

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo da Regulação da Eosinopoiese em um Modelo
Experimental de Asma Alérgica: Contribuição dos
Glicocorticóides Endógenos

DANIELA MASID DE BRITO

RIO DE JANEIRO

2010

TESE MBCM-IOC*

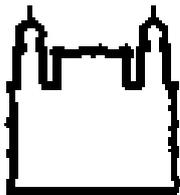
D. MASID-DE-BRITO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELA MASID DE BRITO

Estudo da Regulação da Eosinopoiese em um Modelo Experimental de Asma
Alérgica: Contribuição dos Glicocorticóides Endógenos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas, Departamento de Pediatria, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Elsas, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

RIO DE JANEIRO
2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ – RJ

B862

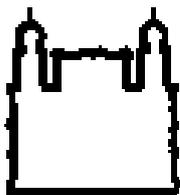
Brito, Daniela Masid de

Estudo da regulação da Eosinopoiese em um modelo experimental da asma alérgica : contribuição dos Glicocorticóides endógenos / Daniela Masid de Brito. – Rio de Janeiro, 2010.
xiv, 96 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.
Bibliografia: f. 75-82

1. Asma. 2. Estresse. 3. Hematopoiese. 4. Eosinopoiese. 5. Glicocorticóide. 6. RU 486. 7. Metirapone I. Título.

CDD 616.2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Daniela Masid de Brito

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DA EOSINOPOIESE EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ASMA ALÉRGICA: CONTRIBUIÇÃO DOS
GLICOCORTICÓIDES ENDÓGENOS**

ORIENTADOR (ES):

Profa. Dra. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas, Departamento de Pediatria, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ.

Prof. Dr. Pedro Paulo Elsas, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica - **Presidente**

Prof. Dr. Bruno Lourenço Diaz, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Immunobiologia, UFRJ

Prof. Dr. Alberto Felix Antonio da Nbrega, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Imunologia, UFRJ

Defesa na sala 14B do Pavilhão Helio e Peggy Pereira em

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2010

Dedico esta dissertação a minha
família e amigos que sempre me apoiaram
em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Maria do Carmo e Antonio, ao meu irmão Gabriel e a minha avó Maria que me apoiaram durante toda a minha jornada com amor, compreensão e paciência.

Ao amor da minha vida, Daniel Medina, que está ao meu lado, sempre me apoiando, me entendendo em todos os momentos desse trabalho. Te amo muito!!!

À minha afilhada Julia pela alegria, mesmo nos poucos momentos que ficamos juntas.

Obrigado aos meus orientadores, Maria Ignez Elsas e Pedro Paulo Elsas, por terem me ajudado a crescer profissional e pessoalmente durante toda a minha formação acadêmica.

Aos amigos de laboratório que me ajudaram tanto na bancada quanto nos momentos de descontração: Túlio Queto, Ricardo Luz, Daniella Moore, Marcelo Aranha, Monica Barradas, Zilton Vasconcelos, Anísia Praxedes, Bianca De Luca, Cássio Coutinho, Carina Anselmo, Thiago Soares, Luiz Carlos Arcanjo, Amanda Rodrigues, Camila Girão e Ana Amélia Guiné.

As minhas dançarinas, amigas e companheira de todos os momentos, Pat Monteiro, Bel Carvalho e Nanda Martinez.

Às amigas que estão presentes na minha vida e deixam os momentos cada vez mais divertidos, mesmo quando não podemos ficar sempre juntas: Ana Paula, Ethel e Michelle.

Aos amigos que sempre me divertem: Marcos, Marcela, Michel, Rafael, Pedro, Diego, Carol, Vinicius, Luiz e Vanessa.

A Mônica Forino e as meninas por fazerem da dança meu momento de relaxamento e diversão.

Ao CNPq e FAPERJ pela bolsa de estudos que me concedeu durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Inflamação (IOC-FIOCRUZ) e Laboratório de Técnicas Histológicas (UFF).

Agradeço principalmente a Deus por permitir que eu fizesse esse trabalho, com saúde, força, coragem e disposição.

Sumário

Folha de Rosto	ii
Agradecimentos	vi
Sumário	viii
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1 <i>Asma Alérgica e Eosinófilos</i>	1
1.2 <i>Asma e Estresse</i>	5
1.3 <i>O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) no estresse e na Inflamação</i>	7
Figura 1.1. Eixo Hipotálamo-hipofisário-adrenal e sua comunicação bidirecional com o sistema imune.....	8
1.4 <i>Hematopoiese e Eosinofiloiose</i>	12
Figura 1.2. Eosinopoiese.....	15
1.5 <i>Eosinopoiese e glicocorticóides</i>	16
1.6 <i>Hipótese</i>	21
1.7 <i>Desenho Experimental</i>	21
2. Objetivos	22
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	22
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 <i>Reagentes Utilizados</i>	23
3.1.1 <i>Meios de Cultura e Suplementos</i>	23
3.1.2 <i>Citocinas Recombinantes, Quimiocinas e Drogas</i>	23
3.2 <i>Cepas de Animais Utilizadas</i>	23
3.3 <i>Protocolo de Sensibilização dos Animais</i>	24
3.4 <i>Protocolo de Provocação dos Animais</i>	24
3.5 <i>Tratamento com Mifepristone (RU 486)</i>	25
Figura 3.1.....	25
3.6 <i>Tratamento com Metirapone</i>	26
Figura 3.2.....	26
3.7 <i>Lavado Broncoalveolar</i>	27

Figura 3.3.....	27
3.8 <i>Função Pulmonar</i>	27
Figura 3.4.....	28
3.9 <i>Dosagem de Corticosterona</i>	28
3.10 <i>Técnica Histológica</i>	28
3.11 <i>Esfregaço Sanguíneo</i>	29
3.12 <i>Obtenção de Células da Medula Óssea</i>	29
3.13 <i>Cultura Líquida de Precursores da Medula Óssea</i>	29
Figura 3.5.....	30
3.14 <i>Técnicas de Contagem, Fixação e Coloração</i>	30
3.14.1 <i>Contagem de Células Totais</i>	30
3.14.2 <i>Citocentrifugação e reação citoquímica para marcação de Peroxidase Resistente ao Cianeto</i>	31
3.14.3 <i>Corantes</i>	31
3.15 <i>Análise Estatística</i>	32
4. Resultados	33
4.1 <i>Impacto do bloqueio dos Glicocorticóides endógenos sobre a resposta hematopoiética in vivo e ex vivo à provocação alérgica</i>	33
Figura 4.1.....	35
Figura 4.2.....	38
Figura 4.3.....	41
4.2 <i>Efeito do Metirapone sobre a eosinofilia do sangue periférico</i>	42
Figura 4.4.....	43
4.3 <i>Impacto da provocação única sobre os pulmões, como evidenciado em cortes histológicos</i>	44
Figura 4.5.....	46
4.4 <i>Impacto da provocação sobre a eosinofilia do fluido de Lavagem broncoalveolar (BAL) em animais sensibilizados e provocados, e seu bloqueio pelo RU486</i>	47
Figura 4.6.....	49
4.5 <i>Impacto da provocação sobre a eosinofilia da medula óssea num protocolo de provocações múltiplas e seu bloqueio pelo RU486</i>	50
Figura 4.7.....	51
4.6 <i>Impacto do tratamento com RU486 ou metirapone sobre a função pulmonar</i>	52

<i>em animais sensibilizados e provocados.....</i>	
Figura 4.8.....	53
4.7 Papel dos Glicocorticóides endógenos na imunorregulação da resposta de células da medula óssea à eotaxina em animais imunizados e provocados.....	54
Figura 4.9.....	56
Figura 4.10.....	58
4.8 Impacto da deficiência receptor de tipo I para TNF-α na modulação da eosinopoiese pela provocação alérgica.....	59
Figura 4.11.....	60
5. Discussão.....	61
6. Conclusão.....	73
7 Bibliografia.....	75

Lista de Abreviaturas

ACTH –	Hormônio adrenocorticotrófico
AHR –	Hiperresponsividade das vias aéreas
AP-1 –	Proteína ativadora 1
BAL –	Lavado broncoalveolar
CBG –	Globulina dos corticosteróides
CCL5 –	Quimiocina (motivo C-C) ligante 5
CD –	Cluster de diferenciação
CLP –	Progenitor linfóides Comum
CMP –	Progenitor mieloide Comum
CRH –	Hormônio liberador de corticotrofina
ECP –	Proteína catiônica eosinofílica
Eot –	Eotaxina
EPO –	Peroxidase do eosinófilo
FCS –	Soro fetal bovino
FLT3 –	Tirosina quinase 3 parecida com FMS
FMS –	Receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos
GM-CSF –	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GR –	Receptor de glicocorticóides
GRE –	Elementos de resposta dos receptores de glicocorticóides
HPA –	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HSC –	Células tronco hematopoiéticas
HSP –	Proteínas de choque térmico
IFN- γ –	Interferon gama
Ig –	Imunoglobulina
IL –	Interleucina
IL-5R α –	Receptor de interleucina 5 alfa
iNOS –	Isoforma indutível da oxido nítrico
MBP –	Proteína básica maior
MCH –	Hormônio concentrador de melanina
Met –	Metirapone
MR –	Receptor de mineralocorticóide

mRNA –	Ácido ribonucléico mensageiro
NFκb –	Fator nuclear kappa B
NK –	Célula natural killer
NO –	Óxido nítrico
OVA –	Ovalbumina
PMCH –	pró-MCH
PGE ₂ –	Prostaglandina E ₂
RANTES –	Expresso e secretado em células T normais, regulado após ativação
RU –	RU 486
RU 486 –	Mifepristone
SAL –	Salina
SAM –	Simpático-adrenomedular
Sca-1 –	Antígeno da célula tronco-1
SCF –	Fator da célula tronco
SNC –	Sistema nervoso central
STAT6–	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
TGF-β –	Fator de crescimento transformador beta
Th –	Célula T helper
Thy-1 –	Antígeno de diferenciação de timócitos 1
TNF-α –	Fator de necrose tumoral alfa
TRFK-5 –	Anticorpo anti-IL-5
VCAM –	Molécula de adesão celular vascular

Resumo

Introdução: A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica, com hiperresponsividade das vias aéreas, inflamação (com infiltrado eosinofílico importante) e obstrução reversível das vias aéreas, cuja prevalência global vem aumentando. Os eosinófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, em resposta à interleucina(IL)-5, e posteriormente liberados na circulação, sendo recrutados por fatores quimiotáticos como eotaxina, para sítios inflamatórios, incluindo o pulmão. Estresse é um estado de homeostase ameaçada, apontado por muitos estudos como fator predisponente para a evolução das doenças alérgicas, incluindo a asma. O eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), componente neuroimunoendócrino central da resposta ao estresse, é ativado por citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF). Os glicocorticóides, em doses terapêuticas, suprimem a eosinofilia no sangue periférico e tecidos, inibindo a produção de IL-5, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-3, e induzindo a apoptose em eosinófilos maduros. Contudo, em certas condições, os glicocorticóides são estimulatórios, e não inibitórios, para a eosinopoiese. A provocação alérgica em animais sensibilizados modifica o padrão de resposta das células de medula óssea à IL-5 e à eotaxina. **Objetivo:** No presente estudo avaliamos o papel desempenhado pelos hormônios de estresse secretados pela adrenal na imunorregulação da eosinopoiese em camundongos sensibilizados, utilizando o tratamento com bloqueadores da produção (metirapone) e da atuação dos glicocorticóides adrenais (mifepristone, RU486). **Metodologia:** Camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina, submetidos ao pré-tratamento com metirapone ou RU486, antes da provocação alérgica por via intranasal. Vários aspectos foram avaliados: a) a presença de eosinófilos na medula óssea recém-coletada, e após cultura líquida na presença de IL-5; b) a presença de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) e no sangue periférico; c) a função pulmonar e a presença de infiltrados inflamatórios no pulmão. Em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, assim como nos animais deficientes para o receptor de tipo I para TNF, de mesmo background genético, avaliamos a resposta da medula óssea à provocação. **Resultados:** O tratamento com RU486 ou metirapone em animais provocados com OVA aboliu o aumento no número de células EPO+ na medula óssea *in vivo* e *ex vivo*. Os níveis de corticosterona aumentaram em animais provocados, e o aumento foi inibido pelo metirapone. O tratamento com RU486 impediu o aumento nos números de eosinófilos no BAL em resposta à provocação. O tratamento com RU486 ou metirapone aboliu o aumento na resistência de vias aéreas induzido pela provocação. O tratamento com RU486 bloqueou as mudanças no padrão de resposta da medula óssea *ex vivo* à eotaxina, induzidas pela provocação. A modulação da resposta das células da medula óssea em resposta à provocação alérgica não foi observada em animais deficientes do receptor do tipo I para TNF- α . **Conclusão:** em conjunto, os dados mostram um importante papel dos glicocorticóides endógenos para a resposta da provocação alérgica e modulação de citocinas envolvidas na migração de eosinófilos, assim como para a presença de eosinófilos no BAL e sua função pulmonar.

Abstract

Introduction: Atopic asthma is a chronic inflammatory disease, characterized by hyperresponsiveness of airways, eosinophil-rich inflammatory infiltrates in the lungs and reversible obstruction of the air flow, which is becoming increasingly prevalent worldwide. Eosinophils are produced and stored in bone-marrow, in response to interleukin(IL)-5, and subsequently released in the circulation and recruited into peripheral tissues, under the influence of chemotactic factors such as eotaxin, which is released from inflammatory sites, including asthmatic lungs. Stress, defined as a state of threatened homeostasis, is increasingly regarded in the scientific literature as a predisposing factor for the development of allergic diseases, including asthma. The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA), the central neuroimmunoendocrine component of the physiological response to stress, is activated by inflammatory component of the physiological response to stress, is activated by inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor – α (TNF- α). Glucocorticoids, in the therapeutic dose range, suppress the eosinophilia of blood and peripheral tissues, through inhibitory effects on production of cytokines, including IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3, and through induction of mature eosinophil apoptosis. However, in specific conditions, glucocorticoids are stimulatory, rather than inhibitory, for eosinopoiesis in bone-marrow. In addition, allergen challenge of sensitized mice profoundly modifies the pattern of response to IL-5 and eotaxin in the bone-marrow. Aim of study: To evaluate the role of the adrenal glucocorticoid hormones in the immunological regulation of eosinopoiesis in sensitized mice, using an inhibitor of adrenal glucocorticoid synthesis (metyrapone), along with an antagonist of the glucocorticoid receptor (mifepriston, RU486). Experimental design and methods: BALB/c mice were sensitized to ovalbumin, treated with metyrapone or RU486 before intranasal allergen challenge. The following aspects were evaluated: a) the presence of eosinophils in the recently harvested bone-marrow, and following bone-marrow culture in the presence of IL-5; b) the presence of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and peripheral blood; c) airway resistance and inflammatory changes in the lungs. In wild-type mice of the C57BL/6 strain, as well as mice of the same genetic background, lacking the type I receptor for TNF, we have evaluated the *in vivo* bone-marrow response to challenge. Results: Treatment with RU486 before ovalbumin challenge abolished the increase in numbers of eosinophils in bone-marrow, both *in vivo* and *ex vivo*. Corticosterone levels were increased in plasma by challenge and this increase was prevented by metyrapone treatment. Treatment with RU486 prevented the increase in BAL eosinophil numbers, as well as in airway resistance induced by challenge. RU486 treatment further prevented the changes in responsiveness to eotaxin *ex vivo*, which were induced by challenge in untreated controls. Bone-marrow responses to allergen challenge were not observed in mice lacking the type I receptor for TNF, but were present in wild-type controls. Conclusions: Together, these observations point to an important role of adrenal glucocorticoids in the response to airway challenge, in both lungs and bone-marrow, and further implicate them in the modulation of responses to eotaxin.

1. Introdução

1.1 Asma alérgica e eosinófilos

A asma, durante os últimos 40 anos, tem apresentado um aumento acentuado na sua prevalência global, morbidade, mortalidade, e no custo econômico. Aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo tem asma atualmente, e esta prevalência aumenta em 50% a cada década. O crescente número de hospitalizações por asma, que são mais acentuadas em crianças, reflete o aumento da asma severa, para a qual contribuem o controle precário da doença, e um contexto de miséria. Mundialmente, cerca de 180.000 mortes por ano são atribuíveis a asma, embora a taxa de mortalidade global tenha diminuído desde a década de 1980 (Braman, 2006).

A asma é categorizada, com base em dados clínicos e laboratoriais, em formas não-atópicas e atópicas (também chamadas *alérgicas*). A maioria dos asmáticos tem a forma atópica. Um fator patogênico essencial à asma atópica é a produção de anticorpo específico de classe IgE, que é produzido por células B após a sensibilização ao alérgeno, e que se liga, na ausência de antígeno, a mastócitos e basófilos, preparando-os para uma resposta imediata a um novo encontro com o mesmo alérgeno, (Hamid & Tulic, 2009). Um outro fator patogênico importante é a ação dos eosinófilos, que contribuem para o dano tecidual através da liberação de proteínas tóxicas, citocinas e mediadores lipídicos (Rothenberg & Hogan, 2006).

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas (AHR), inflamação com um infiltrado eosinofílico importante, e obstrução reversível das vias aéreas. Além disso, há mudanças estruturais, denominadas remodelamento, que resultam do desequilíbrio entre mecanismos de lesão inflamatória e de reparo (Humbles *et al.*, 2004, Kay *et al.*, 2004). Vários estudos sugerem um papel importante para os eosinófilos, tanto na lesão crônica como no remodelamento, mas a questão é complexa, e estudos recentes divergem em pontos importantes nas suas conclusões (Humbles *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

A inalação de determinados alérgenos, como as proteases excretadas por ácaros domiciliares, presentes na poeira doméstica, estimula células do sistema imune a secretar citocinas que promovem a apresentação de antígenos para células T CD4 + e favorecem uma resposta T helper (Th)-2. Citocinas Th2 como Interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13, e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), induzem alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, incluindo fibrose subepitelial, que são associadas com a asma (Humbles *et al.*, 2004, Finkelman *et al.*, 2010). A IL-5 e a IL-13 são fatores importantes na eosinopoiese, ou produção de eosinófilos que tem lugar na medula óssea (Queto *et al.*, 2010b). As mesmas citocinas podem estender a sobrevivência dos eosinófilos nos sítios inflamatórios e promover a sua ativação (Zabeau *et al.*, 2003).

A obstrução das vias aéreas na asma e os conseqüentes sinais e sintomas (tosse, dispnéia, sensação de aperto no peito e chiado) são causados pela combinação da constrição do músculo liso das vias aéreas com a inflamação dos brônquios e parênquima pulmonar. A inflamação das vias aéreas na asma tem como principais sinais: o edema da mucosa, submucosa e adventícia; a infiltração leucocitária, rica em eosinófilos, (em geral, acompanhados de neutrófilos e mastócitos) e linfócitos T helper ativados; o aumento das secreções das vias aéreas, especialmente de muco; a descamação de células do revestimento e a passagem de eosinófilos para o espaço intraluminal; o ingurgitamento capilar; a hiperplasia do músculo liso; e a deposição de colágeno em excesso, particularmente imediatamente abaixo da membrana basal do epitélio (Fanta, 2009; Radinger & Lötvall, 2009, Finkelman *et al.*, 2010).

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais envolvidos em uma série de processos inflamatórios, incluindo infecções por helmintos e doenças alérgicas. Em resposta a estímulos, como a exposição a helmintos ou alérgenos, os eosinófilos são recrutados da circulação para os sítios inflamatórios (Rothenberg & Hogan, 2006; Radinger & Lötvall, 2009). Eosinófilos contribuem para a manifestação dos sintomas através da liberação de proteínas do grânulo e mediadores pró-inflamatórios. Por exemplo, as proteínas do grânulo aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a produção de muco, resultando em edema do tecido e obstrução das vias aéreas. As proteínas contidas nos grânulos eosinofílicos, tais

como proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a peroxidase eosinofílica (EPO) são tóxicas para o epitélio respiratório (Radinger & Lötvall, 2009).

Os eosinófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, para ser posteriormente liberados para a circulação e recrutados, sob a influência de fatores quimiotáticos, para os sítios de inflamação, onde eles podem contribuir para danos nos tecidos através da secreção de proteínas tóxicas, mediadores inflamatórios e citocinas (Gaspar Elsas *et al.*, 2000b).

O aumento do número de eosinófilos na mucosa brônquica, bem como no lavado broncoalveolar (BAL) e escarro são características consistentes da asma e a eosinofilia no BAL tem sido associada ao desenvolvimento da resposta das vias aéreas e gravidade da asma. Embora a diferenciação terminal de eosinófilos ocorra dentro da medula óssea, evidências recentes indicam que os eosinófilos também podem se diferenciar localmente no local da inflamação e que a presença de eosinófilos no tecido da mucosa alérgica não é unicamente devido à infiltração de células maduras (Gaspar Elsas *et al.*, 2003; Hamid e Tulic, 2009).

O tráfego de eosinófilos para os sítios inflamatórios é coordenado por uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. As citocinas importantes que regulam o tráfego de eosinófilos são produtos de células Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-13. O primeiro estágio do tráfego de eosinófilos é a mobilização de células da medula óssea, que é regulada pela IL-5 e quimiocinas (como RANTES/CCL5 e eotaxina), enquanto a IL-4 e IL-13 são conhecidos por regular a transmigração de eosinófilos dos vasos para os tecidos, aumentando a expressão de moléculas de adesão (β 1, β 2- e β 7-integrinas, por exemplo) sobre o endotélio (Rothenberg & Hogan, 2006; Radinger & Lötvall, 2009).

IL-5 é a citocina Th2 mais importante para a linhagem eosinofílica, porque regula a maioria dos aspectos do ciclo vital dos eosinófilos, incluindo a proliferação, diferenciação, maturação, sobrevivência e ativação. A IL-5 pode ser produzida pelas células T helper, linfócitos T citotóxicos (células T CD8), natural killer (NK),

mastócitos, eosinófilos e células epiteliais das vias aéreas (Kay *et al.*, 2004; Hamid & Tulic, 2009).

Eosinófilos humanos expressam RNA mensageiro para IL-5 (mRNA) e liberam a proteína IL-5 *in vitro*. O desafio alergênico em segmentos brônquicos resulta em aumento da expressão de mRNA da IL-5 em eosinófilos no fluído do BAL, com aumento de 300 vezes maior da concentração da IL-5. IL-5 tem um papel central no acúmulo e ativação de eosinófilos nos pulmões, um efeito facilmente visto em camundongos transgênicos que expressam muita IL-5, os quais têm eosinofilia ao longo da vida (Hamid & Tulic, 2009).

IL-5, além de ser um potente agente mobilizador para eosinófilos, também regula a expressão da molécula de adesão $\alpha 4$ integrina nesta linhagem, promovendo aderência ao endotélio, seguida de migração e acúmulo de eosinófilos nos tecidos, uma vez que células endoteliais expressam VCAM, que se liga a integrina (Hamid & Tulic, 2009).

Estudos do nosso grupo mostraram que os precursores eosinofílicos respondem à IL-5, produzindo uma resposta aumentada em um modelo murino de asma após 24h em relação à animais não alérgicos, observando-se produção de eosinófilos maduros e que esta é parcialmente inibida pelo tratamento *in vivo* com anticorpo anti-IL-5 TRFK-5 (Gaspar Elsas *et al.*, 1997).

