al., 2009) demonstrou, em um modelo de asma induzida por instilação do alérgeno (OVA) associado à adjuvante, que após o tratamento com rosiglitazone e pioglitazone houve redução significativa de IL-17 de maneira dependente de PPAR- γ , assim como de IL-5, IL-4, IL-13 e IgE. Assim como PARK nós também demonstramos que o agonista sintético (rosiglitazone) foi capaz de atenuar significativamente a secreção de IL-17 e o mesmo efeito pode ser observado com a administração do agonista natural, a 15d-PGJ₂, no entanto a diminuição com este agonista foi aparentemente mais acentuada. Outro achado importante em nosso trabalho foi observar que os agonistas também são capazes de reduzir a secreção e/ou síntese de IL-23, permitindo concluir que os agonistas de PPAR- γ diminuem a síntese de IL-17 possivelmente por atenuar a secreção de IL-23.

O recrutamento de eosinófilos é um ponto crítico no estabelecimento da severidade das doenças alérgicas, sendo assim ficou claro neste estudo que os agonistas de PPAR- γ se mostraram eficientes em imunomodular as principais características deste tipo de doença, no entanto a 15d-PGJ₂ parece ser mais eficiente pois foi a única capaz de diminuir a síntese de IgE. Além de comprovarmos que realmente há uma participação de outros tipos celulares na resposta alérgica Th2, cujas citocinas parecem estar envolvidas em novos mecanismos de recrutamento de eosinófilos e que os agonistas também são capazes de regular estas citocinas permitindo um maior controle na atenuação da doença alérgica.

8. CONCLUSÕES

No presente estudo nós demonstramos a ação supressora dos agonistas de PPAR- γ em um modelo experimental de indução alérgica, no qual o recrutamento eosinofílico é o ponto chave. Demonstramos que a ativação de PPAR- γ é capaz de reduzir o recrutamento eosinofílico e a eosinopoiese, pela diminuição de citocinas do perfil Th2 (IL-5 e IL-33), bem como pela diminuição de outras citocinas, como IL-23 e IL-17, que também parecem desempenhar papel crucial no recrutamento eosinofílico. Este achado sugere que outros perfis celulares possuem papel importante em doenças alérgicas. Além disso, encontramos que apenas o agonista natural de PPAR- γ (15d-PGJ₂) foi capaz de modular negativamente a síntese de IgE, sugerindo que o mesmo possa se utilizar de outro mecanismo para interferir na síntese de imunoglobulinas. Com isso, os resultados aqui apresentados indicam que os agonistas de PPAR- γ , principalmente a 15d-PGJ₂, pode ser uma boa estratégia terapêutica para as desordens mediadas por infiltração eosinofílica.

REFERÊNCIAS

Abud, APR. Atividade imunomodulatória de complexos altamente diluídos sobre células de medula óssea murina e linhagem leucêmica humana. [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.

Accordini S et al. The socio-economic burden of asthma is substantial in Europe. *Allergy*. 2008; 63: 116–124.

Ackerman SJ, Kephart GM, Habermann TM, Greipp PR, e Gleich GJ. Localization of eosinophil granule major basic protein in human basophils. *J Exp Med*. 1983; 158:946–61.

Adamko D, Odemuyiwa SO e Moqbel R. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end or end of the beginning? *Curr. Opin. Pharmacol*. 2003; 3: 227–232.

Akashi TD, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; 404:193-197.

Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW & Phipps RP. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*. 2004; 104:1361–1368.

Akuthota P et al. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin. Exp. Allergy*. 2008; 38:1254–1263.

Alves C, de Melo N, Fraceto L, de Araújo D, Napimoga M. Effects of 15d-PGJ₂-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *Br J Pharmacol*. 2011; 162(3):623-32.

Alving K, Matran R, Lundberg JM. The possible role of prostaglandin D₂ in the long-lasting airways vasodilatation induced by allergen in the sensitized pig. *Acta Physiol. Scand*. 1991; 143(1):93-103.

Andersen ML. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo, 2004.

Archer GT. Mechanism of eosinophilia and mast cell disruption in rats infected with the parasite *Amplificaecum robertsi*. *Pathology*. 1969; 1:133-140.

Averbeck M, Gebhardt C, Emmrich F, Treudler R, Simon JC. Immunologic principles of allergic disease. *JDDG*. 2007; 5:1015-1028.

Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol*. 2003; 163(1):69-79.

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Human chemokins: an update. *Annu. Rev. Immunol*, 1997; 15:675-705.

Barnes PJ, Chung FK, Page CP. Inflammatory mediators in asthma. *Pharmacol*. 1988; 40:49-84.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews immunology*. 2008; 8(3):183-192.

Barradas MG. Supressão da eosinopoiese induzida por agentes imunomoduladores: papel da enzima óxido nítrico sintase induzida. [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2010.

Bascom R, Pipkorn U, Proud D, Dunnette S, Gleich GJ, Lichtenstein LM, Naclerio RM. Major basic protein and eosinophil-derived neurotoxin concentrations in nasal-lavage fluid after antigen challenge: effect of systemic corticosteroids and relationship to eosinophil influx. *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 84: 338-346.

Bates JHT, Rincon M and . Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 297(3):L401–L410.