Os eosinófilos são considerados um importante alvo para terapias anti-asmáticas potenciais e bloqueio da IL-5 tem sido amplamente investigada como um tratamento potencial (Foster *et al.*, 2002). Diversos estudos da literatura apresentam sucesso parcial no tratamento de pacientes asmáticos com reagentes específicos para IL-5.

Flood-Page e colaboradores mostraram que o anticorpo monoclonal humanizado contra a IL-5, mepolizumab, reduz o número de eosinófilos na medula óssea e mucosa brônquica na asma, porém menos do que o observado no sangue e BAL, e não foi observada diferença da hiperreatividade das vias aéreas (Flood-Page *et al.*, 2003).

Menzies-Gow e colaboradores mostraram que o tratamento com mepolizumab reduz os estágios terminais da diferenciação dos eosinófilos na medula óssea, mas não teve efeito significativo sobre o número de células progenitoras para eosinófilos (Menzies-Gow *et al.*, 2003).

O mepolizumab não teve nenhum efeito sobre a magnitude da reação da asma tardia ou na hiperreatividade das vias aéreas após o desafio com alérgenos inalados (Leckie *et al.*, 2000). Também não teve efeito sobre a reação alérgica cutânea na fase tardia, mesmo diminuindo a infiltração de eosinófilos (Phipps *et al.*, 2004). A administração de mepolizumab não altera a distribuição e ativação dos linfócitos em pacientes asmáticos (Büttner *et al.*, 2003).

Estas observações, em conjunto, sugerem que a eficácia do mepolizumab é parcial, e deixam em aberto a possibilidade de que o contingente residual de eosinófilos observado pós-tratamento seja ainda relevante para a persistência da doença.

1.2 Asma e estresse

O "estresse" é definido como um estado de homeostase ameaçada, após a exposição a fatores adversos extrínsecos ou intrínsecos (Tsigos & Chrousos, 2002, Kyrou & Tsigos, 2009). As situações de estresse representam uma demanda aumentada em relação à capacidade de adaptação do organismo e, portanto, são a consequência inevitável da existência de condições sujeitas à mudanças, tanto internas como externas ao organismo. O estresse faz parte da vida normal, e mecanismos fisiológicos para atender a essa demanda homeostática aumentada são parte integrante do organismo. Nos vertebrados, e, especialmente, nos mamíferos, o eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA) é central para a resposta integrativa ao estresse.

Cada estresse ao qual se expõe o organismo, físico ou psicológico, evoca uma resposta fisiológica ao estresse, que, em conjunto, contribui para coordenar e otimizar um grande número de mecanismos e processos distintos, os quais restauram a homeostase e facilitam a adaptação. Os efeitos deletérios da resposta ao estresse são altamente dependentes da duração e da intensidade da mesma. Um

estresse agudo, em condições relativamente controladas, pode promover uma resposta adaptativa predominantemente benéfica. Em contraste, a falta de controle do organismo sobre as condições ambientais, e incerteza persistente sobre a evolução de situações estressantes pode levar a um estado crônico de ansiedade, associado a níveis cronicamente elevados de hormônios circulantes corticosteróides ("hormônios de estresse"), o qual acredita-se aumentar a vulnerabilidade a uma variedade de doenças. A exposição crônica a níveis elevados de corticosteróides tem sido associada a várias condições fisiopatológicas, como a disfunção do sistema imunológico, neurodegeneração no envelhecimento e nos transtornos afetivos humanos (Müller *et al.*, 2002).

O estresse pode afetar a resposta imune de forma importante. Fibras simpáticas asseguram a comunicação nervosa entre o cérebro e os órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e secundários (baço e dos gânglios linfáticos). Estas fibras podem liberar uma grande variedade de substâncias que influenciam as respostas imunes pela ligação aos receptores dos leucócitos do sangue. Embora todos os linfócitos tenham receptores adrenérgicos, as diferenças na expressão e na sensibilidade dos receptores adrenérgicos em linfócitos podem afetar a capacidade de resposta ao estresse entre os subtipos celulares (Segerstrom & Miller, 2004).

Além da exposição à várias formas de estresse agudo induzir a ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), induz também a do eixo simpático-adrenalmedular (SAM), que levam ao aumento da secreção dos hormônios cortisol (pelo HPA) e neurotransmissores, epinefrina e norepinefrina (pelo SAM). Estas alterações hormonais têm um impacto provável sobre a inflamação das vias aéreas e as alterações funcionais na asma: altos níveis de cortisol diminuem a inflamação nas vias aéreas e na periferia (Chen e Miller, 2007).

O estresse prolongado aumenta a atividade Th2 e diminui a Th1, e este efeito pode ser parcialmente atribuído à produção cronicamente elevada de glicocorticóides (Rook, 1999).

Após a exposição prolongada a níveis elevados de cortisol, leucócitos montam uma resposta compensatória, isto é, para compensar a alta exposição ao

cortisol ocorre inibição da expressão e da função dos receptores que ligam o cortisol. Esta resposta diminui a sensibilidade das células imunes à sinalização por glicocorticóides, tornando-os mais resistentes às propriedades antiinflamatórias destas moléculas (Chen & Miller, 2007).

Estresse e fatores emocionais podem contribuir para o agravamento da asma (Strek, 2006). Um estudo recente com estudantes universitários com asma leve demonstrou aumento da inflamação eosinofílica das vias aéreas em resposta ao desafio antigênico durante a semana dos exames finais (Liu *et al.*, 2002). Em pessoas asmáticas, a exposição aguda a um estresse psicológico, na forma de um filme ou uma conversa estressante, leva a mudanças nos parâmetros da função respiratória. Além disso, eventos de vida negativos causando tanto estresse agudo como crônico aumentam o risco de ataques de asma em crianças (Veres *et al.*, 2009).

1.3 O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) no estresse e na Inflamação

O hipotálamo recebe e monitora informações sobre o meio ambiente e coordena as respostas através de mecanismos neuronais e endócrinos. A informação visual, olfativa, auditiva, tátil, térmica e nociceptiva alerta o hipotálamo para situações de emergência ou de riscos ambientais. As porções do cérebro envolvidas no processamento das emoções também transmitem informações para o hipotálamo. A partir do centro integrador hipotalâmico, o cérebro controla a secreção de hormônios da glândula pituitária e, indiretamente, de outros órgãos endócrinos, como as glândulas supra-renais (Padgett & Glaser, 2003).

Mais especificamente, o eixo HPA é ativado a partir de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo que fazem conexões axônicas com a eminência mediana do hipotálamo, e secretam hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH liberado é transportado pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário até a hipófise anterior (ou pituitária), onde se liga a receptores específicos de membrana nos corticotróficos (um dos tipos celulares da hipófise), estimulando a produção e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, também chamado corticotrofina).

O ACTH circula na corrente sanguínea, induzindo nas glândulas supra-renais (adrenais) a síntese e liberação dos hormônios glicocorticóides, a partir da zona fasciculada (Müller *et al.*, 2002; Tsigos & Chrousos, 2002, Padgett & Glaser, 2003; Chen & Miller, 2007; Brunton *et al.*, 2007).

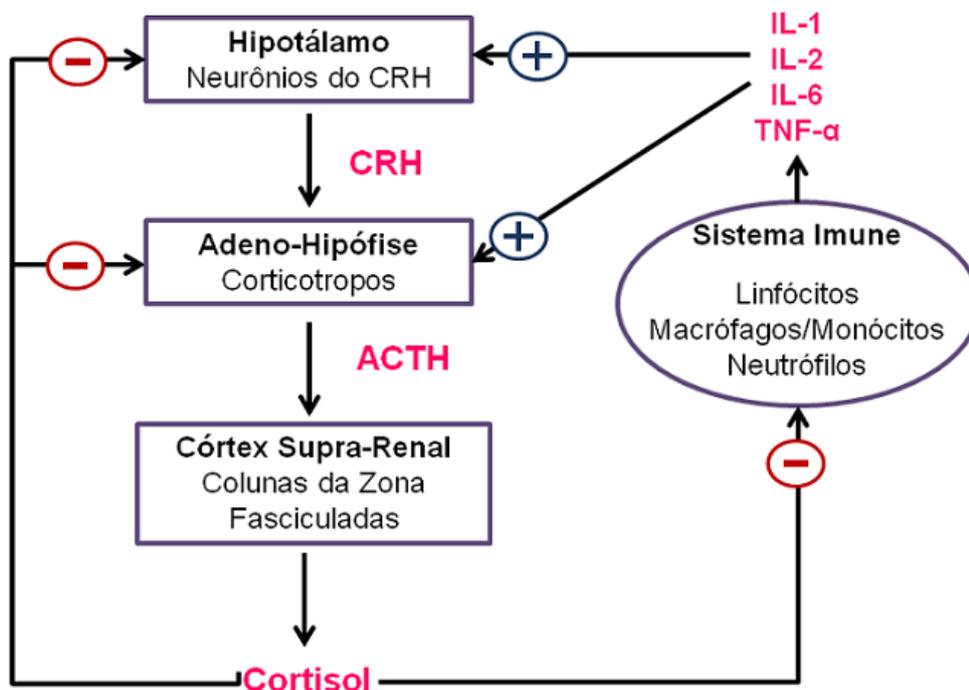


Figura 1.1. Eixo Hipotálamo-hipofisário-adrenal e sua comunicação bidirecional com o sistema imune. + indica um regulador positivo, e -, um regulador negativo (adaptado de Brunton *et al.*, 2007).

Na ausência de estresse, CRH é secretado seguindo um ciclo circadiano, de modo pulsátil, com uma frequência de cerca de dois a três episódios de secreção por hora. Em condições de repouso, a amplitude dos pulsos de liberação de CRH aumenta, com um pico nas primeiras horas da manhã, levando à secreção seqüencial de ACTH e cortisol na circulação geral (Tsigos & Chrousos, 2002).

O hormônio CRH é também produzido por células imunes no baço, timo, linfonodos e nos linfócitos T humanos do sangue periférico (Aird *et al.*, 1993; Brouxhon *et al.*, 1998., Ekman *et al.*, 1993). Os receptores de CHR foram detectados em neutrófilos, eosinófilos ou seus precursores imaturos e também em monócitos (Baker *et al.*, 2003; Wilbert-Lampen *et al.*, 2006).

O eixo HPA também pode ser ativado pelo hormônio concentrador de melanina (MCH), um neuropeptídeo hipotalâmico produzido pelos neurônios hipotalâmicos laterais que se projetam para o núcleo paraventricular (Bittencourt *et al.*, 1992). Quando os neurônios são estimulados, podem ativar o sistema HPA e desencadear a liberação de ACTH e corticosterona (Kennedy *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Orihara e colaboradores mostraram um aumento da expressão de mRNA do pró-MCH (PMCH) em pulmões de camundongos BALB/c imunizados e provocados com ovalbumina, que não foi observada em animais STAT6 KO (Orihara *et al.*, 2009). Este aumento expressão de mRNA do PMCH em animais alérgicos pode ativar o eixo HPA.

No homem o principal glicocorticóide é o cortisol. Em camundongos, que foram utilizados neste estudo, o equivalente é a corticosterona (Brunton *et al.*, 2007). Em um humano adulto normal, na ausência de estresse, são secretados diariamente 10-20mg de cortisol. No plasma, o cortisol está ligado às proteínas circulantes, e a globulina dos corticosteróides (CBG), uma $\alpha 2$ globulina sintetizada pelo fígado, captura cerca de 90% do hormônio circulante em circunstâncias normais. O restante é livre (cerca de 5-10%) ou frouxamente ligado à albumina (cerca de 5%) e está disponível para exercer o seu efeito sobre as células-alvo, permanecendo em equilíbrio dinâmico com a fração ligada à CBG. Nos camundongos, a corticosterona está ligada de forma mais fraca à proteína e, portanto, é metabolizada mais rapidamente (Brunton *et al.*, 2007).

Durante um estresse agudo, a amplitude e a frequência dos pulsos de liberação de CRH no sistema portal hipofisário aumentam significativamente, resultando num aumento de episódios de secreção de ACTH e cortisol (Tsigos & Chrousos, 2002).

Os hormônios glicocorticóides são moléculas lipofílicas, que facilmente passam através da membrana plasmática de todas as células do corpo (Müller *et al.*, 2002, Padgett & Glaser, 2003). Os glicocorticóides ligam-se a receptores intracelulares de adrenocorticóides, da superfamília gênica de receptores nucleares, que são o ponto de partida para uma série de vias críticas de sinalização. Existem

dois receptores suscetíveis de ativação pelos hormônios glicocorticóides, o GR e o receptor mineralocorticóide (MR) (Müller *et al.*, 2002, Padgett Glaser, 2003).

Além da corticosterona e da dexametasona, glicocorticóide sintético, os glicocorticóides 5 α -reduzidos, produzidos por uma das várias formas de catabolismo dos glicocorticóides, podem ser potentes agonistas do GR e atingir concentrações significativas *in vivo*, sendo capazes de competir com a dexametasona pelos sítios de ligação nos hepatócitos com afinidade semelhante à da corticosterona. (Wilckens, 1995; McInnes *et al.*, 2004).

Os GRs modulam a expressão das citocinas, de quimoatratadores e de moléculas de adesão, regulando o tráfego de células imunológicas, assim como a sua proliferação, diferenciação e função efetora (Padgett e Glaser, 2003; Chen & Miller, 2007). Os MR regulam aspectos vitais do metabolismo, especialmente a composição do fluido extracelular, através de seus efeitos sobre o transporte de íons através de membranas.

Os GR, após a sua translocação para o núcleo, interagem com os promotores de genes-alvo e regulam a sua atividade transcripcional. Na ausência do ligante hormonal, os GR são primariamente citoplasmáticos, retidos em complexos oligoméricos com proteínas de choque térmico (HSP). O hormônio livre do plasma e do líquido intersticial entra na célula e se liga ao receptor, induzindo mudanças conformacionais que permitem a sua dissociação das proteínas de choque térmico. O complexo receptor-ligante, então, é translocado para o núcleo, onde interage com o DNA e as proteínas nucleares, ligando-se na forma de homodímero, aos elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE) nos promotores de genes responsivos. O GRE é composto de duas seqüências palindrômicas que se ligam ao receptor dimerizado do hormônio (Tsigos & Chrousos, 2002, Brunton *et al.*, 2007).

Além de se ligarem aos GREs, os complexos receptor-ligante também formam complexos multimoleculares com outros fatores de transcrição, tais como AP1 e NF- κ B, que agem sobre promotores desprovidos de GRE, contribuindo para a regulação da transcrição dos genes correspondentes. Estes fatores de transcrição têm ações amplas sobre a regulação de fatores de crescimento, citocinas pró-

inflamatórias, etc, e medeiam efeitos antiproliferativos, antiinflamatórios e imunossupressivos dos glicocorticóides (Brunton *et al.*, 2007).

A corticosterona tem uma maior afinidade (dez vezes maior) para os MR do que para os GR, presentes nos neurônios do hipocampo. Em baixas concentrações, os hormônios glicocorticóides circulantes ligam-se preferencialmente à MR, mas em presença de mais altas concentrações de glicocorticóide (durante o pico circadiano e durante o estresse), o GR é também significativamente ocupado. Em células do sistema imunológico, como os macrófagos e linfócitos T, o receptor primário para hormônios glicocorticóides é o GR e, mais especificamente, a influência dos hormônios glicocorticóides sobre a função imunológica é mediada pelo GR (Kloet *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2002, Padgett & Glaser, 2003).

Citocinas e outros mediadores solúveis da inflamação são potentes ativadores da resposta central ao estresse, que constituem a parte aferente de um ciclo de *feedback* através do qual o sistema imune/inflamatório e o sistema nervoso central (SNC) se comunicam (Tsigos & Chrousos, 2002).

Três citocinas inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF- α), a IL-1 e a IL-6 podem causar estimulação do eixo HPA sozinhas, ou em sinergia com as outras (Tsigos & Chrousos, 2002).

A ativação do eixo HPA tem profundos efeitos inibitórios sobre a resposta inflamatória/imune porque atinge um grande número de mecanismos efetores distintos (Tsigos & Chrousos, 2002). Os glicocorticóides reduzem drasticamente as manifestações da inflamação, devido aos profundos efeitos sobre os números, distribuição e função de diferentes populações circulantes de leucócitos, e a seus efeitos supressivos sobre as citocinas inflamatórias e quimiocinas e outros mediadores da inflamação.

Contudo, nem todos os efeitos imunomodulatórios dos glicocorticóides acarretam redução das defesas do hospedeiro, ou supressão da atividade inflamatória. Após uma única dose de um glicocorticóides de curta duração, a concentração de neutrófilos na circulação aumenta, enquanto os linfócitos (células T e B), monócitos, eosinófilos e basófilos diminuem. A redução do número de

linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação é devido principalmente o resultado do seu movimento a partir do leito vascular para o tecido linfóide (Brunton *et al.*, 2007). O aumento dos neutrófilos é atribuído classicamente ao aumento do influxo de células da medula óssea para o sangue e uma diminuição da emigração pelos vasos sanguíneos, levando a uma redução no número de células no local da inflamação. Contudo, esta hipótese não é compatível com a observação de que um aumento crônico nos níveis de glicocorticóides favorece o desenvolvimento de neutrofilia na medula óssea e no sangue periférico, seguido pelo surgimento de úlceras digestivas ricas em neutrófilos (Maruyama *et al.*, 1999).

Os glicocorticóides também inibem as funções de macrófagos teciduais e outras células apresentadoras de antígenos. O efeito sobre macrófagos é particularmente acentuado e limita sua capacidade de fagocitar e matar microorganismos, assim como a produção do TNF- α , da IL-1, das metaloproteinases, e do ativador de plasminogênio. Os macrófagos e linfócitos expostos a glicocorticóides produzem menos IL-12 e interferon- γ (IFN- γ), indutores importantes para a atividade das células Th1 e imunidade celular (Brunton *et al.*, 2007). Uma das conseqüências importantes deste efeito é produzir um viés Th2 na resposta imune, que favorece a produção de IgE (revisito em Gaspar-Elsas *et al.*, 2000 b).

1.4 Hematopoiese e Eosinofilopoiese

Hematopoiese é o processo de formação das células sanguíneas durante as fases embrionárias e adultas de um organismo. Hematopoiese é também visto como o processo de desenvolvimento, auto-renovação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (HSCs), um tipo de célula-tronco adulta que é a fonte de todas as linhagens de células do sangue. Nos mamíferos, feto e adulto, HSCs residem predominantemente no fígado fetal e da medula óssea, respectivamente (Huang *et al.*, 2007; Purton & Scadden, 2007).

As HSCs se diferenciam continuamente em várias linhagens diferentes, que formam as células do sangue e simultaneamente, renovam-se para prevenir a depleção do *pool* de células tronco na medula óssea (Huang *et al.*, 2007).

A maior parte da atividade hematopoiética em adultos ocorre na medula óssea, sob a influência de células residentes do estroma e de outras células acessórias e/ou seus produtos. Esta rede complexa do microambiente hematopoiético indutivo é crucial para a promoção de sinais necessários para a manutenção das populações de células progenitoras em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem (Gauvreau *et al.*, 2009).

As HSCs são capazes de gerar cada linhagem encontrada no sistema hematopoiético, incluindo os glóbulos vermelhos, plaquetas e uma variedade de células linfóides e mielóides. Algumas das células linfóides mais importantes incluem as células natural killer, células T e células B, enquanto células mielóides incluem os granulócitos, monócitos, macrófagos, células da microglia e células dendríticas. Cada um destes tipos celulares pode ser gerado a partir de uma única HSC, e cada HSC tem uma enorme capacidade de gerar um grande número dessas células por muitos anos, e talvez até mesmo por décadas (Smith, 2003).

No camundongo, as HSCs expressam baixos níveis da proteína de superfície Thy-1 e níveis relativamente elevados do marcador de superfície Sca-1 (Smith, 2003).

Células progenitoras humanas (aquelas capazes de formar colônias em meio semi-sólido, mas não de se auto-renovarem) são identificadas fenotipicamente por elevados níveis da expressão de CD34 na membrana. Sua expressão ocorre em níveis mais altos nas células progenitoras mais precoces, e é progressivamente perdida com a maturação das células, desaparecendo em células terminalmente diferenciadas (Smith, 2003, Gauvreau *et al.*, 2009). As células progenitoras são sensíveis à influência de fatores de crescimento e sofrem processos de diferenciação celular na medula óssea (Gauvreau *et al.*, 2009).

O ligante de c-kit e o ligante de FLT3 parecem ter atividades exclusivas no progenitor primitivo/células-tronco (Lyman & Jacobsen, 1998). O fator da célula tronco (SCF) e a IL-6 atuam muito cedo na hierarquia da linhagem hematopoiética, enquanto outros fatores de crescimento são em grande parte responsáveis pela

diferenciação terminal das células, como a IL-5 em eosinófilos, bem como basófilos (Gauvreau *et al.*, 2009).

HSCs podem gerar múltiplas linhagens hematopoiéticas através de uma sucessão de progenitores intermediários. Estes incluem progenitores linfóides comuns (CLPs), que podem gerar células T, B e células NK, e progenitores mielóides comuns (CMPs), que podem gerar glóbulos vermelhos, plaquetas, granulócitos e os monócitos (Smith, 2003).

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) foi definido por sua capacidade de gerar colônias contendo granulócitos e macrófagos a partir de progenitores pluripotentes, como resultado da proliferação e diferenciação (Hamilton, 2002).

A IL-5 é o fator de diferenciação e produção de eosinófilos, porém outros fatores hematopoiéticos também são capazes de estimular a geração de eosinófilos, como o GM-CSF e a IL-3 (Iwasaki *et al.*, 2005, Metcalf, 2008). Estes fatores compartilham um mecanismo de sinalização dependente de uma cadeia β comum (βc), que se associa às cadeias α dos respectivos receptores, todas expressas em eosinófilos (Nishinakamura *et al.*, 1996).

Os progenitores comprometidos para a linhagem eosinofílica são atualmente definidos como células CD34+ que co-expressam o receptor IL-5 alfa (IL-5R α) em sua superfície. Além disso, um crescente número de células CD34+/IL-5R α + e células CD34+ que expressam o CCR3 receptor de eotaxina (células CD34+/CCR3+), têm se mostrado presentes na medula óssea em pacientes asmáticos alérgicos em comparação com os controles (Radinger & Lötvall, 2009).

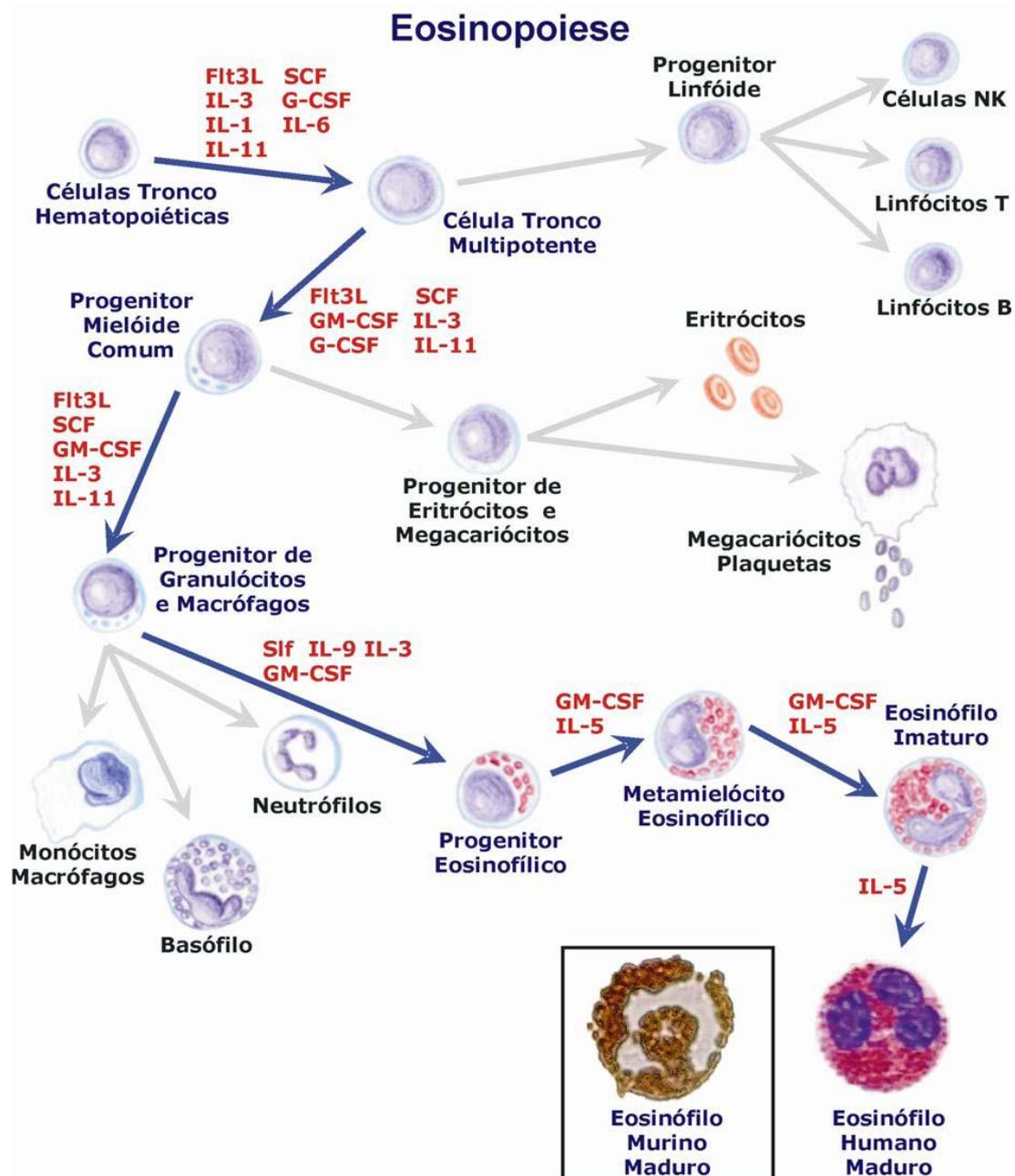


Figura 1.2 – Eosinopoiese. Esquema simplificado da via de formação de eosinófilos a partir de células tronco hematopoiéticas. As setas azuis indicam as etapas de formação de eosinófilos; as setas cinzas, a formação de outras células hematopoiéticas. As citocinas envolvidas com cada etapa da maturação eosinofílica estão indicadas em vermelho. Em destaque no quadro, um eosinófilo murino revelado por reação histoquímica da peroxidase do eosinófilo resistente ao cianeto (Queto T, 2007).

1.5 Eosinopoiese e glicocorticóides

Os glicocorticóides, em doses terapêuticas, suprimem a eosinofilia no sangue periférico e tecidos, inibindo a produção de citocinas como IL-5, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-3, e induzindo a apoptose em eosinófilos maduros (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a). Essas mesmas citocinas aumentam a sobrevivência dos eosinófilos maduros que são recrutados para os tecidos e promovem a sua ativação de diversas maneiras. Os glicocorticóides também inibem muitos dos efeitos dessas citocinas sobre eosinófilos maduros, atenuando os efeitos da IL-5, o GM-CSF e IL-3 de maneira independente do estágio de maturação da célula-alvo (Gaspar Elsas *et al.*, 2000b).

Contudo, as relações entre os glicocorticóides e as reações alérgicas, em geral, e especialmente a inflamação eosinofílica, são mais complexas do que sugere essa avaliação inicial. Glicocorticóides têm uma série de efeitos estimulatórios sobre a produção de anticorpos IgE, que podem favorecer a progressão para a doença alérgica (Oettgen & Geha, 1999; Barnes, 2001).

A administração de prednisona a pacientes com asma provocam aumento significativo nos níveis séricos de IgE, mas sem ter efeito clinicamente deletério, refletindo os efeitos imunomoduladores de corticosteróides em linfócitos T (Zieg *et al.*, 1994). Vários estudos mostram que os corticosteróides têm efeitos significativos sobre as células apresentadoras de antígeno, inibindo a sua produção de IL-12, uma citocina que é extremamente potente como indutora de IFN- γ e supressora de IL-4 pelas células T. Estes resultados sugerem fortemente que, embora os corticosteróides possam ser benéficos para o tratamento de asma ou doença alérgica pela inibição de citocinas, eles também têm efeitos imunomodulatórios que podem contribuir para a patogênese da doença alérgica a longo prazo. Um efeito deletério dos corticosteróides passaria pela redução na síntese de IL-12 nos monócitos e macrófagos, aumentando assim a produção de citocinas Th2 (que aumentam a doença alérgica, pela produção aumentada de IgE e eosinófilos) e limitando a produção de citocinas Th1 (que atenuam a doença alérgica) em células T que posteriormente se infiltram nos tecidos (Blatta *et al.*, 1997; DeKruyff *et al.*, 1998).

No referente aos eosinófilos, dados de várias décadas, publicados por diferentes grupos (revistos em Gaspar-Elsas *et al.*, 2000b) sugerem que, em certas condições, os glicocorticóides são estimulatórios, e não inibitórios, para a eosinofiloiose. Estudos do nosso grupo mostraram, em camundongo, que a dexametasona aumenta a frequência e o tamanho das colônias de eosinófilos formados na presença de GM-CSF em culturas de medula óssea. Em contrapartida, a dexametasona sozinha (ausência de GM-CSF) não teve efeito nas mesmas concentrações. Dexametasona potencializou as respostas dos precursores de eosinófilos à IL-5 em um ensaio de diferenciação terminal. O glicocorticóide natural, corticosterona, teve um efeito semelhante em 10^{-8} M. Dexametasona (1-5 mg/kg), administrada *in vivo* 24 h antes da coleta da medula óssea, aumentou a formação subsequente de colônias, em resposta a GM-CSF, e a diferenciação de eosinófilos em resposta à IL-5. Estes efeitos foram bloqueados *in vivo* e *in vitro* pelo mifepristone (RU486), um antiprogestágeno amplamente utilizado, que tem potente atividade de antagonista do receptor de glicocorticóide (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a).

É importante lembrar que vários fatores determinam a eficácia dos glicocorticóides *in vivo*, incluindo: (1) a sua ligação à CBG e outras proteínas, (2) suas afinidades em relação a receptores do tipo I (MR) ou tipo II (GR), e (3) sua suscetibilidade à inativação pela 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase. A dexametasona, ao contrário dos glicocorticóides endógenos induzidos pelo estresse, mostra pouca ligação a CBG, e tem maior afinidade pelo receptor do tipo II do que pelo do tipo I (Wilckens, 1995). Assim, os dados obtidos com a dexametasona não são necessariamente aplicáveis à corticosterona. A observação de que ambos (dexametasona e corticosterona) – potencializam a eosinopoiose *in vitro* (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a) sugere a possibilidade de que glicocorticóides induzidos por uma reação de estresse também potencializem a eosinofiloiose *in vivo*.

Recentemente, a hipótese de que os glicocorticóides regulem fisiologicamente a eosinopoiose foi examinada em estudos do nosso laboratório, que mostraram, em animais submetidos a um estresse cirúrgico agudo, um aumento do número de eosinófilos na medula óssea, acompanhado de uma potencialização da capacidade de resposta da medula óssea à IL-5 *ex vivo*, ou seja, cultivada após a

exposição ao estresse *in vivo*. O envolvimento de glicocorticóides endógenos neste mecanismo foi demonstrado através de três diferentes abordagens experimentais: bloqueio farmacológico dos receptores de glicocorticóides (RU 486), a inibição farmacológica da síntese de glicocorticóide pela adrenal (metirapone) e a remoção cirúrgica das glândulas supra-renais (Elsas *et al.*, 2004). Nestas condições, os efeitos do estresse cirúrgico foram claramente dependentes da liberação sistêmica de hormônios glicocorticóides pela glândula adrenal.

A partir destes estudos, grande parte da pesquisa conduzida pelo nosso grupo tem se ocupado dos mecanismos celulares desses efeitos, e da sua possível relevância para a doença alérgica. No primeiro aspecto, foi possível demonstrar, mais recentemente, que o mecanismo celular de ação dos glicocorticóides sobre a eosinopoiese em cultura de medula óssea está associado com a capacidade destes agentes inibirem a expressão da isoforma indutível da óxido nítrico sintase (iNOS), e, portanto, suprimirem a produção de óxido nítrico (NO) através desta via. Assim, uma parte importante dos efeitos da dexametasona, um glicocorticóide sintético, pode ser retrazada ao controle do processo de apoptose, visto que o NO induz apoptose nestas culturas, e que os efeitos da prostaglandina E2 (PGE₂) sobre a eosinopoiese *in vitro* são mediados pelo NO, explicando a forte ação pró-apoptótica da PGE₂ (Jones *et al.*, 2004).

Ainda no contexto da busca de mecanismos celulares, um estudo recente do nosso grupo evidenciou um papel para as integrinas $\alpha 4$ no desenvolvimento de eosinófilos. Essas moléculas são fortemente expressas em eosinófilos que se desenvolveram na presença de IL-5 e dexametasona. Os eosinófilos também expressaram o ligante da $\alpha 4\beta 1$, VCAM-1. Em culturas líquidas de medula óssea, estabelecidas na presença de IL-5 e dexametasona, são abundantes os eosinófilos agregados, particularmente formas imaturas. A PGE₂ neutralizou os efeitos positivos da dexametasona na expressão de integrina $\alpha 4$, de forma a induzir a dissociação dos eosinófilos e a maturação citológica na cultura. O aumento da expressão da integrina $\alpha 4$ não só manteve os eosinófilos em desenvolvimento agregados, como atrasou o seu amadurecimento. Por conseguinte, a dexametasona ou outros tratamentos que aumentam a expressão das integrinas $\alpha 4$ durante a maturação de

eosinófilos, se operantes *in vivo*, podem favorecer a retenção de eosinófilos na medula óssea, principalmente em um estado imaturo (Gaspar-Elsas *et al.*, 2009).

Se, por um lado, há evidências cada vez mais fortes que indicam que os glicocorticóides podem regular a eosinopoiese ao aumentar a capacidade de resposta dos progenitores e precursores da linhagem eosinofílica à IL-5, e também proteger as células imaturas desta linhagem dos efeitos indutores de apoptose de vários agentes, como a PGE2 e o NO, existe igualmente a possibilidade de que os glicocorticóides regulem este processo também através da sua interação com outros estímulos, como a eotaxina e a IL-13.

Quimiocinas, especialmente da subfamília da eotaxina, e a IL-13, uma importante citocina Th2, têm emergido como potenciais moléculas efetoras envolvidas na patogênese da inflamação alérgica das vias aéreas. É, portanto, de interesse para o avanço terapêutico nesta área o desenvolvimento de anti-quimiocinas, de anti-receptores de quimiocina e de estratégias de antagonismo da IL-13 como ferramentas terapêuticas. Vários trabalhos mostraram que há uma interação sinérgica entre quimiocinas e IL-13, predizendo que a terapia eficaz poderia ser realizada pelo bloqueio individual ou simultâneo da cascata de sinalização, incluindo IL-13, eotaxina e CCR3 (Zimmermann *et al.*, 2003).

A eotaxina, uma quimiocina considerada de grande seletividade para a linhagem eosinofílica, que expressa o receptor específico CCR3, o qual está ausente em neutrófilos, monócitos e outras populações leucocitárias, tem efeitos regulatórios importantes sobre a diferenciação de eosinófilos induzida por IL-5 em cultura de medula óssea murina (Queto *et al.*, 2010b).

Os estudos sobre mecanismos celulares, contudo, não esclarecem se, *in vivo*, no contexto da sensibilização alérgica, os glicocorticóides têm algum papel na regulação da eosinofiloipoiese. Esta possibilidade é, no entanto, sugerida pelas seguintes observações: a) o efeito estimulatório do estresse agudo sobre a eosinofiloipoiese *in vivo* (Elsas *et al.*, 2004); b) o efeito estimulatório da dexametasona *in vivo* sobre a eosinofiloipoiese *ex vivo* (Gaspar Elsas *et al.*, 2000a); c) a indução do eixo HPA, com produção de glicocorticóides, por citocinas

inflamatórias, como o TNF- α , que são sabidamente produzidas nas reações inflamatórias agudas (Tsigos & Chrousos, 2002).

Em conjunto, estas observações sugerem que, em resposta à provocação alérgica das vias aéreas, a liberação de citocinas inflamatórias poderia levar a um aumento nos níveis circulantes de glicocorticóides, os quais, por sua vez, teriam um impacto significativo sobre a eosinofiloiose na medula óssea. Em outras palavras, a provocação alérgica teria em comum com o estresse cirúrgico a liberação sistêmica de glicocorticóides, e induziria na medula óssea um aumento na produção de eosinófilos.

Em estudos preliminares do nosso grupo (Xavier-Elsas e Cardoso-de-Mendonça, dados não publicados), os efeitos da eotaxina foram dependentes da cepa de camundongos estudada, assim como do estado imunológico do animal. Em especial, animais sensibilizados à ovalbumina apresentaram uma perda da sensibilidade aos efeitos estimuladores da eotaxina. Após a provocação alérgica, observou-se, em certas condições, até o surgimento de uma resposta supressora a esta quimiocina, indicando que ela está sujeita a uma importante imunorregulação.

Assim, entre os processos afetados sistemicamente pela provocação alérgica incluem-se a resposta à IL-5 (Gaspar Elsas *et al.*, 1997), e a resposta à eotaxina. Caberia, portanto, avaliar se os glicocorticóides contribuem, de alguma forma, para este segundo efeito da provocação.

No presente estudo, procuramos estender e aprofundar essas observações anteriores do nosso laboratório, avaliando o papel desempenhado pelos hormônios de estresse secretados pela adrenal na regulação da eosinopoiose em animais alérgicos. Nossa estratégia experimental foi baseada no bloqueio da produção e da atuação dos glicocorticóides, com o uso de duas ferramentas seletivas, utilizadas com sucesso em estudos anteriores (Xavier-Elsas *et al.*, 2004):

a) *Metirapone* é um inibidor seletivo da síntese de esteróides. Ele inibe a 11-hidroxilase, interferindo com a síntese do cortisol e corticosterona (Brunton *et al.*, 2007).

b) *Mifepristone (RU 486)* é um antagonista do receptor de glicocorticóides, ao qual se liga fortemente, fazendo com que (1) seja estabilizado o complexo receptor de glicocorticóides-HSP, com inibição da dissociação do receptor de glicocorticóide das proteínas chaperones HSP, na presença de RU486; (2) seja modificada a interação do receptor de glucocorticóide com corretores, favorecendo a formação de um complexo transcripcional inativo no núcleo da célula. O resultado destas ações distintas é a inibição da sinalização pelo receptor de glicocorticóides (Brunton *et al.*, 2007).

1.6 Hipótese

Hormônios glicocorticóides liberados em resposta ao estresse, devido a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal por citocinas inflamatórias produzidas no curso da provocação alérgica em animais sensibilizados, participam da modulação da eosinopoiese medular em um modelo murino de asma alérgica.

1.7. Desenho Experimental

Para abordar estas questões, no presente estudo, camundongos de várias cepas (BALB/c, C57BL/6, tanto de tipo selvagem como deficientes para o receptor de tipo I para TNF) foram sensibilizados com ovalbumina. Antes da provocação alérgica por via intranasal, os animais foram submetidos ao pré- tratamento com metirapone, que inibe a síntese dos glicocorticóides, ou com mifepristone (RU486), que bloqueia competitivamente o receptor de glicocorticóides. Os seguintes aspectos foram avaliados: a) a presença de eosinófilos na medula óssea recém-coletada (indicador de eosinopoiese *in vivo*), e após cultura líquida na presença de IL-5 (indicador de efeitos *ex vivo*); b) a presença de eosinófilos no lavado bronco-alveolar e no sangue periférico; c) os níveis circulantes de corticosterona; d) a presença de infiltrados inflamatórios e células produtoras de muco no pulmão; e) a resistência das vias aéreas; f) o padrão de resposta hematológica em animais deficientes na sinalização por receptor de TNF do tipo I; g) o padrão de resposta à eotaxina *ex vivo*.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

○ Avaliar o papel da ativação do eixo HPA, resultando numa síntese aumentada de glicocorticóides adrenais, na resposta dos pulmões e da medula óssea à provocação alérgica em camundongos sensibilizados.

2.2. Objetivos Específicos:

1. Avaliar, em camundongos BALB/c, imunizados com ovalbumina e provocados com salina ou ovalbumina, a possível contribuição dos glicocorticóides endógenos para:

- a produção de eosinófilos na medula óssea *in vivo*;
- a modulação da resposta das células da medula óssea à IL-5;
- a acumulação de eosinófilos no lavado broncoalveolar e no parênquima;
- a alteração da função pulmonar induzida pela provocação;
- a imunorregulação da resposta das células da medula óssea à eotaxina.

2. Correlacionar os efeitos de bloqueadores farmacológicos da produção e atuação dos glicocorticóides com os níveis circulantes de corticosterona em camundongos BALB/c, imunizados com ovalbumina e provocados com salina ou ovalbumina.

3. Analisar a contribuição do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) para a regulação da eosinofiloiose pela provocação alérgica.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes Utilizados

3.1.1 Meios de cultura e suplementos

Fabricante HyClone (Logan, Utah, USA): meio RPMI 1640 (Cat. N0: SH30011.01), e Soro Fetal Bovino (US Standard Fetal Bovine Serum, FCS Cat. N0: SH30088.03). Fabricante Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA): L-glutamina Cat. G8540. Fabricante GIBCO Invitrogen (California; USA): Pen Strep (Cat: 15140-122) – diluição 1:10.

3.1.2 Citocinas, Quimiocinas, Antígenos, Adjuvantes e Drogas

Fabricante Pharmingen (San Diego, CA, USA): Interleucina-5 murina (rmIL-5 - Ref. No: 554581). Fabricante Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA): Mifepristone (RU486, Ref.No:M-8046), Metirapone (2-Metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona, Cat. 05205BA). Fabricante R&D Systems®: Eotaxina murina (rmEotaxina - Ref. No: 413-ML). Fabricante Carlo Erba Reagent: Hidróxido de Alumínio Sulfato [$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]. Fabricante ICN Biomedicals (Solon, OH, USA): Ovalbumina Grade V.

As soluções estoques da citocina IL-5 e da eotaxina foram preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (RPMI 10% FCS), sendo estas aliqüotadas e armazenadas à temperatura de -20°C até o momento do uso em cultura. As concentrações de citocinas usadas no presente trabalho foram previamente padronizadas em trabalhos anteriores do laboratório (Gaspar Elsas *et al.*, 1997, Queto, *et al.*, 2010b).

3.2 Cepas de Animais Utilizadas

Neste trabalho foram utilizados camundongos isogênicos, de ambos os sexos, das cepas BALB/c, B6.129 deficientes no receptor de TNF α (B6.129-Tnfrs1a) (Huber & Sartini, 2005) e seus controles de tipo selvagem, do background genético C57Bl/6, com idade entre 4 e 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da

FIOCRUZ (CECAL), Rio de Janeiro, conforme procedimentos detalhados no projeto intitulado “Eosinofilia na asma experimental”, aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da FIOCRUZ sob o protocolo L010/04 e L002/09.

3.3. Protocolo de Sensibilização dos Animais

Os animais receberam duas injeções subcutâneas de ovalbumina (100 µg de ovalbumina misturadas a 1,6 mg de hidróxido de alumínio em um volume total de 0,4 mL de soro fisiológico), sendo a primeira injeção aplicada no dia 0 (sensibilização) e, a segunda, aplicada 7 dias depois (reforço).

3.4. Protocolo de Provocação dos Animais

Utilizamos três protocolos de provocação alérgica, baseados na nossa experiência prévia com as cepas isogênicas utilizadas. O desafio foi realizado com o animal imobilizado manualmente utilizando pipeta automática.

- Protocolo 1: 1 provocação por via intranasal (10 µg de OVA/25 µL de soro fisiológico), no dia 14; utilizado em camundongos BALB/c.
- Protocolo 2: 3 provocações por via intranasal (25 µg de OVA/25 µL de soro fisiológico) nos dias 12, 13 e 14. utilizado em camundongos BALB/c.
- Protocolo 3: 1 provocação via intranasal (25 µg de OVA/25 µL de soro fisiológico), no dia 14; utilizado em camundongos B6 e B6.129-Tnfrs1a.

24 horas após a provocação, os camundongos foram submetidos à análise de função pulmonar e submetidos à eutanásia, para realização de lavado broncoalveolar, obtenção de medula óssea, sangue e plasma. Como controles negativos, dependendo do objetivo do experimento, foram utilizados animais imunizados, provocados com solução salina, ou animais virgens (“naives”).

3.5 Tratamento com mifepristone (RU 486)

Utilizamos o mifepristone (RU486), um antagonista potente do receptor de glicocorticóide (Brunton *et al.*, 2007), para avaliar o papel dos glicocorticóides adrenais. A droga foi administrada por via oral, 2 horas antes da provocação, na dose de 20 mg/Kg, em veículo (metilcelulose 0,1% em H₂O destilada), utilizando uma agulha de gavagem para camundongos. Os animais controle receberam o mesmo volume de veículo.