Bell-Parikh LC, Ide T, lawson, JA, McNamara P, Reilly M, Fitzgerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and the ligation of PPAR γ . *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 112(6):945-955.

Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome Proliferator-Activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006; 533:101-109.

Benayoun L, Letuve S, Druilhe A, Boczkowski J, Dombret Mc, Mechighel P, Megret J, Leseche G, Aubier M, Pretolani M. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:1487–1494.

Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG, Leibowitz MD. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*. 1996; 137:4189-4195.

Berger W, De Chandt MT, Cairns CB. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract*. 2007; 61(7):663-676.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, and Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441:235-238.

Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J₂. *J Biol Chem*. 1999; 274(24):17042-17048.

Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunological Reviews*. 2001; 179:5-15.

Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000; 106:817-828.

Bousquet J, Khaltaev N. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. Geneva: World Health Organization; 2007.

Bousquet J et al.. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126:926-38.

Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Pires AL, Silva PN, Martins MA, Cordeiro RS. Endotoxin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity. *Braz J Med Biol Res*. 1991; 24: 957-960.

Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*. 1996; 137:354-366.

Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. 1999; 163(12):6448-54.

Broide D, Srimarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunological Reviews*. 2001; 179: 163–172.

Brugiolo ASS. Avaliação do efeito do extrato de *Echinodorus grandiflorus* na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA. [dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2010.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *American Journal of Pathology*. 2006; 169: 338-346.

Busse WW and Lemanske Jr. RF. Asthma. *N Engl J Med*. 2001; 344(5):350-62.

Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respiratory Research*. 2011; 12:10.

CANAVACI AMC. Papel do leucotrienos durante a infecção experimental de camundongos com *Trypanosoma cruzi*. [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Capron M. Dual function of eosinophils in pathogenesis and protective immunity against parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; v. 87 (Suppl V):83-89.

Carlson MG, Peterson CG, Venge P. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J Immunol*. 1985 Mar;134(3):1875-9.

Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(1):282-7. Epub 2006 Dec 21.

Carter RW, Sweet MJ, Xu D, Klemenz R, Liew FY and Chan WL. Regulation of ST2L expression on T helper (Th) type 2 cells. *Eur. J. Immunol*. 2001; 31: 2979–2985.

Castro JMA. Asma experimental em linhagens de camundongos selecionados para mínima (AIRmín) ou máxima (AIRmáx) resposta inflamatória aguda. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol.* 1987; 138(11):3688-94.

Cheraim AB, Xavier-Elsas P, Oliveira AHP, Batistella T, Russo M, Gaspar-Elsas MI, Cunha FQ. Leukotriene B4 is essential for selective eosinophil recruitment following allergen challenged of CD4+ cells in modelo f chronic eosinophilic inflammation. *Life Sciences.* 2008; 83:214-222.

Clutterbuck EJ, Hirst EM. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GMCSF. *Blood.* 1989; 73(6):1504-1512.

Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* 1989; 245:308-310.

Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Co-operation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* 1995; 182:1169-1174.

Coyle J, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J and Heusser C. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J. Exp. Med.* 1996; 1303-1310.

Cruz LA. Efeito das prostaglandinas ciclopentenônicas sobre a expressão gênica do fator nuclear PPAR- γ , do receptor de scavenger CD36 e proteínas de apoptose em macrófagos para a fisiopatologia da aterosclerose. [dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

Czarnobilska E, Obtulowicz K, Wsołek K . [Type IV of hypersensitivity and its subtypes]. *Przegl Lek.* 2007;64(7-8):506-8. Polish.

Das I, Fraise Ap. How useful are microbial filters in respiratory apparatus? *J Hosp Infect.* 1997; 37(4):263-272.

Davies WB, Fells GA, Sun X-H, Gadek JE, Venet A, Crystal RG. Eosinophil mediated injury to lung parenchyma cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophil in

chronic inflammatory disorders of the lower respiratory tract. *J Clin Invest.* 1984; 74:269-278.

Daynes RA and Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunol.* 2002; 2:748-759.

DeMonchy JGR, Kauffman HF, Venge P, Köeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, et al. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131:373-6.

Denburg, JA, Telizyn S, Messner H, Lim B, Jaml N, Ackerman SJ. et al. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-types colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood.* 1985; 66:312-318.

Denburg JA, Sehmi R, Upham J, Wood L, Gauvreau G, O'byrne P. Regulation of IL-5 and IL-5 receptor expression in the bone marrow of allergic asthmatics. *Int. Arch allergy Immunol.* 1999; 118:101-103.

Dent LA et al. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J. Exp. Med.* 1990; 172:1425-1431.

Devereux S, Linch DC. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. In *Cytokines* (Eds), Academic Press New York. 1988, 261-275.

Di Paola R, Mazzon E, Maier D, Zito D, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S., Rosiglitazone reduces the evolution of experimental periodontitis in the rat. *J Dent Res.* 2006; 85:156-161.

Doherty T and Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Immunology.* 2007; 19:676–680.

Dong Q, Louahed J, Vink A, et al. IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice. *Eur J Immunol.* 1999; 29:2130–9.