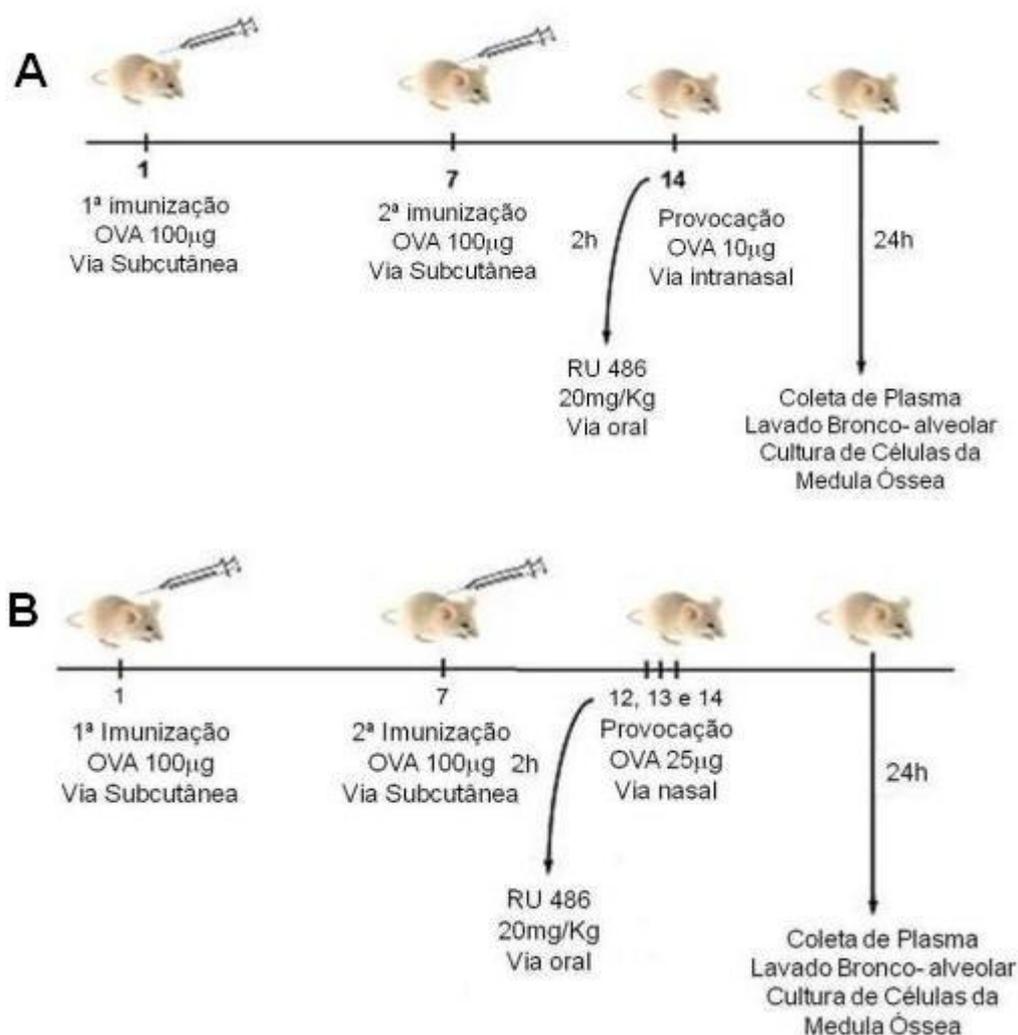


Figura 3.1 – Esquema Experimental: Sensibilização e Tratamento dos animais com RU 486. (A) mostra as injeções de sensibilização, seguidas do tratamento com RU486 e provocação intranasal uma única vez. (B) o mesmo, seguido de 3 provocações. No caso de animais de background B6, a provocação única foi feita com dose mais alta (25 mg).

3.6 Tratamento com metirapone

Para inibir a síntese de glicocorticóides, foi utilizado o metirapone, que bloqueia a etapa da 11- β -hidroxilação, na síntese dos esteróides adrenocorticais (Brunton *et al.*, 2007). A droga foi administrada por via subcutânea, na dose de 30 mg/Kg, em solução salina, nos dias 7 a 14, inclusive (nos dias que coincidem com a provocação, o tratamento ocorreu 2 horas antes deste). Os animais controle receberam o mesmo volume de veículo.

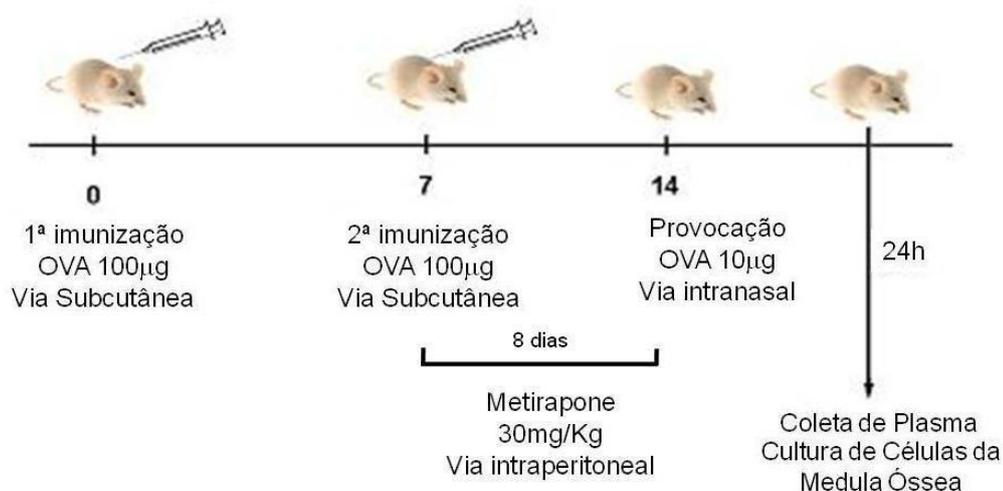


Figura 3.2 – Esquema Experimental: Sensibilização e Tratamento dos animais com Metirapone. A figura mostra as injeções de sensibilização, seguidas do tratamento por metirapone durante 8 dias e provocação intranasal.

3.7 Lavado broncoalveolar

Para a realização do BAL, a traquéia foi exposta e 1 mL de salina gelada foi injetado pela traquéia até encher os pulmões, sendo em seguida coletado o fluido de BAL. O volume foi medido e as células foram citocentrifugadas e contadas, utilizando o corante de Turk. As lâminas foram coradas para a peroxidase resistente ao cianeto.



Figura 3.3 – Esquema Experimental: Lavado Broncoalveolar.

3.8 Testes de Função Pulmonar

A avaliação da função pulmonar foi feita 24 horas após a última provocação (sempre realizado com o protocolo de 3 provocações). Os camundongos foram submetidos à anestesia por via intraperitoneal (Nembutal 60 mg/kg) e bloqueio neuromuscular (brometo de pancurônio, 1 mg/kg). Em seguida, foram submetidos individualmente à ventilação mecânica, através de traqueostomia, canulação e

ligação a um pneumotacógrafo. Após 5 minutos de estabilização, os camundongos foram expostos a PBS ou metacolina em aerossol (doses de 3, 9 e 27 mg/ml, por 2,5 minutos), e o fluxo de ar e a pressão transpulmonar foram obtidos e registrados pelo aparelho FinePointe RC (Buxco Research System). A resistência das vias aéreas (H₂O/ml/s cm) e a complacência dinâmica de pulmão (ml/cm H₂O) foram calculadas e digitalizadas por ciclo respiratório (Fonseca *et al.*, 2009).

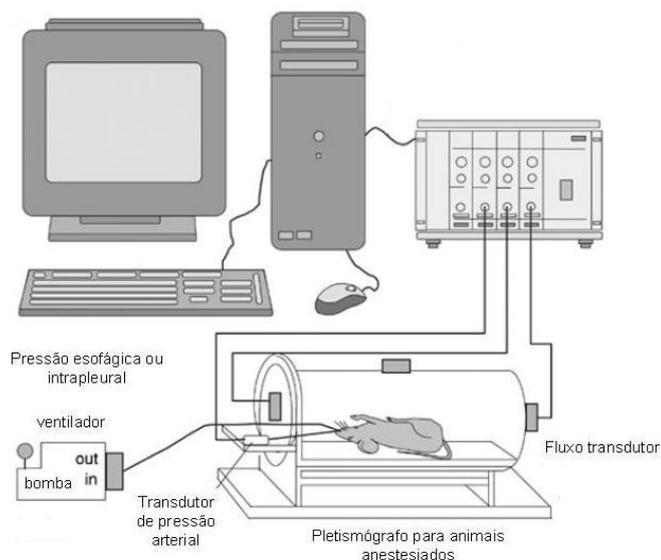


Figura 3.4 – Esquema do aparelho de representação para avaliação da função Pulmonar pelo método invasivo. (Figura adaptada de Pichavant, 2007).

3.9 Dosagem de Corticosterona

Os níveis de corticosterona circulantes foram avaliados utilizando um kit ELISA (Corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical, Michigan, EUA), utilizando as indicações do fabricante. As amostras de plasma foram coletadas entre 08:00 e 09:00 h (Tsigos *et al.*, 2002). O sangue heparinizado foi coletado e o plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C, até o uso.

3.10 Técnica Histológica

Os pulmões foram fixados por 48h em Formol Tamponado (100mL Formol 40%, 18,6g NaH₂PO₄, 4,2g NaOH, qsp a 1000mL com água destilada, pH 7,4) antes do processamento automático (LEICA TP102) onde ocorre o processo de desidratação com crescentes concentrações de álcool (70%, 80%, 95%, 99%, cada

um com duração de 1 hora) e o processo de clarificação utilizando xilol, trocando a solução a cada hora por 3 vezes. A inclusão é realizada passando por duas trocas de parafina (LEICA EG1160). Na microtomia utiliza-se o micrótomo (LEICA RM2155), com cortes de espessura= 5µm, sendo estes corados com hematoxilina e eosina ou pelo método do PAS.

3.11 Esfregaço sanguíneo

Foram obtidas lâminas de esfregaço, estas foram fixadas 1 minuto em metanol e coradas com Wright-Giemsa, e a contagem diferencial foi realizada. As células totais foram contadas coradas em Turk no hemocítômetro.

3.12 Obtenção de Células da Medula Óssea

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Os dois fêmures foram retirados sob condições assépticas, em cabine de segurança biológica e colocados em placas de Petri contendo meio RPMI 1% FCS. A cavidade óssea de cada fêmur foi lavada com este meio de cultura, utilizando-se uma seringa de 10 mL e uma agulha 25x0,7 (22G).

Após a homogeneização da suspensão celular (“pool” dos dois fêmures), realizou-se a contagem do número de células a partir do método de Turk’s em hemocítômetro, utilizando-se uma diluição 1:10. Em seguida, uma pequena amostra de células foi retirada da suspensão celular para citocentrifugação. As lâminas resultantes foram fixadas por 10 minutos em 10% de Formaldeído em solução de PBS (10% Formol/PBS) para posterior realização da contagem diferencial de células através da reação citoquímica para marcação da peroxidase resistente ao cianeto (Ten *et al.*, 1989) e contra-coloração em Hematoxilina de Harris.

3.13 Cultura Líquida de Precursores da Medula Óssea

Para o estudo dos precursores da medula óssea, culturas líquidas foram estabelecidas, em placas de 24 poços (Nunclon Surface - Cat. N^o: 142475 - NUNCTM Brand Products), 10⁶ células por poço, obtidas como descrito no item 4.3.2, no volume de final de 1 mL em meio RPMI suplementado com 10% de FCS na presença ou ausência de IL-5 a 1 ng/mL. Onde indicado, foi adicionada eotaxina na

concentração de 1ng/mL (Queto *et al.*, 2010). Cada ponto foi realizado em duplicata. A cultura foi incubada a 37° C, durante 7 dias, em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, realizou-se a ressuspensão das células de cada poço com o auxílio de pipeta. Uma pequena amostra da suspensão celular foi obtida para o cálculo do número de células totais nos poços, a partir de contagens em hemocitômetro. A mesma suspensão foi citocentrifugada e, as lâminas resultantes foram fixadas por 10 minutos em 10% Formol/PBS, seguindo-se de reação citoquímica para marcação da peroxidase resistente ao cianeto (Ten *et al.*, 1989) seguido de coloração com Hematoxilina de Harris permitindo, através de contagem diferencial, analisar a porcentagem de eosinófilos. Para a obtenção do número absoluto de eosinófilos na cultura, multiplicou-se a porcentagem de eosinófilos presente em contagens diferenciais pelo número total de células, presentes em cada cultura no momento da ressuspensão (nº células totais X % células EPO+)/100).

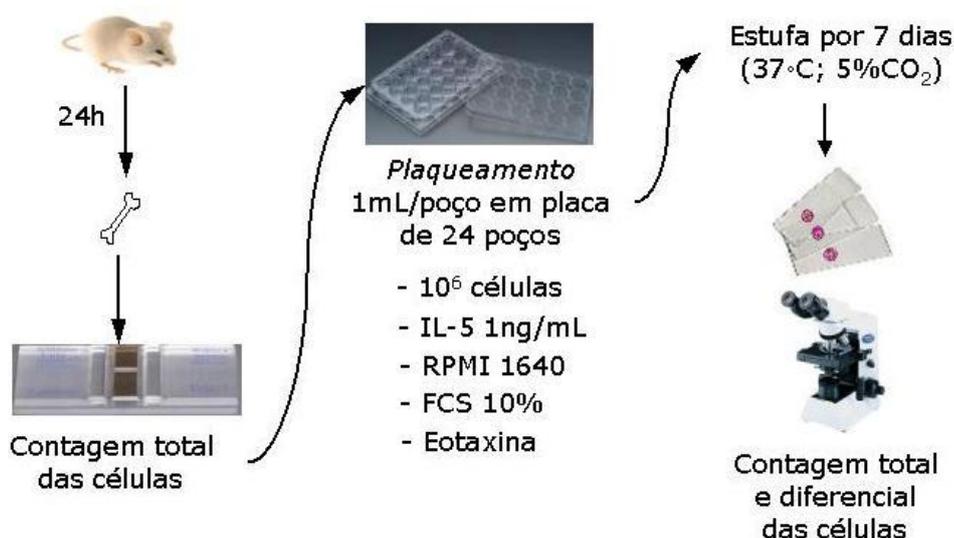


Figura 3.5 – Esquema Experimental: Obtenção da Medula Óssea e Cultura Líquida.

3.14 Técnicas de Contagem, Fixação e Coloração

3.14.1 Contagem de Células Totais

As células em suspensão foram diluídas em solução corante de Turk's na proporção 1:10 (células para cultura provenientes da medula óssea) ou 1:2 (células

provenientes da suspensão celular após 7 dias de cultura), e as células totais foram contadas em hemocítômetro (Câmara de Neubauer).

3.14.2 Citocentrifugação e reação citoquímica para marcação de Peroxidase Resistente ao Cianeto

A suspensão celular foi citocentrifugada por 6 min, em citocentrífuga modelo Cytospin 3 (Cat. N^o: 74000102 - Shandon - England). As células presentes na lâmina foram fixadas em Formol 10% em PBS por 10 minutos. As lâminas fixadas foram avaliadas utilizando o método desenvolvido por Ten e colaboradores (Ten *et al.*, 1989). Para reação citoquímica, usamos o kit de sistema de coloração com DAB (Liquid DAB + Substrate Chromogen System Ref. N^o: K3468 – Fabricante DakoCytomation, CA, USA) na presença de cianeto de potássio 6mM em tampão fosfato (pois a peroxidase do eosinófilo de camundongo é a única resistente à adição de cianeto ao sistema) e de H₂O₂ 0,3%. As células foram incubadas com esta solução final por 5 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e contra-coradas com solução corante hematoxilina 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 possuem apenas o núcleo corado em roxo, permitindo assim a diferenciação entre os eosinófilos e as demais células. A porcentagem de eosinófilos na cultura líquida é determinada pela contagem do número de células positivas (coradas em marrom) em um total de 300 células.

3.14.3 Corantes

Turk's: A solução Turk's foi preparada com 2 mL de ácido acético glacial adicionado de 1mL de cristal violeta 1% em metanol e completada com água deionizada ou destilada até o volume final de 100 mL.

Hematoxilina de Harris: A solução corante foi preparada pesando-se 5 g de cristais de hematoxilina e 100 g de alúmen de potássio, dissolvidos sob calor, em uma solução preparada com 50 mL de álcool absoluto, 2,5 mL de ácido de mercúrio, em água destilada suficiente para 1 L.

3.15 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise fatorial de variância, acompanhada do teste de Tukey, e valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Para comparação de resultados com apenas dois grupos, foi utilizado o teste t não pareado, com variâncias reunidas. Estas análises foram realizadas utilizando o programa Systat (Systat 5.04 for windows – Systat, Inc. Everston, IL, USA). Para experimentos com mais de 2 grupos e mais de duas variáveis experimentais (análise de função pulmonar), foi utilizada a técnica análise de variância de duas vias com correção de Bonferroni, realizado no programa Prism 5.0 para Windows (GraphPad, La Jolla, CA).

4. Resultados

4.1 Impacto do bloqueio dos Glicocorticóides endógenos sobre a resposta hematopoética *in vivo* e *ex vivo* à provocação alérgica

Inicialmente, avaliamos o papel da produção de glicocorticóides endógenos no aumento da eosinopoiese induzido pela provocação alérgica por via aérea, administrando o antagonista do receptor de glicocorticóide, RU 486, antes da provocação pelo protocolo 1 (1 provocação).

Na figura 4.1A, observa-se o efeito do bloqueio da atuação dos glicocorticóides endógenos sobre o número de células EPO+ presente no momento em que a medula óssea foi coletada a partir dos dois fêmures (dia 0, ou seja, 24 h após a provocação alérgica). Nos animais imunizados, tratados com veículo e provocados com OVA (OVA/VEIC/OVA), há um aumento significativo no número de células EPO+ presentes na medula óssea, relativamente ao controle (animais provocados com salina – OVA/VEIC/SAL, $p < 0,03$). Quando os animais são tratados com RU486 e provocados com OVA (OVA/RU/OVA), esse aumento no número de células EPO+ é abolido (relativo a OVA/VEIC/SAL, $p = 0,947$; relativo a OVA/VEIC/OVA $p < 0,02$). O tratamento com RU486, nos animais que posteriormente foram provocados com salina, não apresentou efeito em relação ao controle tratado com veículo (relativo a OVA/VEIC/SAL, $p = 1,000$).

Na figura 4.1B observa-se o efeito do mesmo tratamento sobre a resposta *ex vivo* das células da medula óssea à IL-5 durante 7 dias de cultura na presença de IL-5. Nos animais imunizados, tratados com veículo e provocados com OVA (OVA/VEIC/OVA), há um aumento da eosinopoiese em cultura com IL-5 relativamente ao controle (animais provocados com salina – OVA/VEIC/SAL, $p < 0,001$). Quando os animais são tratados com RU486 e provocados com OVA (OVA/RU/OVA), esse aumento no número de células EPO+ é abolido (relativamente a OVA/VEIC/SAL, $p = 1,000$; relativamente a OVA/VEIC/OVA, $p < 0,001$). O tratamento com RU486, nos animais que posteriormente foram provocados com salina, não apresentou efeito em relação ao controle tratado com veículo (OVA/VEIC/SAL, $p = 0,236$).

Nestes experimentos, a provocação alérgica com OVA foi capaz de aumentar significativamente a eosinopoiese *in vivo* (Dia 0, figura 4.1A), assim como a resposta *ex vivo* da medula óssea à IL-5 em cultura líquida (figura 4.1B), em comparação com os controles provocados com salina, como demonstrado anteriormente (Gaspar Elsas *et al*, 1997). O grupo submetido ao tratamento com RU486 antes da provocação com OVA não diferiu significativamente dos controles sensibilizados, provocados com salina, nem dos controles tratados com RU486 e provocados com salina. Isto indica que o RU486, por si só não afeta a eosinopoiese, nem *in vivo* nem *ex vivo*, mas impede o seu aumento induzido pela provocação alérgica.

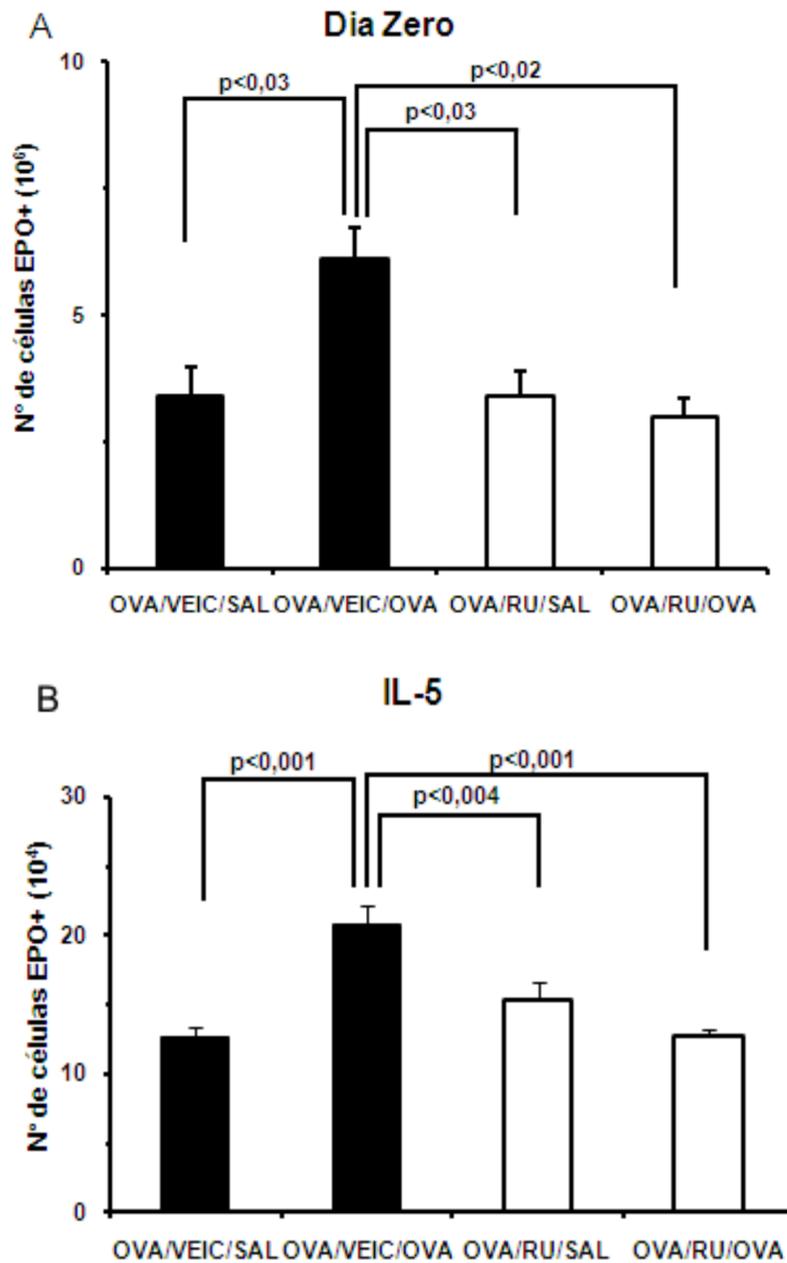


Figura 4.1 – Efeito do pré-tratamento com RU486 sobre a eosinopoiese, *in vivo* e *ex vivo*. O gráfico representa média \pm EPM do número de células EPO+ em medula óssea recém-coletada (Dia zero, Painel A) ou cultivada (IL-5, Painel B) a partir de camundongos BALB/c imunizados com OVA e provocados com salina (OVA/SAL) ou imunizados com OVA e provocados 1x com OVA (OVA/OVA) e pré-tratados com veículo (VEIC) ou RU486 (RU) antes da provocação. (N=3-4).

Em seguida, procuramos confirmar de forma independente o envolvimento de glicocorticóides endógenos neste efeito, com o uso do inibidor da sua produção, metirapone, utilizando o mesmo protocolo de 1 provocação.

Na figura 4.2A, observa-se a resposta das células da medula óssea *in vivo* à sensibilização e provocação alérgica, em função do bloqueio da produção de glicocorticóides endógenos. Nos animais imunizados, tratados com veículo e provocados com OVA (OVA/VEIC/OVA), há um aumento no número de células EPO+ presentes na medula óssea, relativamente ao controle negativo (animais provocados com salina – OVA/VEIC/SAL, $p < 0,05$). Quando os animais são tratados com Metirapone e provocados com OVA (OVA/MET/OVA), esse aumento no número de células EPO+ é abolido (relativamente a OVA/VEIC/SAL, $p = 0,996$; relativamente a OVA/VEIC/OVA, $p < 0,05$). O tratamento com Metirapone nos animais que posteriormente foram provocados com salina, não apresentou efeito em relação ao controle tratado com veículo (OVA/VEIC/SAL, $p = 0,733$).

Na figura 4.2B observa-se a resposta *ex vivo* à IL-5 nas células da medula óssea dos mesmos animais, em função do tratamento com veículo ou metirapone. Nos animais imunizados, tratados com veículo e provocados com OVA (OVA/VEIC/OVA), houve um aumento significativo da eosinopoiese após 7 dias de cultura na presença de IL-5, relativamente ao controle (animais provocados com salina – OVA/VEIC/SAL, $p < 0,01$). Quando os animais foram tratados com Metirapone e provocados com OVA (OVA/RU/OVA), esse aumento no número de células EPO+ foi abolido (relativamente a OVA/VEIC/SAL, $p = 0,986$; relativamente a OVA/VEIC/OVA, $p < 0,02$). O tratamento com Metirapone, nos animais que posteriormente foram provocados com salina, não apresentou efeito em relação ao controle tratado com veículo (OVA/VEIC/SAL, $p = 0,771$).

A resposta observada em animais sensibilizados e pré-tratados com metirapone antes da provocação com OVA foi comparável à observada em controles sensibilizados, provocados com salina, e em controles sensibilizados e pré-tratados com metirapone antes da provocação com salina, indicando que o metirapone por si só não afeta a eosinopoiese, nem *in vivo* nem *ex vivo*, mas impede o seu aumento induzido pela provocação alérgica. Estas observações reforçam a interpretação

dada anteriormente aos experimentos envolvendo o tratamento com RU486, por se tratar de um tratamento independente, e de mecanismo distinto, que tem efeito idêntico ao intervir sobre o mesmo alvo, ou seja, a sinalização mediada por glicocorticóides endógenos.

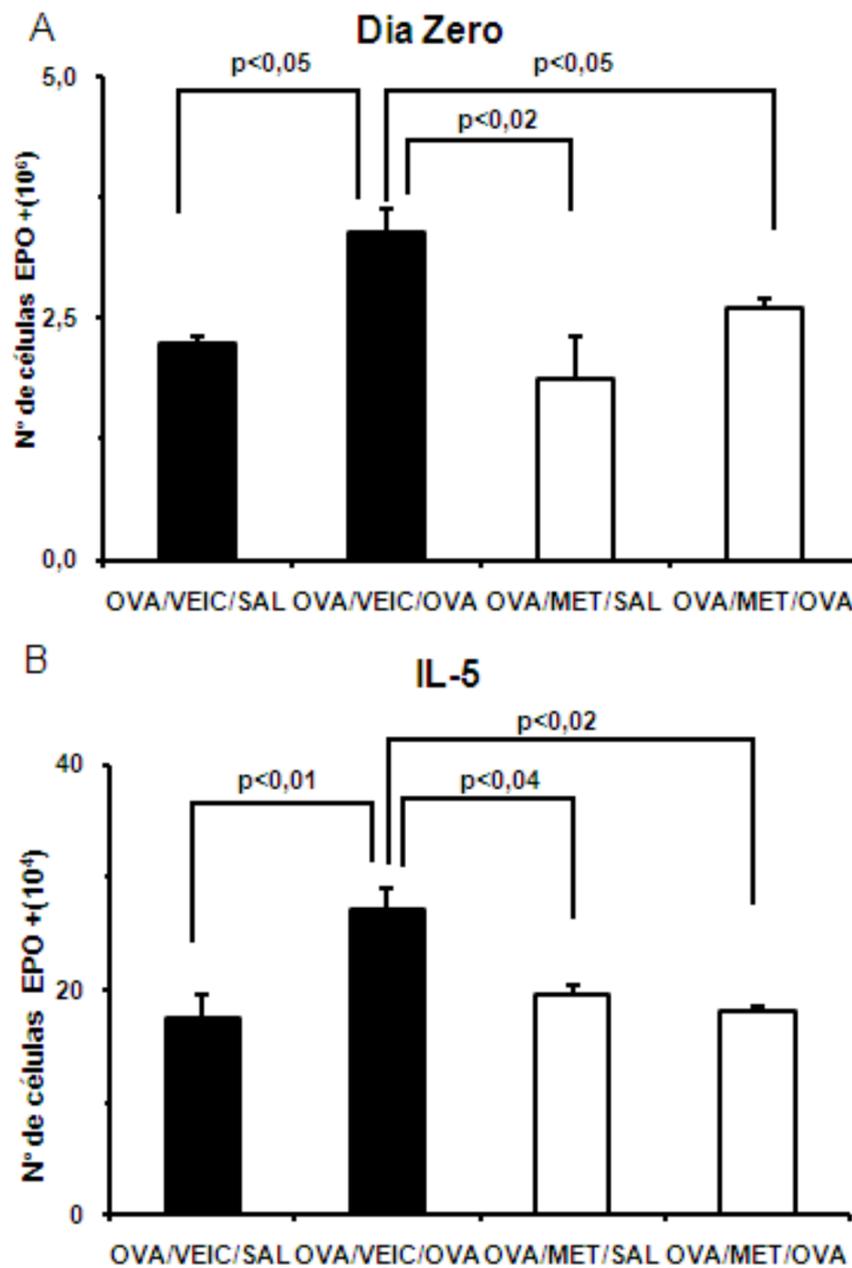


Figura 4.2 - Efeito do pré-tratamento com metirapone sobre a eosinofiloiose, *in vivo* e *ex vivo*. O gráfico representa média \pm EPM do número de células EPO+ em medula óssea recém-coletada (Dia zero, painel A) ou cultivada (IL-5, painel B) a partir de camundongos BALB/c imunizados com OVA e provocados com salina (OVA/SAL) ou imunizados com OVA e provocados 1x com OVA (OVA/OVA) e pré-tratados com veículo (VEIC) ou metirapone (MET) antes da provocação. (n=3).

Esta interpretação depende, evidentemente, de demonstrarmos que: a) a provocação alérgica em animais sensibilizados induz efetivamente um aumento nos níveis circulantes de glicocorticóides endógenos, compatível com a ativação do eixo HPA; b) os dois bloqueadores utilizados têm efeitos distintos sobre os níveis circulantes de corticosterona, nestas condições. Para confirmar que estes pressupostos se aplicavam ao nosso estudo, dosamos os níveis de corticosterona no plasma dos animais em cada tratamento, 24 h após a provocação (que é o momento em que a medula óssea é coletada para a avaliação dos efeitos *in vivo* e *ex vivo* da provocação). Para isso, foram feitas dosagens com kit ELISA (como descrito na Metodologia), cujos resultados foram consistentes com os de dosagens em radioimunoensaio (dados não mostrados).

Na figura 4.3A mostramos as dosagens por ELISA de corticosterona circulante nos animais tratados com RU486 e provocados 24 h antes da coleta do plasma. Os animais imunizados, tratados com veículo e provocados com ovalbumina (OVA/VEIC/OVA) apresentaram um aumento significativo nos níveis de corticosterona no plasma em relação aos animais que foram provocados com salina ($p < 0,006$). Quando os animais foram tratados com o RU486, esse aumento não foi abolido ($p = 0,669$ em relação ao controle tratado com veículo e provocado com OVA). Isto mostra que há um aumento na produção de glicocorticóides nos animais provocados, e que, como esperado, o RU486 não reduz os níveis circulantes de corticosterona.

Na figura 4.3B, mostramos as dosagens de corticosterona nos animais sensibilizados e provocados, com ou sem tratamento pelo metirapone. Os animais imunizados, tratados com veículo e provocados com ovalbumina (OVA/VEIC/OVA) apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma, comparáveis aos mostrados na figura 4.3A. Em contraste, os animais imunizados, tratados com o Metirapone e provocados com ovalbumina, apresentam níveis significativamente reduzidos de corticosterona ($p < 0,04$), em relação ao controle tratado com veículo e provocado com OVA. Nestes animais, os níveis de corticosterona se mantêm numa faixa comparável à dos controles provocados com salina (ver Figura 4.3A). Isto

mostra que o metirapone, como esperado, impede o aumento da liberação de glicocorticóides endógenos nos animais provocados.

Estes dados, em conjunto, confirmam a hipótese de que a provocação estimula o eixo HPA, produzindo um aumento dos níveis circulantes de glicocorticóides endógenos, de forma comparável ao observado no modelo de estresse cirúrgico (Elsas et al., 2004). Eles apoiam a nossa interpretação de que o RU486 e o metirapone interferem com a sinalização por glicocorticóides endógenos por mecanismos distintos, afetando os níveis de corticosterona de forma compatível com os modelos correntes para seus mecanismos de atuação.

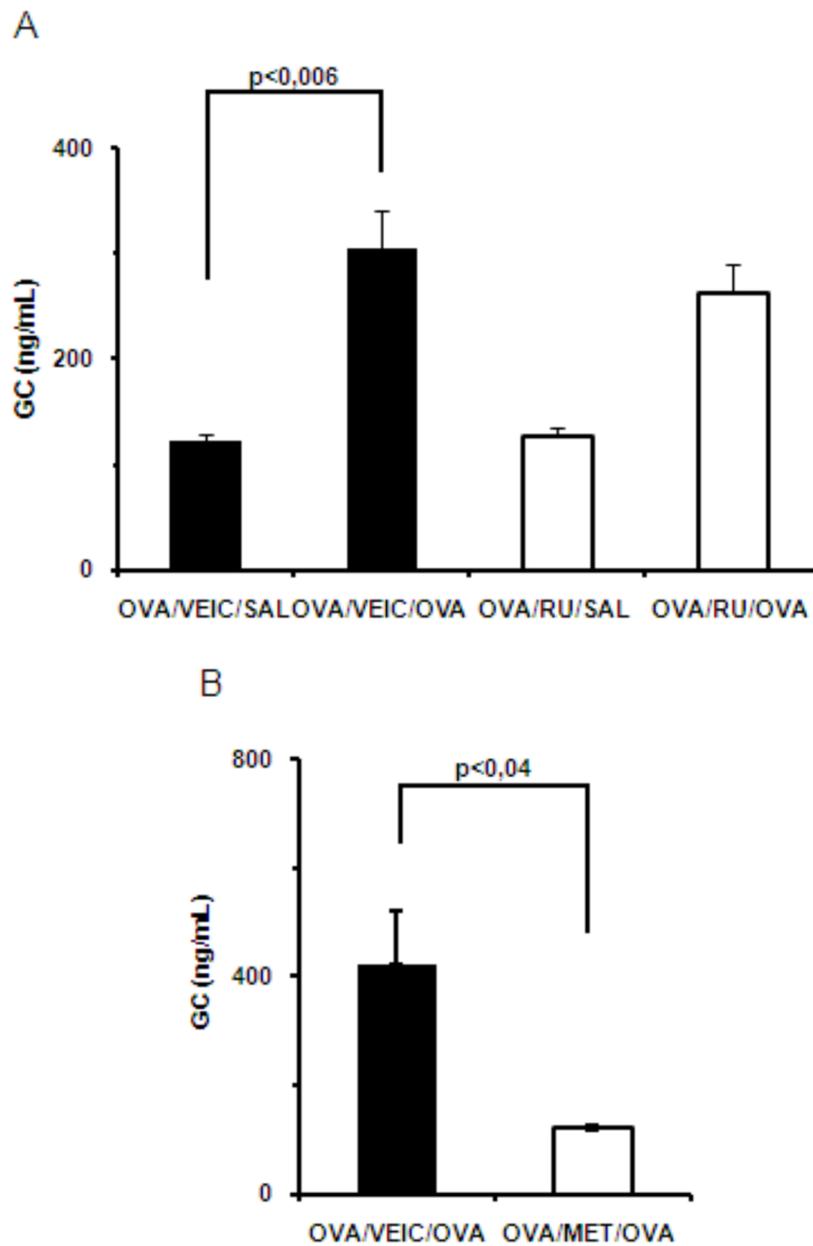


Figura 4.3 - Efeito do pré-tratamento com RU486 (Painel A) e Metirapone (Painel B) sobre os níveis de corticosterona no plasma. O gráfico representa média \pm EPM dos níveis plasmáticos de corticosterona (GC) de camundongos BALB/c imunizados com OVA e provocados com salina (OVA/SAL) ou imunizados com OVA e provocados 1x com OVA (OVA/OVA) e pré-tratados com veículo (VEIC) ou RU486 (Painel A) ou metirapone (MET, Painel B) antes da provocação. (n=3).

4.2 Efeito do metirapone sobre a eosinofilia do sangue periférico

Tendo confirmado que o tratamento com metirapone: a) atenua a resposta endócrina à provocação, definida pelos níveis circulantes de corticosterona; e b) impede os efeitos da provocação sobre a eosinofilia da medula óssea *in vivo* e a eosinopoiese *ex vivo*, procuramos avaliar se o mesmo tratamento teria também um efeito detectável sobre a eosinofilia do sangue. Para isso, foram examinados esfregaços de sangue de animais que foram sensibilizados e provocados com ovalbumina, utilizando o protocolo de 1 provocação, com e sem pré-tratamento com metirapone.

Na figura 4.4 observa-se a porcentagem de eosinófilos presentes no sangue de animais sensibilizados e provocados, tratados com veículo ou metirapone. Nos animais imunizados, tratados com veículo e provocados com OVA (OVA/VEIC/OVA), há um aumento significativo na porcentagem de eosinófilos presentes no sangue relativamente ao controle (animais provocados com salina – OVA/VEIC/SAL, $p < 0,03$). Estas observações foram consistentes com um aumento significativo ($p < 0,04$) no número absoluto de eosinófilos no sangue periférico de animais do grupo OVA/VEIC/OVA, relativamente a controles OVA/VEIC/SAL (dados não mostrados). Quando os animais foram tratados com Metirapone e provocados com OVA (OVA/MET/OVA), o aumento na porcentagem de eosinófilos foi abolido (relativamente a OVA/VEIC/SAL, $p = 0,942$; relativamente a OVA/VEIC/OVA, $p < 0,04$).

Estas observações mostram que a interferência com a resposta adrenal à provocação é acompanhada por um bloqueio do efeito da provocação sobre a eosinofilia circulante.

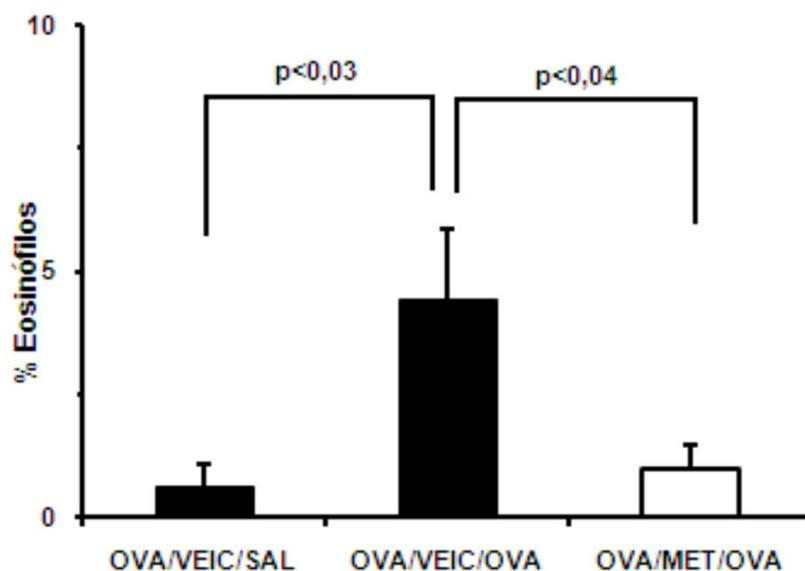


Figura 4.4 - Efeito do pré-tratamento com metirapone sobre a eosinofilia sanguínea. O gráfico representa média \pm EPM da porcentagem de eosinófilos no sangue a partir de camundongos BALB/c imunizados com OVA e provocados com salina (OVA/SAL) ou imunizados com OVA e provocados 1x com OVA (OVA/OVA) e pré-tratados com veículo (VEIC) ou metirapone (MET) antes da provocação. (n=3-4).

4.3 Impacto da provocação única sobre o parênquima pulmonar evidenciado em cortes histológicos

O impacto da provocação alérgica em animais sensibilizados sobre a produção de eosinófilos na medula óssea foi descrito num modelo de provocação única (Gaspar Elsas *et al.*, 1997), que foi utilizado, sem modificações, no presente trabalho. Usando o mesmo protocolo, foi evidenciado subsequente o fenômeno da colonização dos pulmões por progenitores eosinofílicos (Gaspar Elsas *et al.*, 2003; Maximiano *et al.*, 2005; Xavier-Elsas *et al.*, 2007). Finalmente, utilizando um protocolo de transplante ectópico de tecido pulmonar, que incorpora os procedimentos de sensibilização e provocação do estudo original, foi possível atribuir o efeito da provocação à liberação de fatores pelo tecido pulmonar provocado (Xavier-Elsas *et al.*, 2004). Em nenhum destes estudos, contudo, foi feita uma avaliação do grau de inflamação dos pulmões provocados, com base em critérios morfológicos. Para melhor compreender a evolução da eosinofilia medular, sanguínea e pulmonar em nossos experimentos, avaliamos se uma única provocação alérgica de animais sensibilizados, acarreta infiltração eosinofílica do parênquima pulmonar, assim como as mudanças associadas nas células produtoras de muco, descritas em outros estudos. Para isto, foram feitos cortes histológicos de pulmão, corados pela HE ou pelo PAS.

Na figura 4.5, Painéis A e B, mostramos aspectos representativos de cortes histológicos corados em HE, obtidos de animais dos grupos OVA/VEIC/SAL e OVA/VEIC/OVA, respectivamente, 24 h após a provocação. Nos dois grupos, não houve evidência de uma infiltração inflamatória importante, nem presença significativa de eosinófilos no parênquima. Nos Painéis C e D, são mostradas imagens representativas dos grupos OVA/VEIC/SAL (C) e OVA/VEIC/OVA (D), após coloração das células produtoras de muco pelo PAS. Em contraste com a ausência de infiltrados inflamatórios, há uma diferença clara entre os dois grupos na quantidade de muco detectada, assim como no número de células positivas para PAS, com os dois parâmetros claramente aumentados no grupo OVA/VEIC/OVA em comparação com os controles.

Em conjunto, estas observações sugerem que a provocação única de animais sensibilizados não é capaz de induzir inflamação eosinofílica importante no parênquima. O impacto da provocação única sobre o parênquima pulmonar é, no entanto, bem evidenciado pelo aumento importante na produção de muco e no número de células PAS+. As observações sugerem que o impacto de uma provocação única é mais facilmente percebido como um aumento na produção de muco, ou um aumento na produção de eosinófilos pela medula óssea, do que como um aumento nos infiltrados eosinofílicos intrapulmonares.

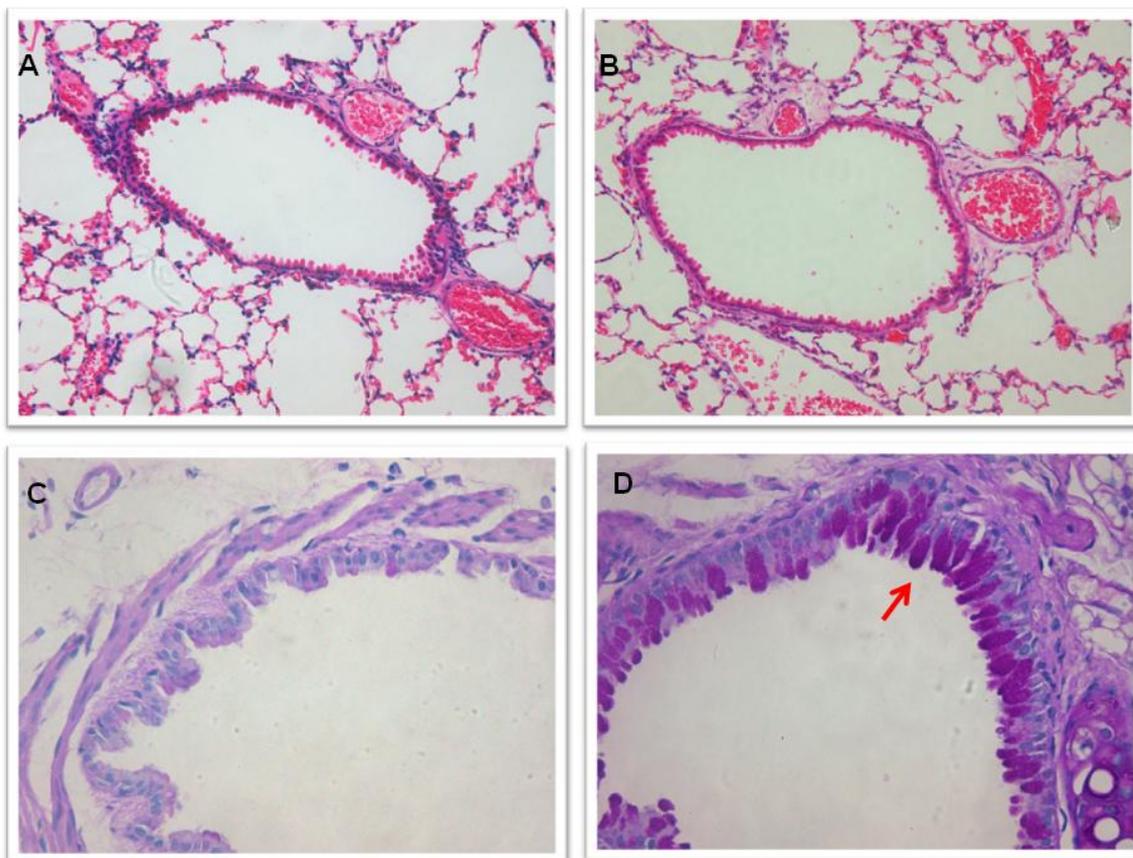


Figura 4.5 – Impacto da provocação única de animais sensibilizados sobre a presença de infiltrados inflamatórios e de células produtoras de muco no pulmão. As imagens são representativas dos pulmões de camundongos OVA/VEIC/SAL (A, C) e OVA/VEIC/OVA (B, D), corados em HE (A, B) ou pelo PAS (C, D). A, B, aumentos de 200x. C, D, aumentos de 400x. A seta indica o aspecto típico de uma célula produtora de muco, encontrado em toda a superfície mucosa no pulmão provocado (D), e ausente ou mínimo no pulmão controle (C). (n=3)

4.4 Impacto da provocação sobre o fluido do lavado broncoalveolar (BAL) em animais sensibilizados e provocados, e seu bloqueio pelo RU486

Procuramos avaliar, em seguida, se a provocação, em animais sensibilizados, induzia acumulação de eosinófilos no fluido de lavado broncoalveolar (BAL) e, em caso positivo, se esta acumulação era afetada pela interferência com a sinalização por glicocorticóides endógenos. Para isto, foram realizados experimentos com camundongos BALB/c sensibilizados e provocados com OVA, pré-tratados com veículo ou RU486, para avaliar o papel dos glicocorticóides na acumulação de eosinófilos no BAL. Camundongos sensibilizados, mas provocados com salina, não foram utilizados, pois nestes animais o bloqueio com RU486 não tem efeito significativo (ver Figura 4.1). Consideramos importante avaliar também, neste aspecto, os efeitos do mesmo antagonista sobre a inflamação num protocolo de provocações múltiplas, uma vez que a observação de efeitos no sítio inflamatório seria facilitada por um protocolo com mais antígeno e maior tempo de observação, o que pode ser obtido num protocolo de múltiplas provocações. Para isto, utilizamos o protocolo 2, em que os animais são provocados 3 vezes, tratando os animais com RU486 ou veículo antes de cada provocação.