Duarte J, Agua-Doce A, Oliveira VG, Fonseca JE, and Graca L. Modulation of IL-17 and Foxp3 Expression in the Prevention of Autoimmune Arthritis in Mice. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10558.

Dumitrascu D. Mast cells as potent inflammatory cells. *Rom J Intern Med.* 1996; 34(3-4):159-172.

Dvorak AM. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils, in *Blood Cell Biochemistry: Megakaryocytes, Platelets, Macrophages and Eosinophils* (Harris JR ed) Plenum Press, London, 1981; 237-344.

EGESTEIN A, Calafat J, Janssen H. et al. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. *Clinical and Experimental Allergy.* 2001; 31:1173-1188.

Ellis EF, Wei EP, Kontos HA. Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D₂, E₂, G₂ and I₂. *Am J Physiol.* 1979; 237(3):H381-385.

Elsas PX; Maximiano ES; Vargaftig BB, Elsas MI. The effects of allergen and anti-allergic drugs on murine hemopoietic cells: moving targets, unusual mechanisms, and changing paradigms. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003; 2:329-337.

Elsas PX, Paula Neto HA, Cheraim AB, Magalhães ESS, Accioly MTS, Carvalho VF, Silva PMR, Vargaftig BB, Cunha FQ & Gaspar Elsas MIC. Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology.* 2004; 143:541–548.

Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 133(1):84-100. Epub 2004 Jan 12.

Eum SY, Créminon C, Hailé S, Lefort J, Vargaftig BB. Inhibition of airways inflammation by dexamethasone is followed by reduced bronchial hyperreactivity in BP2 mice. *Clin Exp Allergy.* 1996; 26(8):971-979.

Facincone S, De Siqueira AL, Jancar S, Russo M, Barbuto JA, Mariano M. A novel murine model of late-phase reaction of immediate hypersensitivity. *Mediators Inflamm.* 1997; 6(2):127-33.

Fallon PG, Smith P, Richardson EJ, Jones FJ, Faulkner HC, Van Snick J, Renauld JC, Grencis RK, Dunne DW. Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect Immun.* 2000 Oct;68(10):6005-11.

Faulkner H, Renauld JC, Van Snick J, Grecis RK. Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect Immun*. 1998; 66:3832–40.

Foster PS. et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp Med*. 1996; 183(1):195-201.

Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, Mahalingam S, McKenzie AN, Rothenberg ME, Young IG, Matthaei KI, Webb DC. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev*. 2001; 179:173-181.

Frew AJ, Key AB. Eosinophil and T-lymphocytes in late -phase allergic reaction. *J All Clin Immunol*. 1990; 85:533-539.

Frigas E, Loegering DA, & Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest*. 1980; 42:35-43.

Fujimura Y, Tachibana H and Yamada K. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands negatively regulate the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 297:193–201.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, and Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; 52: 65-70.

Fukui N, Honda K, Ito E, Ishikawa K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma negatively regulates allergic rhinitis in mice. *Allergol Int*. 2009 Jun;58(2):247-53. Epub 2009 Mar 25

Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J. et al. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol*. 2005; 289:G890-G897.

GASPAR ELSAS MI. et. al. Rapid increase in bone marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17(4):404-13.

GASPAR ELSAS MI. et. al Murine myeloid progenitor responses to GM-CSF and eosinophil precursor response to IL-5 represent distinct targets for downmodulation by Prostaglandin E (2). *Br J Pharmacol*. 2000; 130(6):1362-8.

Gavett SH. et al. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999; 104:721-732.

Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol.* 1997; 120(6):1075-1082.

Giembycz MA and Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev.* 1999; 51(2):213-340.

Ginsel LA, Onderwater JJ, Fransen JA, Verhoeven AJ, Roos D. Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood.* 1990; 76:2105-16.

Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* 1986; 39:177-253.

Gleich GJ and Loegering DA. Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol.* 1984; 2:429-459.

Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 81:776-781.

Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83:3146-50.

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. Eosinophils. In Galli J.I, Goldstein I.M., Snyderman R., (ed) *Inflammation: Basic principles and clinical Correlatives*, 2° ed., New York, Raven Press, Cap. 32, p. 663-700, 1992.

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993; 44:85-101.

GLEICH GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding, *J Allergy Clin Immunol.* 1990. 85:422-435.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105:651-63.

Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995; 4:281-299.

Greene ME, Pitts J, McCarville MA, Wang XS, Newport JA, Edelstein C, Lee F, Ghosh S & Chu S. PPARgamma: observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* 2000; 62:45-73.

Hamann KJ, Ten RM, Loegering DA. et al. Structure and chromosome localization of the human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics.* 1990; 7:535-46.

Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness - a murine model. *Allergy.* 1999; 54:297-305.

Hamelmann E, Gelfand EW. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev.* 2001 Feb;179:182-91.

Hammad H, de Heer HJ, Soullie T et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* 2004; 164:263-71.

Hardin JH and Spicer SS. An ultrastructural study of human eosinophil granules: Maturational stages and pyroantimonate reactive cation. *Am J Anat.* 1970; 128:283-310.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM & Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunol.* 2005; 6(11):1123-32.

Harris SG, Phipps RP. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol.* 2001; 31(4):1098-105.

Hassumi MY, Silva-Filho VJ, Campos-Júnior JC, Vieira SM, Cunha FQ, Alves PM, Alves JB, Kawai T, Gonçalves RB, Napimoga MH. PPAR- γ agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *International Immunopharmacology*. 2009; 9:1150–1158.

Hata AN, Breyer RM Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*. 2004 Aug;103(2):147-66.

Henderson WR, Jong EC, Klebanoff SJ. Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. *J Immunol*. 1980 Mar;124(3):1383-8.

Herschman HR, Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1299:125-140.

Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med*. 2001; 193(2):255-261.

Hisamatsu K, Ganbo T, Nakazawa T. et al. Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to human nasal sinus mucosa *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol*. 1990; 86:52-63.

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbe R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB & Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical and Experimental Allergy*. 2008; 38:709–750.

Hultner L and Moeller J. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Exp. Hematol*. 1990; 18:873.

Iozzo RV, MacDonald GH and Wight TN. Immunoelectron microscopic localization of catalase in human eosinophil leukocytes. *J Histochem Cytochem*. 1982; 30:697-701.

Ishino H, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Kohno M, Wada M, Yamamoto A, Hamaguchi M, Kadoya M, Tokunaga D, Hojo T, Matsuyama M, Yoshimura R, and Yoshikawa T. Feedback control of the Arachidonate Cascade in Osteoblastic Cells by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂. *J. Clin. Biochem*. 2008; 42:64–69.

Ito S, Narumiya S, Hayaishi O. Prostaglandin D₂: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989; 37(4):219-234.

Ivanov II , McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, and Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells. *Cell*. 2006; 126:1121-1133.

Iwasaki H. et al. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J. Exp. Med*. 2005; 201(12):1891-7.

JIANG C, TING AT, SEED B. PPAR-gamma agonists inhibits production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998; 391:82-86.

Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ; 105(6 Pt 1):1063-70.

Jones DG. The Eosinophil. *J. Comp. Path*. 1993. 108: 317-335.

Kanaoka Y, Urade Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 69(2-3):163-167.

Kapsenberg ML et al. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29:33-36.

Kay AB, Menzies-Gow A. Eosinophils and interleukin-5: the debate continues. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:1586-1587.

Kay A.B., Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clin Exp Immunol* . 1985; 62:1-12.

Kay AB. Leucocytes in asthma. *Immunol Invest*. 1988; 17(8-9):679-705.

Kim HR, Jun CD, Lee YJ, Yang SH; Jeong ET, Park SD, Park DS. Levels of circulating IL-33 and eosinophil cationic protein in patients with hypereosinophilia or pulmonary eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(4).

Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J. Allergy Clin. Immunol*. 1996; 97:889–92.

Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med*. 2009; 206:2079-89.

Koike M, Takatsu K. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? *Int Arch Allergy Immunol*. 1994; 104(1):1-9.

Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol*. 2008; 20(6):791-800. Epub 2008 Apr 29.

Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, Weryha G, Jouzeau JY. Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone reabsorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10(1):R6. Epub 2008 Jan 16.

Kramer MS, Matush L, Bogdanovich N, Dahhou M, Platt RW, Mazer B. The low prevalence of allergic disease in Eastern Europe: are risk factors consistent with the hygiene hypothesis? *Clin Exp Allergy*. 2009 May;39(5):708-16. Epub 2009 Mar 3.

Kuperman DA, Schleimer RP. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med*. 2008; 8(5):384-92.

Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, Niedbala W, McKenzie AN, Teixeira MM, Liew FY, Xu D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol*. 2008; 181(7):4780-90.

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009; 183(10):6469-77. Epub 2009 Oct 19.

Lange T, Dimitrov S, Fehm HL, Born J. Sleep-like concentrations of growth hormone and cortisol modulate type1 and type2 *in vitro* cytokine production in human T cells. *Int. Immunopharmacol*. 2006; 6(2):216-225.

Lapa e Silva Jr, Ruffié C, Vargaftig Bb, Pretolani M. Modulation of the bronchial inflammation in sensitized guinea-pigs by FK506, nedocromil sodium and dexamethasone. *Eur Respir J*. 1995; 8(8):1321-1327.

Lee, JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE. et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 1997; 185:2143–2156.

Lemanske JR RF & Busse WW. Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2003; 111:S502–519.

Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1996; 12:335–363.

Lewis RA, Holgate ST, Robert LJ, Oates JA, Austen KF. Preferential generation of prostaglandin D₂ by rat and human mast cells. *Kroc Found Ser*. 1981; 14:239-254.

Li J, Saito Hiroko, Crawford L, Inman MD, Cyr MM e Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology*, 114, 386–396. 2005.

Liew FY, Pitman NI and McInnes LB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews*. 2010; 10:103-110.

Liu X, Li M, Wu Y, Zhou Y, Zeng L, Huang T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 386:181-185.

Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(5):923-32.

Long JA et al. Higher prostaglandin E₂ production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170:485-491.

Longphre M, Li D, Gallup M. et al. Allergen-induced IL9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J. Clin. Invest*. 1999; 104:1375.

Lu Y, Stöstrand M, Malmhäll C, Radinger M, Jeurink D, Lötval J, Bossio A. New production of eosinophils and the corresponding Th1/Th2 balance in the lungs after allergen exposure in Balb/C and C57Bl/6 mice. *Scandinavian J Immunol*. 2010 71:176-185.