Na figura 4.6A mostramos os números totais de células presentes no BAL nas diferentes condições experimentais estudadas. Este número está significativamente ($P < 0.001$) aumentado em animais provocados repetidamente, relativamente aos que foram provocados uma vez. Não houve diferença significativa entre o grupo controle normal (naive) e os animais provocados uma só vez. Em todos os grupos examinados, a grande maioria das células no BAL eram mononucleares, com a morfologia de macrófagos alveolares, porém observamos também a presença de neutrófilos. Nos controles normais (naive), os eosinófilos eram raramente encontrados. Em contraste, eosinófilos foram encontrados nos dois grupos de animais sensibilizados e provocados, como mostrado na Figura 4.6B. Nos dois grupos, os números de eosinófilos foram significativamente maiores que nos controles naive ($P < 0.001$ nos dois casos). O BAL de animais submetidos à provocação múltipla continha um número significativamente ($P < 0.002$) maior de eosinófilos do que o de animais provocados uma única vez. Nos dois grupos de animais sensibilizados e provocados, o pré-tratamento com RU486 aboliu totalmente

a acumulação de eosinófilos ($P < 0.001$; % inibição=92,78 para o grupo provocado 1 x; =100 para o provocado 3x), cujos números tornaram-se iguais ou menores do que os encontrados em animais naive.

Os painéis 4.6C e 4.6D mostram fotomicrografias representativas de citocentrifugados obtidos do BAL de animais OVA/VEIC/OVA provocados 3x, com eosinófilos e células mononucleares. Nas figuras 4.6E e 4.6F, em contraste, chama a atenção a total ausência de eosinófilos em amostras comparáveis do BAL de animais OVA/RU/OVA provocados 3x.

Estes resultados fornecem, até onde sabemos, a primeira evidência experimental de que os hormônios de estresse secretados pela adrenal são necessários para a inflamação alérgica pulmonar.

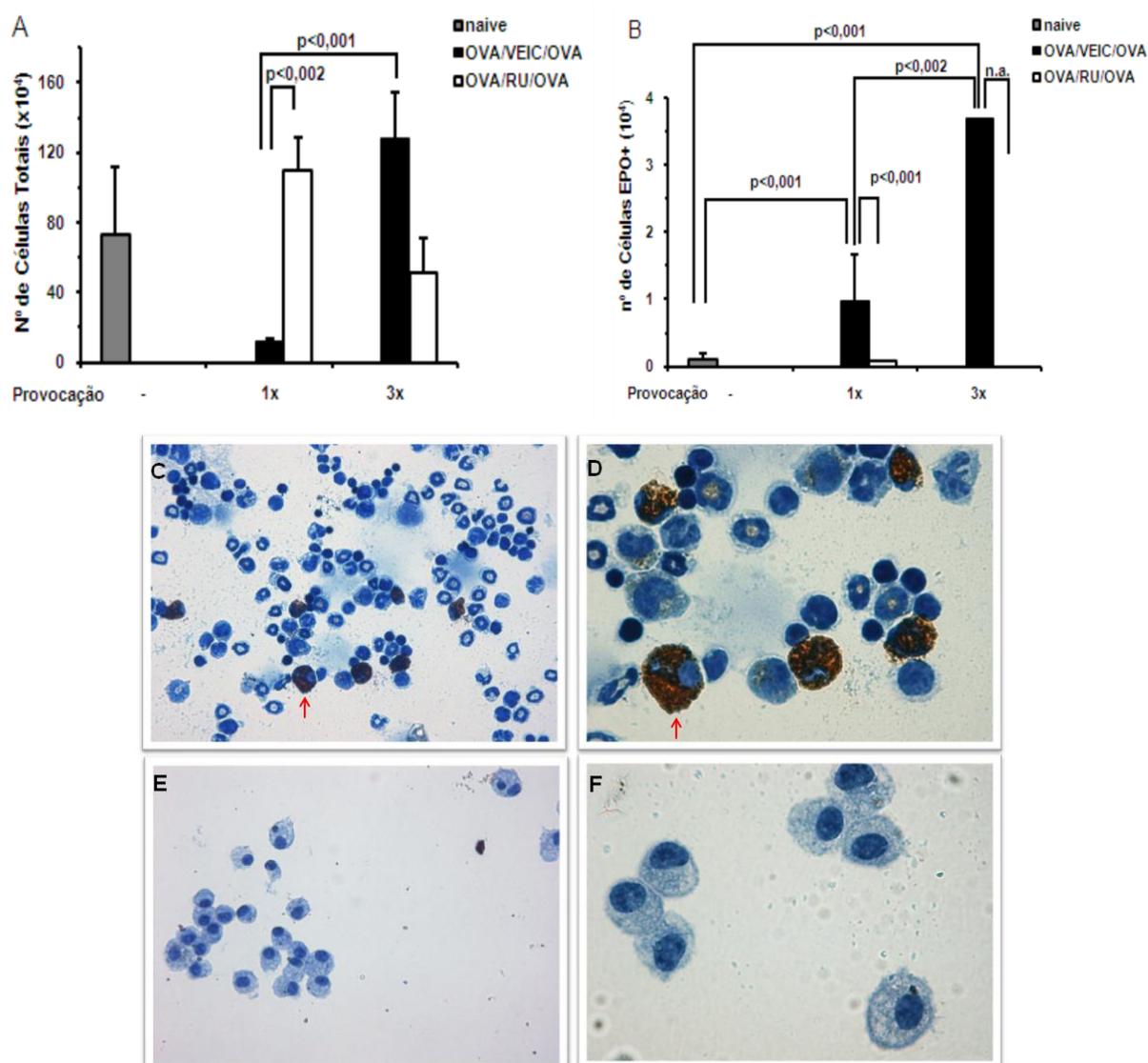


Figura 4.6 – Efeito do RU486 sobre a eosinofilia do BAL. (A) e (B) Os dados são média \pm EPM do número de (A) células nucleadas totais (B) células EPO+ presentes no BAL de camundongos BALB/c naive e imunizados com OVA e provocados com OVA, após tratamento com veículo ou RU 486. (C, D, E, F) Fotomicrografias das lamina do BAL. (C) e (D) células do BAL de animais OVA/VEIC/OVA e (E) e (F) de animais OVA/RU/OVA, ambos com protocolo de três provocações. (A e C, aumento de 400X) e (B e D, aumento de 1000X em imersão). (n=3-7).

4.5 Impacto da provocação sobre a eosinofilia da medula óssea num protocolo de provocações múltiplas e seu bloqueio pelo RU486

Tendo em vista a inesperada eficácia do RU486 em bloquear a passagem de eosinófilos para os espaços bronco-alveolares em animais submetidos à provocação múltipla, consideramos de grande interesse verificar os efeitos deste tratamento sobre a medula óssea *in vivo*, uma questão que ainda não tinha sido explorada, visto que nosso modelo de regulação da eosinopoiese pela provocação tinha sido estabelecido com uma só provocação (Gaspar Elsas et al., 1997).

Como mostrado na figura 4.7, a medula óssea responde *in vivo* à provocação múltipla com um aumento significativo do número de eosinófilos, relativamente aos controles não-provocados ($p < 0,04$), e ao RU486 com bloqueio deste aumento (OVA/VEIC/SAL $p = 0,998$; OVA/VEIC/OVA $p < 0,05$). O RU486, na ausência de provocação, não teve efeito significativo ($p = 0,666$). A magnitude do aumento observado não foi significativamente maior do que no modelo de provocação única ($P = 0,393$, em comparação com a Figura 4.1A).

Estes resultados mostram que, mesmo com a forte estimulação resultante de uma provocação repetida, os glicocorticóides endógenos continuam sendo estritamente necessários para o aumento da eosinopoiese *in vivo*. Tal achado reforça a importância dos mecanismos glicocorticóide-dependentes para a manutenção de uma reação alérgica.

Medula Óssea - Múltiplas Provocações

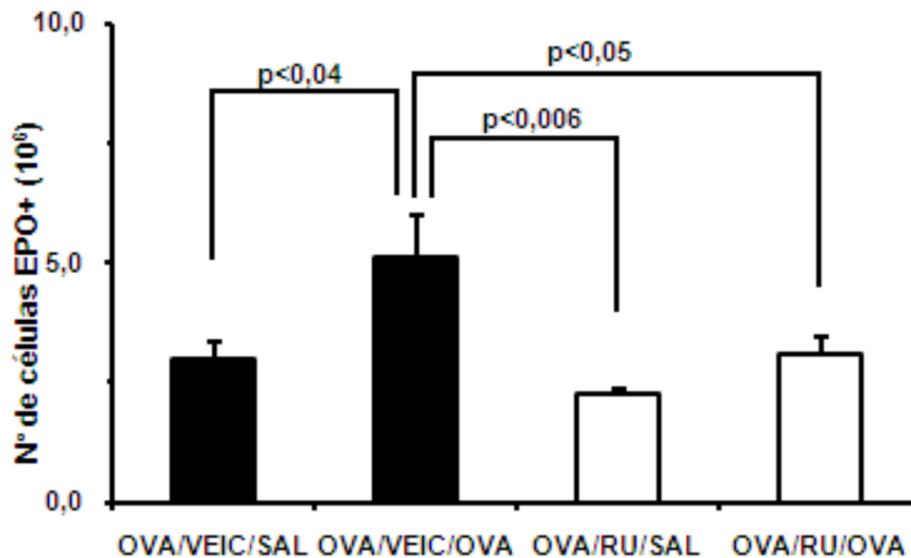


Figura 4.7 – Efeito do pré-tratamento com RU486 sobre a eosinofiloiose ex vivo em protocolo de provocação múltipla. O gráfico representa média \pm EPM do número de células EPO+ em medula óssea recém-coletada (Dia zero) a partir de camundongos BALB/c imunizados com OVA e provocados com salina (OVA/SAL) ou imunizados com OVA e provocados 3x com OVA (OVA/OVA) e pré-tratados com veículo (VEIC) ou RU 486 (RU) antes das provocações. (n=3).

4.6. Impacto do tratamento com RU486 ou metirapone sobre a função pulmonar em animais sensibilizados e provocados.

Procuramos, em seguida, avaliar o impacto do bloqueio dos glicorticóides adrenais sobre a função pulmonar, através do pré-tratamento com RU 486 ou metirapone dos animais sensibilizados e provocados com OVA. Como a grande maioria dos estudos de função pulmonar na literatura é feita com animais submetidos à provocação múltipla, e como, no nosso grupo, apenas animais repetidamente provocados foram estudados do ponto de vista de função pulmonar, utilizamos nestes experimentos o protocolo 2 (3 provocações). O uso dos inibidores neste contexto é plenamente justificado, pelos efeitos do RU486 no modelo de provocação múltipla, com impacto marcado sobre a eosinofilia do BAL e a eosinopoiese na medula óssea, como detalhado anteriormente.

A figura 4.8, painéis A e B, mostra que animais imunizados e provocados com OVA, tratados com veículo, apresentaram um aumento significativo na resistência das vias aéreas em resposta a 27 (mas não 3 e 9) mg/mL de metacolina, em relação aos grupos controle, provocados com salina, e pré-tratados com veículo, ou com RU486 (painel A) ou metirapone (painel B). Nos dois casos, o tratamento com RU486 (painel A) ou metirapone (painel B) não teve efeito significativo na ausência de provocação com OVA. O efeito da provocação alérgica nos animais sensibilizados foi totalmente abolido pelo bloqueio dos glicocorticóides adrenais, nos dois casos.

Em conjunto, esses resultados apontam para uma contribuição essencial dos glicocorticóides adrenais para as alterações de função pulmonar que se seguem à provocação repetida em animais sensibilizados.

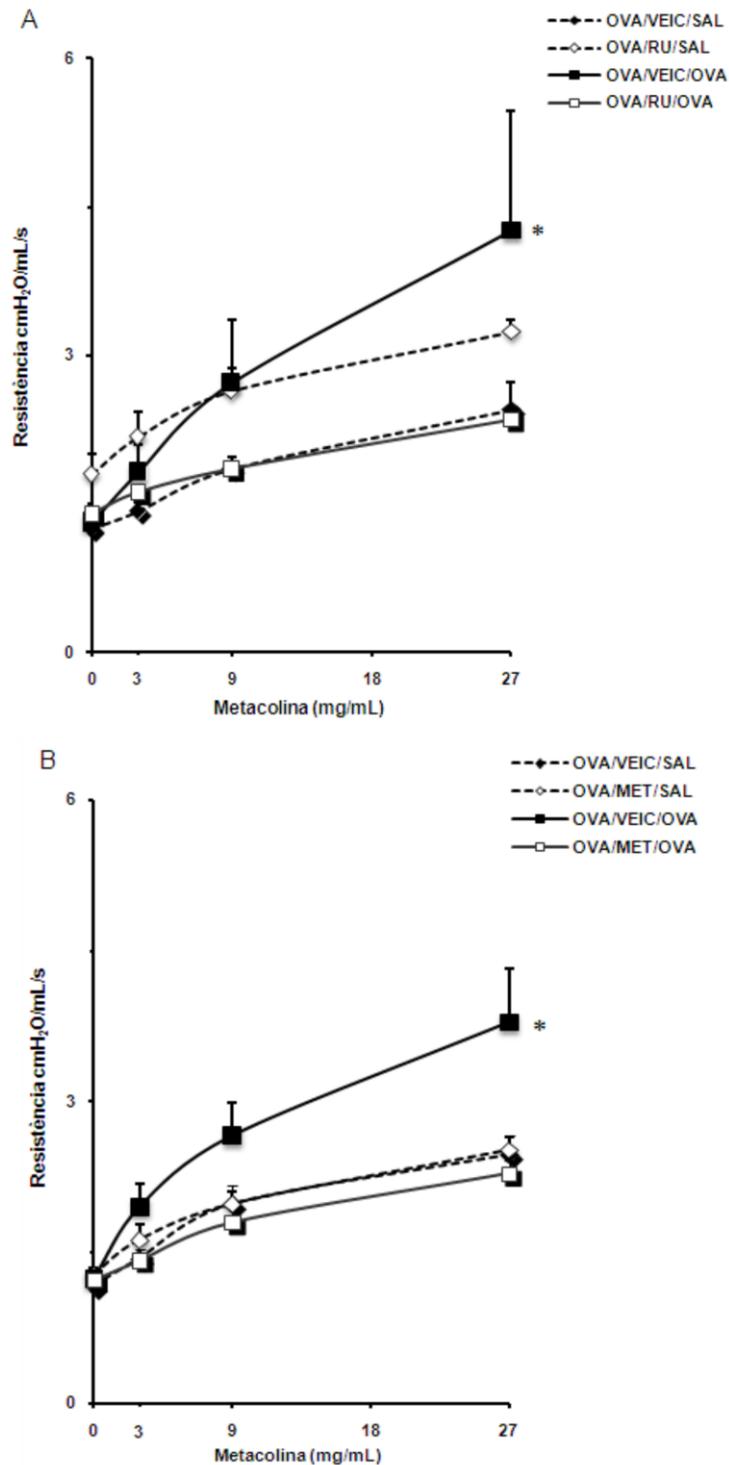


Figura 4.8 – Impacto do bloqueio de glicocorticóides endógenos sobre a função pulmonar. Camundongos BALB/c foram sensibilizados e provocados 3x com salina (SAL) ou ovalbumina (OVA), após pré-tratamento com veículo, RU486 (RU) ou metirapone (MET). Os dados (Média+EPM) são dos valores da resistência das vias aéreas em animais expostos nas concentrações de metacolina indicadas. (* $p < 0,01$; $n = 3-6$).

4.7. Papel dos Glicocorticoides endógenos na imunorregulação da resposta de células da medula óssea à eotaxina em animais imunizados e provocados

Em estudos anteriores, nosso laboratório evidenciou, pela primeira vez, um efeito de imunorregulação de respostas da medula óssea a drogas, mostrando que a resposta hematopoiética aos anti-inflamatórios não-esteroidais era suprimida pela sensibilização alérgica (Lintomen *et al.*, 2002). Recentemente, o mecanismo de ação destes dois agentes no sistema experimental estudado começou a ser esclarecido, mostrando-se que atuam indiretamente, ao promover a geração de cisteinil-leucotrienos na cultura (Xavier-Elsas *et al.*, 2008). Mais recentemente, o mesmo mecanismo foi demonstrado para os efeitos hematopoiéticos da eotaxina (Queto *et al.*, 2010b). As respostas à eotaxina em cultura de medula óssea murina também parecem sujeitas a uma imunorregulação, dependendo da cepa de camundongos estudada (Xavier-Elsas e Cardoso-de-Mendonça, dados não publicados). Como nossos resultados anteriores indicam que a provocação de animais sensibilizados está atuando por mecanismos glicocorticoide-dependentes para modular a eosinopoiese *in vivo* e *ex vivo*, torna-se importante avaliar se o envolvimento destes mecanismos glicocorticoide-dependentes inclui a regulação das respostas à eotaxina.

Para testar esta hipótese, analisamos a resposta à eotaxina, associada a IL-5, em cultura de medula óssea de camundongos BALB/c, sensibilizados à OVA e provocados com OVA ou com salina, e pré-tratados com RU486 ou veículo, antes da provocação por via respiratória.

Como mostrado na figura 4.9A, na ausência de pré-tratamento com RU486, a eotaxina aumenta significativamente a resposta à IL-5 em precursores eosinofílicos de animais sensibilizados mas não-provocados ($p < 0,003$), de forma semelhante ao descrito em camundongos não-sensibilizados (Queto *et al.*, 2010b). Como esperado, animais sensibilizados e provocados com OVA têm uma resposta significativamente aumentada à IL-5 na ausência de eotaxina ($p < 0,003$). Nestas condições, a adição de eotaxina às culturas provoca uma redução significativa (em vez de aumento) da resposta à IL-5, relativamente às culturas controle com IL-5

sozinha ($p < 0,05$). Este comportamento, observado como uma mudança no sentido da resposta à eotaxina em cultura, induzida pela provocação alérgica, demonstra a existência de uma imunorregulação da resposta a esta citocina.

Como mostrado na Figura 4.9B, na presença de um pré-tratamento com RU486, este fenômeno de imunorregulação é abolido. Como demonstrado anteriormente: o RU486 impede o aumento de resposta à IL-5 na medula óssea de camundongos sensibilizados e provocados com OVA; nestes animais, tratados com RU486 antes da provocação, está preservada uma capacidade de resposta significativa ($p < 0,05$ em comparação aos controles tratados com veículo, nas mesmas condições de cultura) à adição de eotaxina, que, como em animais não-sensibilizados (Queto *et al.*, 2010b), é uma resposta potencializadora, não inibitória.

Os resultados obtidos com os grupos de animais imunizados e sensibilizados com ovalbumina, mas provocados com salina, também são informativos, pois mostram que o pré-tratamento com RU486 não impede a célula de responder à eotaxina em cultura. Neste grupo, não foi encontrada qualquer supressão da eosinopoiese com a adição de eotaxina, da mesma forma que a supressão não é observada em culturas de animais normais.

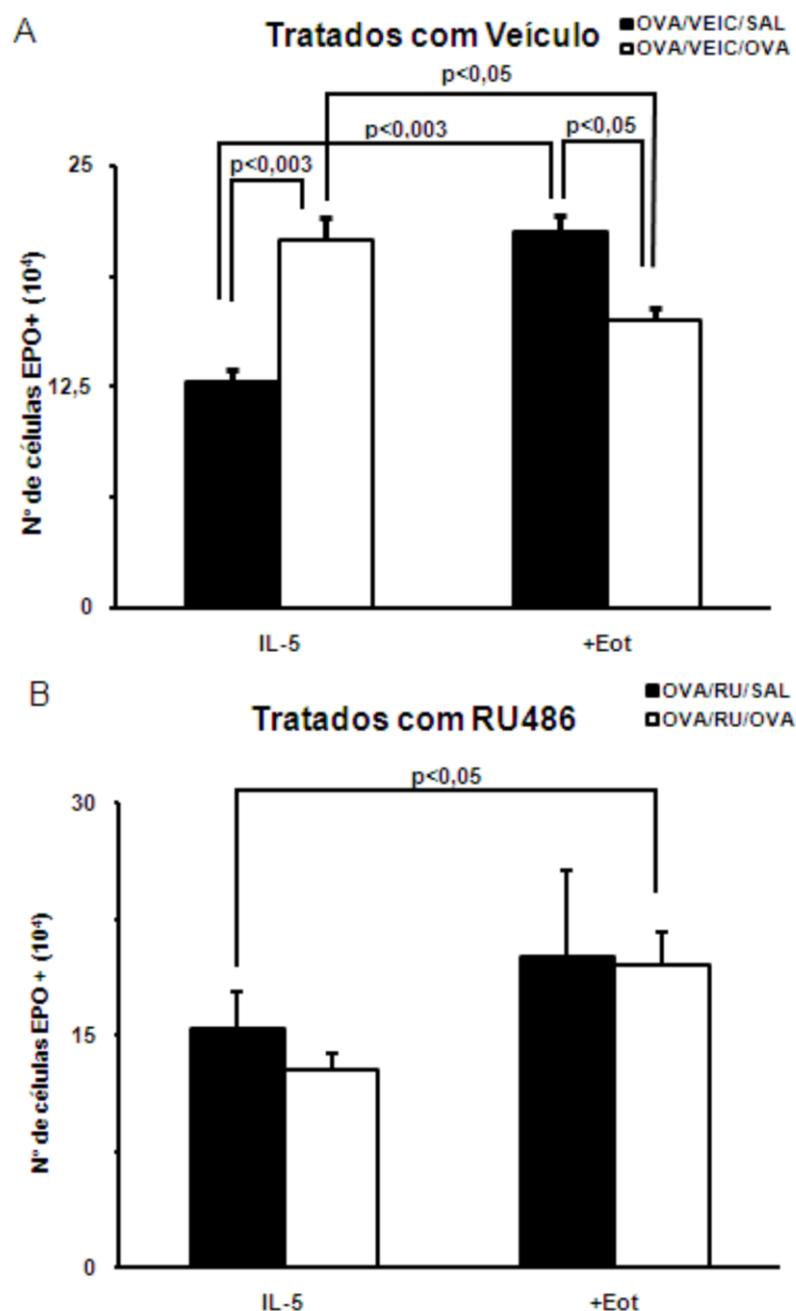


Figura 4.9 – Imunorregulação da resposta à eotaxina *ex vivo* em animais tratados com veículo ou RU486. Os dados são média \pm EPM do número de células EPO+ presentes após 7 dias em culturas estabelecidas na presença de IL-5 sozinha, ou em associação com Eotaxina (Eot) 1ng/ml, a partir da medula óssea de BALB/c imunizados com OVA, e provocados com salina (OVA/SAL) ou com ovalbumina (OVA/OVA), após pré-tratamento com veículo (VEIC) ou RU486 (RU), 2h antes da provocação. (n=3-4).

Em seguida, procuramos confirmar, por uma estratégia independente, o envolvimento de glicocorticóides endógenos neste efeito imunomodulador, utilizando o tratamento com metirapone, no protocolo de 1 provocação.

Analisamos a resposta à eotaxina associada a IL-5 em cultura de medula óssea de camundongos BALB/c, sensibilizados à OVA e provocados com OVA ou com salina, e pré-tratados com Metirapone ou veículo, antes da provocação por via respiratória. Como mostrado na figura 4.10A, na ausência de pré-tratamento com Metirapone, a eotaxina aumenta significativamente a resposta à IL-5 em precursores eosinofílicos de animais sensibilizados, mas não-provocados ($p < 0,006$). Como esperado, animais sensibilizados e provocados com OVA têm uma resposta significativamente aumentada à IL-5 na ausência de eotaxina ($p < 0,005$). Como mostrado anteriormente, nestas condições, a adição de eotaxina às culturas provoca uma redução significativa, em vez de aumento, da resposta à IL-5, relativamente às culturas controle com IL-5 sozinha ($p < 0,05$).

Como mostrado na Figura 4.10B, na presença de um pré-tratamento com Metirapone, este fenômeno de imunorregulação é abolido, da mesma forma como descrito acima para o tratamento com RU486. Como demonstrado anteriormente, o Metirapone impede o aumento de resposta à IL-5 na medula óssea de camundongos sensibilizados e provocados com OVA; o mesmo tratamento preserva uma capacidade de resposta significativa ($p < 0,04$) à adição de eotaxina.

Estas observações fornecem a primeira evidência experimental de que os hormônios de estresse da adrenal também regulam a resposta à eotaxina em eosinófilos em desenvolvimento. No conjunto, os resultados do nosso estudo sugerem que os hormônios adrenais são necessários para que a medula óssea responda adequadamente à IL-5 e também a outras citocinas que interagem com IL-5.

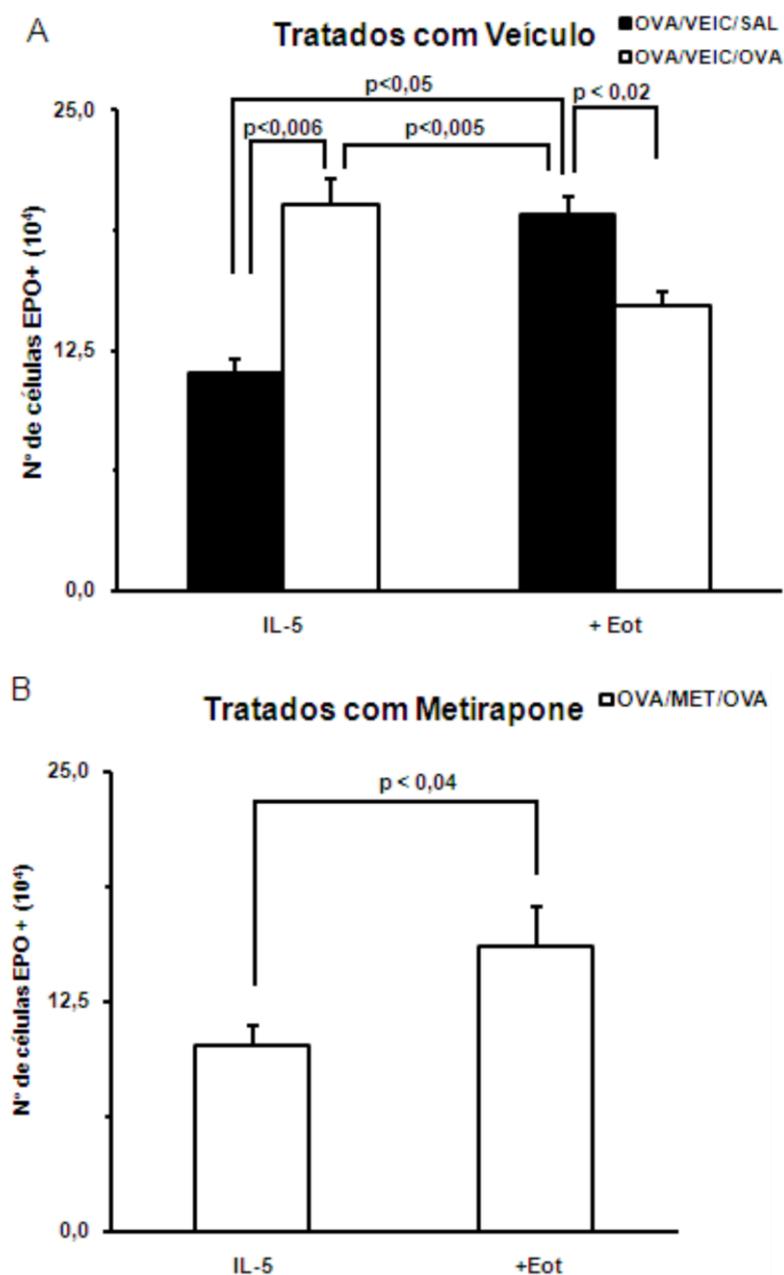


Figura 4.10 – Imunrregulação da resposta à eotaxina *ex vivo* em animais tratados com veículo ou Metirapone. Os dados são média \pm EPM do número de células EPO+ presentes após 7 dias em culturas estabelecidas na presença de IL-5 sozinha, ou em associação com Eotaxina (Eot) 1ng/ml, a partir da medula óssea de BALB/c imunizados com OVA, e provocados com salina (OVA/SAL) ou com ovalbumina (OVA/OVA), após pré-tratamento com veículo (VEIC) ou Metirapone (MET), 8 dias antes da provocação.

4.8 Impacto da deficiência no receptor de tipo I para TNF- α na modulação da eosinopoiese pela provocação alérgica

Diversos trabalhos da literatura científica recente mostram um papel de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , na estimulação do eixo HPA, levando a uma produção de glicocorticóides pela adrenal (Tsigos *et al.*, 2002; John, *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Himmerich *et al.*, 2006). Isto sugere a possibilidade de que o elo entre a provocação alérgica em animais sensibilizados e a resposta endócrina de estresse, em nosso modelo, seja uma citocina inflamatória.

Para examinar esta possibilidade, avaliamos se a ausência do receptor do TNF- α influenciaria a modulação da eosinopoiese *in vivo* pela provocação alérgica. Nesses experimentos, foram utilizados animais deficientes no receptor do tipo I de TNF- α (B6.129-Tnfrs1a) e seus controles de tipo selvagem, com o mesmo background genético (C57Bl/6), imunizados e provocados seguindo o protocolo 3.

Na figura 4.11, observa-se que os controles de tipo selvagem da cepa C57Bl/6 respondem à provocação da mesma maneira que os da cepa BALB/c, com um aumento significativo da eosinofilia na medula óssea *in vivo*, em comparação com os animais provocados com salina ($p < 0,001$). Em contraste, os animais deficientes do receptor de TNF- α não responderam à provocação da mesma forma, o que é compatível com a hipótese de que a liberação de TNF- α neste modelo é responsável pela ativação do eixo HPA (em comparação com os controles B6 O/O, $p < 0,001$). Na ausência de provocação, não houve diferença significativa entre as duas cepas, o que é compatível com um papel do TNF- α apenas na resposta à provocação, e não na eosinopoiese em condições basais.

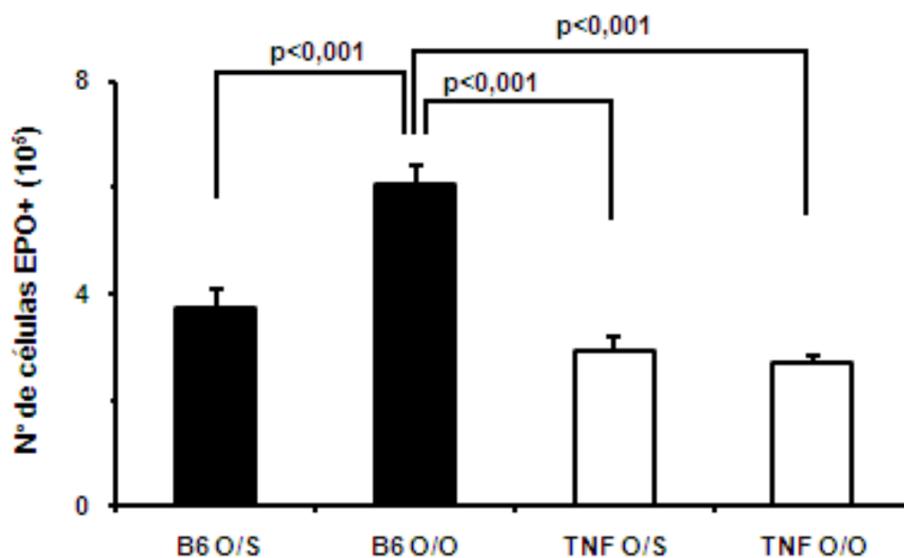


Figura 4.11 – Efeitos da provocação alérgica sobre a eosinopoiese em animais deficientes no receptor de TNF e em controles de tipo selvagem. Os dados são a média \pm EPM do número de células EPO+ na medula óssea coletada de controles de tipo selvagem C57Bl/6 (B6) e animais deficientes do receptor de TNF- α (TNF), imunizados com ovalbumina e provocados 1x com salina (O/S) ou com ovalbumina (O/O). (n=7-9).

5. *Discussão*

O presente estudo se insere numa linha de pesquisa desenvolvida ao longo dos anos em nosso laboratório, que visa a esclarecer os mecanismos pelos quais eventos sistêmicos, como a resposta à provocação alérgica em animais sensibilizados, o estresse cirúrgico ou a infecção influenciam os mecanismos celulares e moleculares da hematopoiese, que ocorre no ambiente confinado e definido da medula óssea dos ossos longos, em mamíferos adultos (Gurkan & Akkus, 2008).

Esta questão não é banal, porque a grande maioria dos estudos sobre hematopoiese na literatura têm privilegiado os aspectos locais da regulação da hematopoiese (Redig & Plataniias, 2007; Queto *et al.*, 2010b), mesmo sendo bem conhecida a capacidade de adaptação da medula óssea a situações de demanda aumentada, como por exemplo a hipóxia, a hemorragia, ou a infecção (Heissig *et al.*, 2007, 2009).

Aspectos locais da hematopoiese incluem, evidentemente, tanto as células-alvo que se diferenciam nas diferentes linhagens hematopoiéticas, como os fatores de crescimento e diferenciação linhagem-seletivos ou de atuação ampla, as células estromais e acessórias, a matriz extracelular que regula as interações entre células e também a mobilidade e forma das células hematopoiéticas, e uma série de agentes moduladores ou modificadores de todos esses componentes. A hematopoiese é afetada, no interior do compartimento medular, por citocinas liberadas no curso da resposta imune, por quimiocinas que mobilizam células diferenciadas ou influenciam sua diferenciação, e por drogas como os agentes citostáticos utilizados em quimioterapia do câncer, a radiação ionizante, vitaminas, hormônios, etc. (Han & Caen, 1994; Bociek & Armitage, 1996).

Apesar desta grande variedade de elementos a serem considerados em qualquer estudo de hematopoiese, muitos trabalhos da literatura se ocupam dos fatores intrínsecos à medula óssea de forma ainda mais restrita. Em alguns casos, estudos moleculares chegaram a mudar em pontos fundamentais o entendimento do

processo de hematopoiese. Merece destaque, neste particular, o trabalho pioneiro de Nishinakamura e colaboradores (1996), que descartou a possibilidade de fatores hematopoiéticos conhecidos de longa data, como o GM-CSF e a IL-3, desempenharem um papel importante na hematopoiese em condições basais (*steady state*). Este estudo, baseado na inativação do gene para a cadeia β comum aos receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5, em paralelo à inativação da cadeia β especializada que, no camundongo, interage exclusivamente com a cadeia α do receptor de IL-3, apresenta um forte argumento contra o envolvimento dessas citocinas em condições basais, e sugere que o seu papel é muito mais importante em condições de excepcionalidade – ou seja, de demanda aumentada, como o que caracteriza as situações listadas acima – do que na regulação fisiológica no dia a dia.

Em outras palavras, ao dissecar com ferramentas avançadas o processo de hematopoiese *in vivo*, Nishinakamura e cols. tornaram claro que este processo se passa em muitos níveis, e que podemos caracterizar uma regulação intrínseca, ou local, da hematopoiese, e uma regulação sistêmica, ou extramedular, esta última envolvendo citocinas liberadas no curso das respostas imunes fora da medula óssea, assim como produzidas fisiologicamente por diferentes tecidos extramedulares.

É importante ressaltar que, no estudo de Nishinakamura e cols., os eosinófilos representam de certo modo uma exceção, visto que sua produção foi significativamente reduzida pela inativação da cadeia β comum, de forma coerente com a ampla literatura que sustenta um papel central para a IL-5 na eosinopoiese, mesmo em condições basais.

A resposta de estresse, definida como a adaptação fisiológica do organismo a uma demanda aumentada, em função de mudanças no meio externo ou no meio interno, é parte integrante de uma extraordinária variedade de processos patológicos, incluindo as doenças alérgicas, o trauma cirúrgico e a infecção.

Nosso grupo, em duas das três condições mencionadas, já forneceu evidência direta de uma associação entre mecanismos relevantes para o estresse e

o processo de eosinopoiese, que é parte essencial das modificações crônicas observadas na asma, seja em pacientes, seja em modelos experimentais (Xavier-Elsas & Gaspar-Elsas, 2007):

a) evidenciamos (Gaspar-Elsas *et al.*, 2000a), que os glicocorticóides, sejam sintéticos (dexametasona), sejam naturais (corticosterona) potencializam a eosinopoiese em camundongos de várias cepas isogênicas, atuando tanto *ex vivo* como *in vitro*;

b) evidenciamos (Xavier-Elsas *et al.*, 2004) que os glicocorticóides adrenais (corticosterona) são responsáveis pela eosinofilia importante observada na medula óssea de camundongos submetidos a um estresse cirúrgico agudo.

Mais recentemente, o papel dos glicocorticóides na regulação da eosinopoiese foi confirmado e ampliado, quando demonstrado pelo nosso grupo que eles modificam de forma substancial as ações de outras substâncias de relevância fisiológica, como é o caso da prostaglandina E₂ (PGE₂), como se segue:

a) a dexametasona foi capaz de impedir a supressão da eosinopoiese pela PGE₂, que depende da indução de apoptose por um mecanismo dependente da isoforma indutível da NO sintase (iNOS) e do ligante para o receptor de morte, CD95 (CD95L) (Jones *et al.*, 2004);

b) a dexametasona, nestas condições, modifica as ações da PGE₂ de forma a convertê-la num fator promotor de amadurecimento (Gaspar-Elsas *et al.*, 2009);

O potencial dos glicocorticóides influenciarem a eosinopoiese através de efeitos sobre componentes bem caracterizados do micro-ambiente hematopoiético, como as proteínas de adesão, é igualmente evidenciado pelos efeitos da dexametasona sobre a expressão de integrina $\alpha 4$ em células da medula óssea (Gaspar-Elsas *et al.*, 2009). Neste particular, é de interesse que a dexametasona induz integrina $\alpha 4$ e que a PGE₂ suprime a expressão desta mesma proteína.

Cabe ainda lembrar que as ações farmacológicas desses agentes, reforçando ou suprimindo a expressão de integrina $\alpha 4$, têm efeitos sobre a maturação citológica dos eosinófilos em cultura que são reproduzidos pela

intervenção direta sobre mecanismos dependentes de integrina, utilizando anticorpos específicos e proteínas de fusão (Gaspar-Elsas et al., 2009).

Portanto, no momento em que nosso estudo foi iniciado, uma massa importante de dados gerados pelo nosso grupo já implicava os glicocorticóides na regulação da eosinopoiese em camundongos. Estes achados não eram isolados, nem em desacordo com a literatura, e sim parte de um conjunto mais amplo de evidências, obtidas por muitos grupos, que apontavam, por um lado, para um papel importante dos glicocorticóides na regulação da granulopoiese em geral (Ijichi *et al.*, 1989), e, pelo outro, na regulação da produção de IgE (Oettgen & Geha, 1999; Barnes, 2001).

Os achados do nosso grupo, junto com os de outros laboratórios (revisos em Gaspar Elsas *et al.*, 2000b), apontavam para um papel facilitador dos glicocorticóides no desenvolvimento de reações alérgicas, papel este que podia ser compreendido como resultante da estimulação de mecanismos Th2-dependentes (estímulo à produção de IgE, potencialização da resposta à IL-5) e da interferência com mecanismos Th1-dependentes (supressão de IL-12, com subsequente decréscimo da produção de IFN- γ). Os achados experimentais, neste caso, estavam em consonância com uma literatura extensa, que aponta para uma associação entre estresse e a propensão a desenvolver reações alérgicas.

No entanto, quando o estudo foi iniciado, faltava ainda uma evidência direta de que os glicocorticóides endógenos contribuam de forma essencial para as manifestações alérgicas num modelo experimental. Esta possibilidade era sugerida por estudos anteriores, visto que a estimulação das adrenais, num modelo de trauma, levava a uma importante eosinofilia da medula óssea (Xavier-Elsas *et al.*, 2004). Contudo, dois passos importantes precisariam ainda ser dados, antes que pudéssemos transpor esta observação para o domínio da alergia:

a) demonstrar que a retirada da sinalização por glicocorticóides impedia o desenvolvimento de eosinofilia em resposta à provocação em animais sensibilizados;

b) demonstrar que a provocação induzia ativação da produção de glicocorticóides pela adrenal, por um mecanismo imunoendócrino definido.

Embora nossos estudos anteriores tivessem abordado apenas o fenômeno da eosinopoiese, a literatura sobre o assunto já sugeria, além disso, a possibilidade de que outras manifestações do processo alérgico, especialmente aquelas observáveis nos pulmões, fossem afetadas pelo bloqueio da sinalização por glicocorticóides.

Os resultados do nosso estudo, que recapitularemos de forma sucinta, mostram que essas lacunas foram, em parte, preenchidas pelas nossas observações.

a) *Evidência de que o bloqueio adrenal impede o aumento da eosinopoiese em resposta à provocação.* Tanto a inibição dos receptores de glicocorticóides pelo seu antagonista, RU 486, quanto a inibição da produção dos glicocorticóides endógenos pelo tratamento com o inibidor da sua síntese, metirapone, impediram o aumento da resposta das células da medula óssea *in vivo* (dia zero) e *ex vivo* (cultura com IL-5) em animais alérgicos. O impacto destes dois tratamentos só foi significativo nos animais sensibilizados e provocados. Isto significa que os glicocorticóides adrenais só são relevantes, neste modelo, quando há provocação. Por outro lado, a excelente concordância entre os dois tratamentos, cujos mecanismos de ação são independentes e distintos, reforça a nossa interpretação de que o efeito final reflete o que há de comum entre estes dois procedimentos, ou seja, a interferência com a sinalização por glicocorticóides endógenos. É importante ressaltar a concordância entre os resultados *in vivo* e *ex vivo*, já observada no modelo de trauma cirúrgico (Xavier-Elsas *et al.*, 2004). Isto significa que observações feitas em cultura de medula óssea sobre as interações entre dexametasona e PGE₂ (Gaspar-Elsas *et al.*, 2009) podem ser relevantes para o papel dos glicocorticóides *in vivo*.

b) *Evidência de que a provocação estimula a liberação de glicocorticóides adrenais em animais sensibilizados.* Nosso estudo forneceu evidência direta de que a provocação em camundongos sensibilizados é um estímulo suficiente para induzir

aumento nos níveis circulantes de corticosterona. Esta observação é sustentada por medidas utilizando dois métodos diferentes (ELISA e radioimunoensaio), e é consistente com os efeitos observados para o RU486 e para o metirapone. Os níveis de corticosterona detectados foram comparáveis aos de um estudo já publicado (Xavier-Elsas *et al.*, 2004), e compatíveis com os da literatura sobre estresse em modelos experimentais no camundongo (Misdrahi *et al.*, 2005; Fomicheya *et al.*, 2010). Esta observação tem implicações potencialmente importantes, visto que a literatura sobre os efeitos imunológicos dos corticosteróides tem um viés a favor de uma visão desses agentes como predominantemente imunossupressores (Newton, 2000; Rhen & Cidlowski, 2005). Em particular, o conceito de que, num sistema fisiológico, os glicocorticóides endógenos sejam parte essencial dos mecanismos de hipersensibilidade pulmonar e extrapulmonar, é contrário a esta visão predominante. No entanto, muitas evidências indicam que os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides dependem da sua concentração, assim como da duração de sua presença em níveis elevados (Gaspar-Elsas *et al.*, 2000b). Nossos estudos anteriores mostraram que os efeitos potencializadores da dexametasona eram fortemente dependentes da sua concentração (Gaspar-Elsas *et al.*, 2000a) e do momento da exposição (Gaspar-Elsas *et al.*, 2000a, 2009). Níveis elevados de dexametasona não eram estimulatórios, mas níveis mais baixos tinham um claro efeito potencializador sobre a eosinopoiese. A corticosterona, hormônio de estresse no camundongo, compartilhava as ações estimulatórias da dexametasona. A interpretação mais simples é que níveis de estresse do glicocorticóide adrenal, que não são necessariamente imunossupressores, e níveis relativamente baixos do glicocorticóide sintético, que podem ser anti-inflamatórios em vários modelos, mas não necessariamente imunossupressores, estimulam a eosinopoiese. Havendo a geração *in vivo* de corticosterona dentro da faixa de concentrações relevante, este efeito poderia ser evidenciado *in vivo*, da mesma forma que já foi evidenciado *in vitro* (Gaspar-Elsas *et al.*, 2000a).

c) Caracterização de um mecanismo imunoendócrino. Não é suficiente descrever uma associação entre níveis mais elevados de corticosterona e a ocorrência de provocação para comprovar um mecanismo imunoendócrino. Neste sentido, um primeiro passo foi dado por nossos experimentos utilizando animais

deficientes no receptor de tipo I para TNF- α . Estes se revelaram refratários aos efeitos estimulatórios da provocação sobre a eosinopoiese *in vivo*, enquanto os controles de tipo selvagem, de mesmo background genético, se comportaram de forma comparável aos camundongos BALB/c. Isto é o que seria esperado se o TNF- α fosse o mediador imunoendócrino responsável pela ativação do eixo HPA em nosso modelo. Várias razões sustentam esta interpretação: o TNF- α é uma citocina inflamatória liberada como parte da relação inflamatória em muitos sistemas experimentais diferentes; sua liberação ocorre em fases precoces da agressão, e contribui de forma importante para o processo de infiltração do tecido por leucócitos circulantes (Majno & Joris, 2004); o TNF- α liberado têm efeitos sistêmicos, incluindo a possibilidade de agir como pirogênio e indutor da reação de fase aguda, e um dos seus efeitos mais importantes é sobre o sistema endócrino (Tsigos *et al.*, 2002; John, *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Himmerich *et al.*, 2006), ativando o eixo HPA. Nossos experimentos ainda não fizeram uma demonstração direta de que este é o papel desempenhado pelos receptores de tipo I para TNF no nosso modelo, em parte porque os experimentos necessários são laboriosos e envolvem o monitoramento dos níveis de hormônios (corticosterona, mas também CRH e ACTH) na circulação, paralelamente ao estudo das respostas da medula óssea, tanto à provocação em si, como ao tratamento sistêmico com anticorpos neutralizantes anti-TNF. Idealmente, deveria ser possível demonstrar que animais deficientes no receptor, ou tratados com anti-TNF, não apresentam níveis de corticosterona elevados após a provocação. Deve ser igualmente possível demonstrar que o plasma dos animais deficientes (mas não dos animais expostos ao anti-TNF), após a provocação, contém substâncias capazes de transferir a recipientes de tipo selvagem, com o mesmo background genético, as alterações características da medula óssea de que se seguem à provocação (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997), e que esta transferência seria tornada ineficaz por tratamentos dirigidos aos hormônios relevantes (CRH, ACTH, TNF). Cabe lembrar que protocolos deste tipo já foram utilizados com sucesso, anteriormente, para avaliar o papel da IL-5 nos efeitos da provocação (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997). Utilizando o modelo de trauma cirúrgico, nosso grupo já obteve evidência de que a transferência de plasma de animais na fase aguda do estresse para recipientes singênicos normais é suficiente para reproduzir os efeitos do trauma, e que os efeitos da transferência de plasma são

bloqueados pelo RU486 (dados não publicados). Interessantes como possam ser, estes experimentos, pela sua complexidade e duração, são difíceis de conduzir no tempo limitado disponível para a realização de um Mestrado, e por esta razão foram deixados para fases subseqüentes do andamento do projeto.