Majno G and Joris I. Cells, tissues and disease. Principles of General Pathology, Chapter 17, Hypersensitivity Reactions. Oxford University Press, New York, Oxford, 2nd Ed. 2004; 525-567.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) and stromal cells. *Journal Of Cellular Physiology*, 1998; 176:57–66.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, and Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006; 441:231- 234.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995; 83:835-839.

Martin LB, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, et al. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996; 109:207-15.

Martins MA, Castro-Faria-Melo HC, Bozza PT, Silva PM, Lima MC, Cordeiro RS, Vargaftig BB. Role of PAF in the allergic pleurisy caused by ovalbumin in actively sensitized rats. *J Leukoc Biol*. 1993; 56:104-111.

Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S. Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma. *Science*. 2000; 287(5460):2013-2017.

Metcalf D. Hematopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res*. 1977; 61:1-227.

Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*. 1993; 82:3515-3523.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008; 111:485-491.

Mezadri, TJ, Thomáz VA, Amaral VLL. Animais de Laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis. UFSC, 2004.

Miwa Y, Taba Y, Miyagi M, Sasaguri T. [Physiology and pharmacology of the prostaglandin J₂ family]. Nippon Yakurigaku Zasshi. 2004; 123(1):34-40. Japanese.

Miyazaki Y, Tachibana H and Yamada K. Inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on the expression of IgE heavy chain germline transcripts in the human B cell line DND39. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002; 295:547–552.

Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108:430-8.

Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, and Powell WS. Prostaglandin D₂ is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. Blood. 2001; 98:1942.

Monneret G, Li H, Vasilescu J, Rokach J, and Powell WS. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandins D₂ and J₂ are potent activators of human eosinophils J Immunol. 2002; 168:3563-3569.

Mould A W, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. J Clin Invest 1997; 99: 1064-1071.

Moussion C, Ortega N & Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells *in vivo*: a novel 'alarmin'? PLoS One. 2008; 3:e3331.

Murphy P, Hillman T, Rajakulasingam K. Therapeutic targets for persistent airway inflammation. Biomedicine & Pharmacotherapy . 2010; 64:140-145.

Nakajima H and Hirose K. Role of IL-23 and Th17 cells in airway inflammation in asthma. Immune Network. 2010; 10(1):1-4.

Nakata J et al. Augmentation of allergic inflammation in the airways of cyclooxygenase-2-deficient mice. Respiriology. 2005; 10:149-156.

Napimoga MH, Vieira SM, Dal-Secco D, Freitas A, Souto FO, Mestriner FL, Alves-Filho JC, Grespan R, Kawai T, Ferreira S., Cunha FQ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, reduces neutrophil migration via NO pathway. J Immunol. 2008a; 180(1):609-617.

Napimoga MH, Souza GR, Cunha TM, Ferrari LF, Clemente-Napimoga JT, Parada CA, Verri Jr WA, Cunha FQ, Ferreira SH. 15d-Prostaglandin J₂ inhibits inflammatory hypernociception: involvement of peripheral opioid receptor. J Pharmacol Exp Ther. 2008b; 324(1):313-21.

Narala VR, Ranga R, Smith MR, Berlin AA, Standiford TJ, Lukacs NW and Reddy RC. Pioglitazone is as effective as dexamethasone in a cockroach allergen-induced murine model of asthma. Respiratory Research. 2007; 8(90):1-10.

Narumiya S. and Fukushima M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. J. Phamarcol. Exp. Ther. 1986; 239:500-505.

Negishi M, Katoh H. Cyclopentenone prostaglandin receptors. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002; 611-617.

Nicolete R. Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ ou prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmose murina. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Nie M, Corbett L, Knox J, and Pang L. Differential regulation of chemokine expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists: interactions with glucocorticoids and β 2-agonists. J Biol Chem. 2005; 280(4):2550-61.

Noelle RJ and Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. Nature Reviews Immunol. 2010; 10:683-687.

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood. 1993; 81:2844-2853.

Pacienza N, D'Atri LP, Pozner RG, Negrotto S, Malaver E, Torres O, Schattner M. 15-deoxy-D12,14-PGJ(2) induces cell cycle arrest and apoptosis of haematopoietic progenitors. Br J Haematol. 2010; 148(1):173-5. Epub 2009 Sep 18.

Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-d12,14-PGJ2 induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol.* 2000; 165:6941-6948.

Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from bone marrow. *Blood.* 1998; 91:2240-2248.
Papayannopoulou T and Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood.* 2008; 11:3923-3930.

Paplinska M, Grubek-Jaworska H, Chazan R. Role of eotaxin in the pathophysiology of asthma. *Pneumonol Alergol Pol.* 2007; 75(2): 180-5

Park SJ, Lee KS, Kim SR, Min KH, Choe YH, Moon H, Chae HJ, Yoo WH, and Lee YC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation. *J of Immunol.* 2009; 183:3259–3267.

Park CS. Eosinophilic bronchitis, eosinophilia associated genetic variants, and notch signaling in asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010; 2(3):188-194.

Parmley RT and Spicer SS. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab Invest.* 1974; 30:557-576.

Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116:477-486.

Patel H, Belvisi M, Bishop-Bailey D, Yacoub M, Mitchell J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *J Immunol.* 2003; 170:2663–9.

Pena-Dos-Santos DR, Severino FP, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Cunha FQ, Vieira SM, Napimoga MH and Clemente-Napimoga JT. Activation of peripheral κ/δ opioid receptors mediates 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induced-antinociception in rat temporomandibular joint . *Neuroscience.* 2009; 163(4):1211-1219.

Peres CM, Otton R, Curi R. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages loaded with arachidonic acid. *Cell. Biochem. Funct.* 2005; 23(6):373-381.

Petit-Frere C, Dugas B, Braquet P, Mencia-Huerta JM. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology*. 1993; 79:146-51.

PRETOLANI M, LEFORT J, VARGAFTIG BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138(6):1572-1578.

Pinto TQS. Efeitos dos cisteinil-leucotrienos sobre a produção de eosinófilos em cultura de medula óssea: ações diretas, mediação das ações da indometacina e da aspirina, e regulação da resposta à PGE₂. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo cruz; 2007.

Plager DA, Loegering DA, Checkel JL. et al. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *J Immunol*. 2006; 177:7340–5.

Ponte, EV, Rizzo JA, Cruz AA. Interrelação entre asma, atopia e infecções helmínticas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33(3):335-342.

Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D et al. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood*. 1998; 92:623–31.

Pretolani M, Vargaftig BB. From lung hypersensitivity to bronchial hyperreactivity. What we can learn from studies on animal models? *Biochem Pharmacol*. 1993; 45:791-800.

Pushparaj PN *et al*. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009; 106:9773–9778.

Quackenbush EJ, Aguirre V, Wershil BK, Gutierrez-Ramos JC. Eotaxin influences the development of embryonic hematopoietic progenitors in the mouse. *Journal Of Leukocyte Biology*. 1997; 62:661-666.

Quackenbush EJ, Aguirre V, Wershil BK, Gutierrez-Ramos JC. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from bone marrow. *Blood*. 1998; 92(6):1887-1897.

Rådinger M, Bossios A, Alm AS, Jeurink P, Lu Y, Malmhäll C, Sjöstrand M, Lötval J. Regulation of allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Allergy*. 2007; 62(12):1410-8.

Renauld JC. Interleukin-9. In *Cytokines*, Academic Press, New Your. 1998;142-150.

Renauld,JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *Journal Of Clinical Pathology*. 2001; 54(8):577-589.

Richards DB, Bareille P, Lindo E, Quinn D, Farrow SN. Treatment with a peroxisomal proliferator activated receptor gamma agonist has a modest effect in the allergen challenge model in asthma: a randomized controlled trial. *Resp Med*. 2010; 104:668-674.

Ricote, M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidizes low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998a; 95:7614-7619.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998b; 391:79-82.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-Y) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J. Leukocyte Biol*. 1999; 66:733–739.

Rocca B and Fitzgerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2(5):603-630.

Rosenberg HF, Dyer KD, Tiffany HL, Gonzalez M. Rapid evolution of a unique family of primate ribonuclease genes. *Nat Genet* .1995; 10(2):219-223.

Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol*. 2001; 70:691-98.

Rosenberg HF, Tenen DG and Ackerman SJ. Molecular cloning of the human eosinophil-derived neurotoxin: a member of the ribonuclease gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:4460–4464.

Rothenberg ME and Hogan SP. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24:147–74.

Rothenberg M, Ackerman S, Moqbel R, Simon HU. Meeting report: 4th Biennial Congress of the International Eosinophil Society. *Allergy*. 2005; 60:1337-1338.

Rothenberg ME. Eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338:1592–1600.

Russo M, Mariano M, Jancar S. A new murine model of persistent lung eosinophilic inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(Suppl. II): 215-218.

Saito Y, Nishio K, Numakawa Y, Ogawa Y, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. Protective effects of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 against glutamate-induced cell death in primary cortical neuron cultures: induction of adaptive response and enhancement of cell tolerance primarily through up-regulation of cellular glutathione. *J Neurochem*. 2007; 102(5):1625-1634.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood*. 1992; 79:3101-3109.

Santos MCS. Caracterização dos efeitos do miriadenolídeo, um diterpeno imunoregulatório, isolado de *Alomia myriadenia*, sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea murina. [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense; 2008.

Schaeffer HE, Hubner G, Fischer R. Specific microgranules in eosinophils. A comparative electronmicroscopic study on various mammals for the characterization of a special form of granulation in eosinophil granulocytes. *Acta Haematol.* 1973; 50(2):92-104.

SCHER JU and PILLINGER MH. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunology*,. 2005; 114:100-109.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23(5):479-90.

Schneider E, Petit-Bertron AF, Bricard R, Levasseur M, Ramadan A, Girard JP, Herbelin A, Dy M. IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. *J Immunol.* 2009; 183(6):3591-7. Epub 2009 Aug 14.

Schröder NWJ, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy.* 2007; 62(6):579-590.

Schwartz DA. Gene–environment interactions and airway disease in children. *Pediatrics.* 2009; 123(Suppl 3):S151–S159.

Serhan CN, Devchand PR. Novel antiinflammatory targets for asthma. A role for PPARgamma? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24:658–661.

Sheikh A, Strachan DP. The hygiene theory: fact or fiction? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(3):232-6.

Shi H. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76:520–27.

Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009; 49:123-150.

Shurin MR et al. Effect of a conditioned aversive stimulus on the immune response in three strains of rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1995; 20:837-849.

Singh AD, Sanderson CJ. Anti-interleukin 5 strategies as a potential treatment for asthma. *Thorax.* 1997; 52(5):483-485.

Singh N, Webb R, Adams R, Evans SA, Al-Mosawi A, Evans M, Roberts AW, Thomas AW. The PPAR-gamma activator, rosiglitazone, inhibits actin polymerisation in monocytes: involvement of Akt and intracellular calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333:455-462.

Siqueira ALP, Russo M, Steil AA, Facincone S, Mariano M, and Jancar S. A new murine model of pulmonary eosinophilic hypersensitivity: Contribution to experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100(3):383-8.

Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J. Immunol.* 1986; 137:2913–17.

Sokol RJ, James NT, Wales J and Hudson G. Morphometry of eosinophils in human blood. *Acta Anat.* 1987; 129:211–213.

Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M, and Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6 – dependent Th17 cell development and survival. *J. Exp. Med.* 2008; 205(10):2281-2294.

Sonoda Y. [Humoral regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-5]. *Nippon Rinsho.* 1993; 51(3):565-70. Japanese.

Soroosh P and Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology.* 2009; 127:450–458.

Soussi-Gounni A, Kontolemos M and Hamid Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107(4):575-582.

Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML and Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Current Opinion in Immunology.* 2010; 22:821–826.

Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, and Liew FY. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol.* 2010; 185:3472–3480.

Stritesky GL, Muthukrishnan R, Sehra S, Goswami R, Pham D, Travers J, Nguyen ET, Levy DE and Kaplan MH. The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development immunity. 2011; 34:39-49.

Sun XH, Davis WB, Fukuda Y, Ferrans VJ, Crystal RG. Experimental polymyxin B-induced interstitial lung disease characterized by an accumulation of cytotoxic eosinophils in the alveolar structures. *Am Rev Respir Dis,* 1985; 131:103-108.

Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, Von Andrian UH, Luster AD, BLTR mediates leukotriene B4-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med.* 2000; 192:439–446.

Tanaka k, Hirai H, Takano S, Nakamura M, Nagata K. Effects of prostaglandin D₂ on helper T cell functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316:1009–1014.

Tavernier J, Tuypens T, Plaetinck G, Verhee A, Fiers W, Devos R. Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin-5 receptor alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:7041-7045.

Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R and Flavell RA. IL-9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *International Immunology.* 2006; 19(1):1-10.

Ten, RM et al. Molecular Cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med.* 1989; 169(5):1757-69.

Ten RM, Butterfield JH, Kita H, Weiler DA, Fischkoff S, Ishizaka T, Sanderson CJ and Gleich GJ. Eosinophil differentiation of human umbilical cord mononuclear cells and prolonged survival of mature eosinophils by murine EL-4 thymoma cell conditioned medium. *Cytokine.* 1991; 3:350–359.

Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide *in vitro* or *in vivo*. *J Immunol.* 2000; 164:1046-1054.

Thompson PW, Bayliffe AI, Warren AP, Lamb JR. Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4⁺ T cells. *Cytokine.* 2007; Sep 4; [Epub ahead of print]

Tomaki M, Zhao LL, Lundahl J, Sjöstrand M, Jordana M, Lindén A, O'Byrne P, Lötval J. Eosinophilopoiesis in A Murine Model of Allergic Airway Eosinophilia: Involvement of Bone Marrow IL-5 and IL-5 Receptor *J Immunol.* 2000;165(7):4040-4050.

Tomaki M, Zhao L-L, Sjöstrand M, Lindén A, Ichinose M, Lötval J. Comparison of effects of anti-IL-3, IL-5 and GM-CSF treatments on eosinophilopoiesis and airway eosinophilia induced by allergen. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2002; 15:161–168.

Torres R, Picado C, Mora F. use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. *Arch Bronc.*2005; 41(3):141-152.

Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):548-65.

Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell & Paul E. PPAR-alpha and -gamma but not delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kB independent effect. *Whittaker British Journal of Pharmacology.* 2003; 139:163–171.

Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins other lipid. Mediat.* 2002; 68-69:535-556.

Tuypens T, Plaetinck G, Baker E, Sutherland G, Brusselle G, Fiers W, Devos R, Tavernier J. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene. *Eur Cytokine Netw.* 1992; 3:451-459.

Ueki S, Adachi T, Bourdeaux J, Oyamada H, Yamada Y, Hamada K, Kanda A, Kayaba H, Chihara J. Expression of PPARgamma in eosinophils and its functional role in survival and chemotaxis. *Immunology Letters,* 2003; 86:183-189.

Ushikubi F. et al. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol.* 2000; 83:279-285.

Uyttenhove C, Simpson RJ and Van Snick J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1988; 85:6934.

Valent P . Pathogenesis, classification, and therapy of eosinophilia and eosinophil disorders. *Blood Reviews.* 2009; 23:157–165.

Venge P, Bystrom J, Carlson M, Hakansson L, Karawacjzyk M, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECPas a marker of eosinophil activation in disease. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29:1172–86.

Venkatesh J, Peeva E, Xu X, Diamond B. Cutting edge: hormonal milieu, not antigenic specificity, determines the mature phenotype of autoreactive B cells. *J. Immunol.* 2006; 176(6):3311-3314.

Vieira PL et al. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol,* 2000; 164: 4507-4512.

Wagey R. Mesenchymal cells. Stem Cells www.stemcell.com, 29018 | versão 2.0.0, 2008

Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S-I, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, and Nakajima H. IL-23 and Th17 Cells enhance Th2-Cell mediated eosinophilic airway inflammation in mice . American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine. 2008; 178:1023-1034.

Walsh ER and August A. Eosinophils and allergic airway disease: there is more to the story. Trends in Immunology. 2009; 31(1):39-44.

Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I κ B degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- independent mechanism. J Immunol. 2002; 168:6232–6243.

Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: biology and role in disease. Adv Immunol. 1995; 60:151-266.

Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA, Gleich GJ, Prendergast FG, & McKean DJ. Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. J Biol Chem. 1988; 263:12559-63.

Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S. A monoclonal antibody recognising very late activation antigen-4 (VLA-4) inhibits eosinophil accumulation in vivo. J Exp Med. 1993; 177:561-566.

Weiss KB and Sullivan SD. The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact . J Allergy Clin Immunol. 2001; 107:3-8.

Weissman OL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001; 17:387-4033.

Weller PF and Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Blood. 1985; 65:1269-1274.

Weller PF, Bandeira-Melo C. Mechanisms of eosinophil cytokine release. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100:73-81.

Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med.* 1991; 324:1110-1118.

Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6:85-90.

Whelan CJ. Inhibition of PAF-, LPS-, and cytokine-induced granulocyte accumulation in guinea pig lung by dexamethasone: evidence that inhibition of IL-5 release is responsible for the selective inhibition of eosinophilia by glucocorticoids in guinea-pigs. *Inflamm Res.* 1996; 45(4):166-170.

Wilde CG, Snable JL, Scott RW, Loegering DA and Gleich GJ. Identification of eosinophil-derived neurotoxin as the major protein constituent of human basophil granules (Abstract). *FASEB J.* 1992; 6:A1722.

WILLS-KARP e HERSEY M, Hersey GK. Ed *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Eillians&Wilkins, 5^a ed. 2003.1701p.

Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin J-P, Auwerx J, Staels B, Capron M, and Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha e gamma and down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J. Exp. Med.* 2003; 198(3):411-421.

Wong CK, Ho CY, KO Fws, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, Lam CWK. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-g, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol.* 2001 Aug;125(2):177-83.

Xavier-Elsas P. et al. Ectopoc lung transplantation induces the accumulation of eosinophil progenitors in the recipients' lung through an allergy-and interleukin-5-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37:29-38.

Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang FP, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, and Liew FY. Expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J. Exp. Med.* 1998; 187(5):787-794.

Yamaguchi Y, Suda T, Shiozaki H, Hitoshi Y, Tominaga A, Takatsu K, Kasahara T. Role of IL-5 in IL-2-induced eosinophilia. In vivo and in vitro expression of IL-5 mRNA by IL-2. *J Immunol.* 1990; 145(3):873-877.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science.* 2002; 296:490-494.

Yki-Jarvinen, H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004; 351:1106–1118.

Young JD, Peterson CG, Venge P and Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*. 1986; 321:613–616.

Zabeau L, Gevaert P, Bachert C, Tavernier J. Interleukin-5, eosinophilic diseases and therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003. 2:319-328.

Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity*. 1999; 11:473-82.

Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002; 21:3295-3313.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:7921-7925.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272:25500-25506.

Zingarelli B e Cook J A. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*, 2005; 23(5):393-399.

Zingarelli B, Hake PW, Mangeshkar P, O'connor M, Burroughs TJ, Piraino G, Denenberg A, Wong HR. Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands, 15-deoxy-delta^{12,14} prostaglandin J₂ and ciglitazone, in reperfusion injury: role of nuclear-kappaB, heat shock factor 1 and AKT. *Shock*. 2007; [Epub ahead of print]

Zosky GR and Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37:973–988.

Zucker Franklin D. Eosinophil structure and maturation, in *The Eosinophil in Health and Disease* (Mahmoud AAF and Austen KF eds) pp 43–60, Grune and Stratton, New York. 1980.

ANEXO A

– Protocolo de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-069/2009

Uberaba, 19 de junho de 2009

Ilmo. Prof^o,

Marcelo Henrique Napimoga

Assunto: Encaminha parecer nº 049/2009, sobre o protocolo de pesquisa "*Determinação do efeito inibitório da 15d-PGJ² no recrutamento de eosinófilos em um modelo de eosinofilia crônica e seus mecanismos de ação*" – Processo 049/2009.

Prezado Senhor,

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 19/06/2009, sendo **aprovado**.

Atenciosamente,


Prof. Juliana Trindade Clemente Napimoga
Coordenadora do CEEA-UNIUBE