Um dos aspectos do nosso estudo que merecem uma discussão mais detalhada, pela sua originalidade frente à literatura, diz respeito ao impacto dos tratamentos utilizados por nós, sobre os pulmões, e sua possível relação com a presença de eosinófilos infiltrantes. Em resumo, nós evidenciamos:

a) *um efeito significativo da provocação única sobre os pulmões, mesmo na ausência de uma inflamação eosinofílica*: especificamente, a provocação única aumentou consideravelmente a presença de células produtoras de muco nas vias aéreas de camundongos sensibilizados, sem associação com infiltração inflamatória apreciável, seja neutrofílica, seja eosinofílica. O mecanismo envolvido não foi por nós investigado, mas está claro que a infiltração eosinofílica dos pulmões não pode ser responsabilizada pela alteração nas células produtoras de muco. Cabe lembrar que outros estudos apontaram para um importante efeito da IL-13 sobre as células produtoras de muco no pulmão (Wills-Karp *et al.*, 1998; Grünig *et al.*, 1998; Vargaftig & Singer, 2003). IL-13, uma citocina Th2, é liberada em várias fases das reações alérgicas, inclusive no pulmão, e poderia, em princípio, explicar este fenômeno. Esta observação tem implicações teóricas importantes, porque indica que a provocação única já teve um efeito notável sobre o pulmão, numa fase em que a infiltração eosinofílica ainda é indetectável. Em outras palavras, existem indicadores de resposta à provocação bem mais sensíveis do que o desenvolvimento de uma inflamação eosinofílica, a saber: a modulação da eosinopoiese na medula óssea (plenamente estabelecida com uma provocação única; ver comparação entre os protocolos 1x e 3x), e a estimulação da produção de muco.

b) *um efeito significativo da provocação sobre o número de eosinófilos recuperados no BAL*: especificamente, tanto a provocação única como a provocação repetida levaram à acumulação de eosinófilos no BAL, que foi significativamente maior em resposta à provocação repetida. Os eosinófilos representaram apenas uma fração de todas as células presentes no BAL, e macrófagos alveolares, que

representam a grande maioria das células, assim como uma pequena fração de neutrófilos, também foram encontrados. Enquanto a presença de eosinófilos foi claramente associada com a provocação, e a provocação repetida teve efeito significativamente maior sobre este parâmetro, o mesmo não foi verificado para macrófagos ou neutrófilos.

c) *um efeito significativo do RU486 sobre as populações leucocitárias no BAL*: o tratamento com RU486 bloqueou a acumulação de eosinófilos no BAL em animais submetidos à provocação, tanto única como repetida. Este dado é do maior interesse, visto que sugere que os glicocorticóides endógenos são necessários não apenas para a estimulação da eosinopoiese em animais sensibilizados, mas também para a migração dos eosinófilos já maduros para os sítios inflamatórios. Esta observação deverá ser aprofundada em experimentos futuros, para confirmar por outros meios que, efetivamente, este é o caso. É importante ressaltar que os eosinófilos foram o único tipo leucocitário cuja acumulação foi dependente da provocação. Contudo, os macrófagos, que fazem parte da população residente, e que não aumentaram com a provocação, também foram sensíveis ao tratamento com RU486, mas com um padrão de resposta distinto. Nos animais submetidos à provocação única, o tratamento com RU486 aumentou significativamente o número de células totais do BAL, ou seja, atuou no sentido contrário ao observado com os eosinófilos. Isto se explica pelo aumento na população de macrófagos, que é a grande maioria das células presentes, e cujos números aumentaram, em vez de diminuir, após o tratamento pelo RU486. É interessante notar, neste aspecto, que números significativos de eosinófilos alcançam o compartimento alveolar nos animais provocados uma única vez, em contraste com a sua virtual ausência em camundongos naive. Isso se passa sem que um infiltrado importante tenha se formado no parênquima dos mesmos animais, mostrando que a presença de infiltrados em cortes histológicos pode ser menos sensível do que outros indicadores, como o número de eosinófilos que efetivamente passam para o BAL. Esta discrepância tem sido observada em outros estudos. Por exemplo, os pulmões de camundongos transgênicos para IL-5 podem conter números importantes de eosinófilos no parênquima (Dent *et al.*, 1990), sem que seja observada uma acumulação dos mesmos no BAL, o que sugere que a IL-5 promove a passagem

dos eosinófilos para o compartimento bronco-alveolar, um efeito que pode ser mais relevante, do ponto fisiopatológico, do que a simples infiltração.

d) *um efeito significativo dos tratamentos com RU486 e metirapone sobre as alterações da mecânica pulmonar induzidas pela provocação*: Um dos achados mais originais e inesperados deste estudo foi o impacto dos dois tratamentos utilizados sobre o aumento de resistência das vias aéreas induzido pela provocação alérgica. RU486 e metirapone aboliram o aumento de resistência de vias aéreas que se segue à provocação dos animais sensibilizados. Da mesma forma que observado para seus efeitos sobre a linhagem eosinofílica, este efeito das duas drogas só foi observado em animais provocados. O mecanismo envolvido, no entanto, ainda está por esclarecer. Não é possível, no momento, estabelecer um vínculo entre este efeito e a redução da inflamação eosinofílica nos pulmões, visto que não dispomos ainda de informação sobre o grau de infiltração dos pulmões induzido em nossos animais pela provocação repetida. Em outros estudos do laboratório, animais provocados repetidamente apresentam importantes infiltrados no parênquima, mas estes consistem predominantemente de neutrófilos, com uma fração significativa de eosinófilos (Queto et al., 2010a). A literatura recente tende a rejeitar a associação, outrora muito em voga, entre inflamação eosinofílica e alterações da mecânica pulmonar (Lee *et al*, 2004; Humbles *et al*, 2004.), e nem os dados do presente estudo, nem outros recentemente publicados pelo nosso grupo (Queto et al., 2010a), se prestam a sustentar esta associação. Seja qual for o mecanismo, o dado é potencialmente de grande interesse para os que trabalham nesta área, visto que mostra um vínculo, até aqui desconhecido, entre os hormônios de estresse e a disfunção respiratória na asma experimental.

Em conjunto, nossos resultados apontam para uma contribuição essencial dos glicocorticóides endógenos para a inflamação pulmonar alérgica, incluindo as alterações de função pulmonar que costumam acompanhá-la.

Finalmente, os estudos descritos aqui abrem uma nova perspectiva sobre um problema inteiramente diferente, e de grande interesse para o nosso grupo, ou seja, o mecanismo da imunorregulação de respostas da medula óssea a drogas e citocinas. Este fenômeno, descrito inicialmente por Lintomen *et al*. (2002), no

contexto das respostas em cultura à indometacina e à aspirina, hoje se aplica a um conjunto de mediadores inflamatórios e citocinas, incluindo os cisteinil-leucotrienos, a eotaxina e a IL-13. Nossos estudos recentes indicam que todos os agentes sujeitos a esta imunorregulação têm em comum a atuação indireta, por intermédio dos receptores de tipo I para cisteinil-leucotrieno (Xavier-Elsas *et al.*, 2008; Queto *et al.*, 2010b). A imunorregulação, no entanto, não pode ser facilmente explicada por uma perda de sensibilidade generalizada a esses mediadores ou aos agentes que os utilizam para regular a medula óssea. De fato, enquanto no caso da indometacina e da aspirina ocorre uma aparente dessensibilização (Lintomen *et al.*, 2002), no caso dos cisteinil-leucotrienos e da eotaxina a imunorregulação pode resultar tanto numa dessensibilização das respostas dissimulatórias como no surgimento de respostas inibitórias, como evidenciado no presente estudo para a eotaxina. O efeito estimulatório, quando presente, pode ser reproduzivelmente antagonizado pelo montelukast e pelo MK571, que são antagonistas dos receptores de tipo I para cisteinil-leucotrienos (Queto *et al.*, 2010b). Da mesma forma, não há resposta potencializadora em culturas de medula óssea de animais deficientes no receptor do tipo I, em contraste com a resposta, que é aparentemente normal, em animais deficientes no receptor de tipo II. Portanto, os receptores envolvidos na resposta supressora induzida pela eotaxina ou pelo LTD4 em cultura de medula óssea ainda permanecem desconhecidos.

A informação nova – e importante – que o presente estudo traz a respeito é que, seja qual for o receptor envolvido nesta resposta supressora, o seu surgimento é impedido pelo pré-tratamento com RU486 e com metirapone. Esta informação tem valor prático, porque nos permite caracterizar melhor o receptor de interesse com base na sensibilidade da sua expressão ou ativação ao bloqueio dos glicocorticóides endógenos. Por outro lado, a observação mostra até que ponto os glicocorticóides endógenos exercem ações complexas num modelo experimental de asma, visto que regulam a sensibilidade da medula óssea a uma citocina envolvida na diferenciação e na mobilização de eosinófilos, e importante em vários níveis da reação alérgica.

Em conjunto, nossos dados indicam uma contribuição dos glicocorticóides endógenos, produzidos em consequência da provocação alérgica, para as modificações observadas em cultura de medula óssea, do ponto de vista da

capacidade de resposta, tanto a IL-5 sozinha como à eotaxina na presença de IL-5. Tais observações reforçam o interesse de caracterizar melhor os mecanismos imunoendócrinos pelos quais a ativação do eixo HPA regula a linhagem eosinofílica *in vivo* e a inflamação alérgica rica em eosinófilos, característica da asma experimental.

6. Conclusões

1. Os glicocorticóides endógenos regulam a eosinopoiese num modelo de asma alérgica, como evidenciado pelas seguintes observações:
 - O tratamento com RU486 aboliu o efeito da provocação sobre a eosinopoiese *in vivo* e *ex vivo*, em protocolos de provocação única e repetida.
 - O tratamento com metirapone teve efeitos idênticos aos do RU486 sobre a eosinopoiese *in vivo* e *ex vivo*, nos mesmos modelos.
 - Os níveis de corticosterona circulantes foram especificamente aumentados pela provocação alérgica em animais sensibilizados, e este aumento foi bloqueado pelo metirapone, mas não pelo RU486.
2. Os glicocorticóides endógenos desempenham papéis importantes nas alterações do pulmão induzidas pela provocação alérgica em animais sensibilizados, como evidenciado pelas seguintes observações:
 - A provocação alérgica induziu acumulação de eosinófilos no fluido de lavagem bronco-alveolar, em protocolos de provocação única e repetida, e esta acumulação foi totalmente bloqueada pelo RU486.
 - A provocação alérgica induziu aumento na resistência de vias aéreas, em protocolo de provocação repetida, e esta alteração funcional foi totalmente bloqueada pelo RU486 e pelo metirapone.
3. Os efeitos dos glicocorticóides endógenos devem ser entendidos como resultado da sua interação com outros mediadores da inflamação, e especialmente citocinas, como o TNF- α e a eotaxina, como evidenciado pelas seguintes observações:
 - A ausência do receptor do TNF- α impede a modulação da resposta das células da medula óssea em resposta à provocação alérgica.

- A regulação das respostas à eotaxina pela provocação alérgica foi impedida pelo RU486 e pelo metirapone.

7. Bibliografía

Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7104–7108, 1993.

Baker C, Richards LJ, Dayan CM, Jessop DS. Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *J Neuroendocrinol.* 15, 1070–1074, 2003.

Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and atopy *The Journal of Clinical Investigation.* 107, 265-266, 2001.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL *et al.* The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 8, 319, 218-45, 1992.

Blatta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids Inhibit IL-12 Production in Human Monocytes and Enhance Their Capacity to Induce IL-4 Synthesis in CD4+ Lymphocytes. *The journal of Immunology.* 158, 5589-5595, 1997.

Bociek RG & Armitage JO. Hematopoietic Growth Factors. *CA Cancer J Clin,* 46, 165-184, 1996.

Braman SS. The global burden of asthma. *Chest.* 130, 4S-12S, 2006.

Brouxhon SM, Prasad AV, Joseph SA, Felten DL, Bellinger DL. Localization of corticotropin-releasing factor in primary and secondary lymphoid organs of the rat. *Brain Behav. Immun.* 12, 107–122, 1998.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman: Basic & Clinical Pharmacology.* 10th Ed, Capítulo 39, 2007.

Büttner C, Lun A, Splettstoesser T, Kunkel G, Renz H. Monoclonal anti-interleukin-5 treatment suppresses eosinophil but not T-cell functions. *Eur Respir J,* 21, 799-803, 2003.

Chen E, Miller GE. Stress and Inflammation in Exacerbations of Asthma. *Brain Behav Immun.* 21, 993–999, 2007.

DeKruyff RH, Fang Y, Umetsu DT. Corticosteroids Enhance the Capacity of Macrophages to Induce Th2 Cytokine Synthesis in CD4⁺ Lymphocytes by Inhibiting IL-12 Production. *The Journal of Immunology.* 160, 2231–2237, 1998.

Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*, 172, 1425-31, 1990.

Ekman R, Servenius B, Castro MG, Lowry PJ, Cederlund, AS, Bergman O *et al.* Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 44, 7–14, 1993.

Elsas PX, Paula Neto HA, Cheraim AB, Magalhães ESS, Accioly MTS, Carvalho VF, *et al.* Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology*. 143, 541–548, 2004.

Fanta, CH. Asthma. *The New England Journal of Medicine*. 360, 1002-1014, 2009.

Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GKK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of Cytokines in Murine Allergic Airway Disease and Human Asthma. *J Immunol*. 184,1663-1674, 2010.

Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's Role Remains Uncertain as Anti-Interleukin-5 only Partially Depletes Numbers in Asthmatic Airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 167, 199–204, 2003.

Fomicheya EE, Filatenkova TA, Shanin SN, Rybakina EG. Stress-Induced Changes in the Functional Activity of the Neuroendocrine System: The Modulatory Activity of Derinat. *NeurosciBehav Physiol*. 40, 397-401, 2010.

Fonseca BPF, Olsen PC, Coelho LP, Ferreira TPT, Souza HS, Martins MA, *et al.* NFAT1 transcription factor regulates pulmonary allergic inflammation and airway responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 40, 66-75, 2009.

Foster PS, Hogan SP, Yang M, Mattes J, Young IG, Matthaei KI *et al.* Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *TRENDS in Molecular Medicine*. 8, 162-167, 2002.

Gaspar Elsas MIC, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid Increase in Bone-marrow Eosinophil Production and Responses to Eosinopoietic Interleukins Triggered by Intranasal Allergen Challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 17, 404–413, 1997.

Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Joseph D, Alves L, Topilko A, Vargaftig BB, *et al.* Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice. *British Journal of Pharmacology*. 129, 1543-1552, 2000a.

Gaspar-Elsas MI, Queto T, Vasconcelos Z, Jones CP, Lannes-Vieiraz J, Xavier-Elsas P. Evidence for a regulatory role of $\alpha 4$ – integrins in the maturation of eosinophils generated from the bone marrow in the presence of dexamethasone. *Clinical & Experimental Allergy*. 39, 1187–1198, 2009.

Gaspar Elsas MI, Maximiano ES, Joseph D, Bonomo A, Vargaftig BB, Elsas PX. Isolation and Characterization of Hemopoietic Cells From Lungs of Allergic Mice *Chest*, 123, 345S-346S. 2003.

Gaspar Elsas MIC, Vargaftig BB, Elsas PX. Do glucocorticoids enhance eosinopoiesis? *Trends Pharmacol Sci.*, 21, 417-420. 2000b.

Gauvreau GM, Ellis AK, Denburg JA. Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clinical & Experimental Allergy*. 39, 1297–1306, 2009.

Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F., Rennick, DM, *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*, 282, 2261–2263, 1998.

Gurkan UA & Akkus O. The Mechanical Environment of Bone Marrow: A Review. *Annals of Biomedical Engineering*, 36, 1978–1991, 2008.

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of Asthma. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 489–507, 2009.

Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *TRENDS in Immunology*. 23, 403-408, 2002.

Han ZC, Caen JP. Cytokines acting on committed haematopoietic Progenitors. *Baillière's Clinical Haematology*, 7, 65-89, 1994.

Heissig B, Lund LR, Akiyama H, Ohki M, Morita Y, Romer J *et al.* The Plasminogen Fibrinolytic Pathway Is Required for Hematopoietic Regeneration. *Cell Stem Cell*. 1, 658–670, 2007.

Heissig B, Ohki M, Ishihara M, Tashiro Y, Nishida C, Gritli I *et al.* Contribution of the fibrinolytic pathway to hematopoietic regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 221, 521–525, 2009.

Himmerich H, Binder EB, Künzel HE, Schuld A, Lucae S, Uhr M, *et al.* Successful Antidepressant Therapy Restores the Disturbed Interplay Between TNF- α System and HPA Axis. *Biol Psychiatry*. 60, 882-888, 2006.

Huber SA, Sartini D, Roles of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and the p55 TNF Receptor in CD1d Induction and Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *J Virol*. 79 2659-2665, 2005.

Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death and Differentiation*. 14, 1851–1859, 2007.

Humbles A A, Lloyd C M, McMillan S J, Friend D S, Xanthou G, McKenna E E *et al.* A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *Science* 305, 1776-1779, 2004.

Ijichi S, Eiraku N, Osame M, Izumo S, Kubota R, Maruyama I, *et al.* *In vitro* modulation of lymphocyte proliferation by prednisolone and interferon- α in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *Journal of Neuroimmunology*, 23, 175-178, 1989.

Iwasaki H, Mizuno S, Mayfield R, Shigematsu H, Arinobu Y, Seed B, *et al.* Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med*. 201, 1891–1897, 2005.

John CD, Buckingham. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Current Opinion in Pharmacology*, 3, 78-84, 2003.

Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J, Vargaftig BB, Gaspar Elsas MI, Elsas PX. Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide and CD95-dependent pathway. *Nitric Oxide*. 11, 184-193. 2004.

Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends in Immunology*. 25, 477-482. 2004.

Kennedy AR, Todd JF, Dhillo WS, Seal LJ, Ghatei MA, O'Toole CP *et al.* Effect of direct injection of melanin-concentrating hormone into the paraventricular nucleus: further evidence for a stimulatory role in the adrenal axis via SLC-1. *J Neuroendocrinol*. 15, 268–272, 2003.

Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, LS MJ. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocrine Reviews*. 19, 269–301 1998.

Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*. 9, 787–793, 2009.

Leckie MJ, Brinke AT, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM *et al.* Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 356, 2144–2148, 2000).

Lee DK, Haggart K, Robb FM, Lipworth BJ. Montelukast protects against nasal lysine-aspirin challenge in patients with aspirin-induced asthma. *Eur Respir J*. 24, 226-230, 2004.

Lintomen L, Elsas MI, Maximiano ES, Paula-Neto HA; Joseph D, Vargaftig BB, *et al.* Allergenic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclooxygenase inhibitors in mice. *British Journal of Pharmacology*, 135, 1315-1323, 2002.

Liu LY, Coe CL, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Busse WW. School Examinations Enhance Airway Inflammation to Antigen Challenge. *Am J Respir Crit Care Med*, 165, 1062–1067, 2002.

Lyman SD, Jacobsen SE. *c-kit* Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood*. 91, 1101-1134 1998.

Majno G, Joris I. *Cells, tissues and disease. Principles of General Pathology*. 2nd. Ed. Oxford University Press, New York and Oxford, 2004.

Maruyama, S, Minagawa M, Shimizu T, Oya H, Yamamoto S, Musha N, *et al*. Administration of Glucocorticoids Markedly Increases the Numbers of Granulocytes and Extrathymic T Cells in the Bone Marrow. *Cell. Immunol*. 194: 28–35, 1999.

Maximiano ES, Elsas PX, de Mendonça Sales SC, Jones CP, Joseph D, Vargaftig BB *et al*. Cells isolated from bone-marrow and lungs of allergic BALB/C mice and cultured in the presence of IL-5 are respectively resistant and susceptible to apoptosis induced by dexamethasone. *Int Immunopharmacol*. 5, 857-70, 2005.

McInnes KJ, Kenyon CJ, Chapman KE, Livingstone DEW, Macdonald LJ, Walker BR, Andrew R. 5 α -Reduced Glucocorticoids, Novel Endogenous Activators of the Glucocorticoid Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 22908–22912, 2004.

Menzies-Gow A, Flood-Page P, Sehmi R, Burman J, Hamid Q, Robinson DS *et al*. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 714-719, 2003.

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

Misdrahi D, Pardon MC, Pérez-Diaz F, Hanoun N, Cohen-Salmon C. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: Implications for postpartum depressive disorders. *Psychiatry Research*. 137 123– 130, 2005.

Müller M B, Holsboer F, Keck M E. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: Novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides*. 36, 117-131, 2002.

Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 55, 603-61, 2000.

Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ, Tybulewicz VLJ, Murray R. Hematopoiesis in Mice Lacking the Entire Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor/Interleukin-3/Interleukin-5 Functions. *Blood*. 88, 2458-2464, 1996:

O'Brien SM, Scott LV, Dinan TG. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 19, 397-403, 2004.

Oettgen HC, Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *The Journal of Clinical Investigation*. 104, 829-835, 1999.

Orihara K, Morita H, Yagami A, Kajiwara N, Nakae S, Matsumoto K *et al.* TH2 cytokines potently induce an appetitestimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 612-4, 614.e1-2, 2009.

Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*. 24, 444-448, 2003.

Pichavant M, Goya S, Hamelmann E, Gelfand EW, Umetsu DT. Animal Models of Airway Sensitization. *Current Protocols in Immunology*. 79, 1-15, 2007.

Phipps S, Flood-Page P, Menzies-Gow A, Ong YE, Kay AB. Intravenous Anti-IL-5 Monoclonal Antibody Reduces Eosinophils and Tenascin Deposition in Allergen-Challenged Human Atopic Skin. *J Invest Dermatol*. 122:1406 –1412, 2004.

Purton LE, Scadden DT. Limiting Factors in Murine Hematopoietic Stem Cell Assays. *Cell Stem Cell*, 1, 263-270, 2007.

Queto T. 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 de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz. 2007.

Queto T, Xavier-Elsas P, Gardel MA, De Luca B, Barradas M, Masid D, *et al.* Inducible nitric oxide synthase/CD95L-dependente suppression of pulmonary and bone marrow eosinophilia by diethylcarbamazine. *Am J Respir Crit Care Med*. 181, 429-37, 2010a.

Queto T, Gaspar-Elsas MI, Masid-de-Brito D, Vasconcelos ZFM, Ferraris FK, Penido C, *et al.* Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow. *Journal of Leukocyte Biology*. 87, 885-93, 2010b.

Radinger M, Lötvall J, Eosinophil progenitors in allergy and asthma — Do they matter? *Pharmacology & Therapeutics*. 121, 174–184, 2009.

Redig AJ & Plataniias LC. The protein kinase C (PKC) family of proteins in cytokine signaling in hematopoiesis. *J Interferon Cytokine Res.*, 27, 623-36, 2007.

Rhen T, Cidlowski JA. Mechanisms of Disease: Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. *The New England Journal of Medicine*. 353, 1711-1723, 2005.

Rook GAW. Glucocorticoids and immune function. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 13, 567±581, 1999.

Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu. Rev. Immunol*. 24, 147–74, 2006.

Segerstrom SC, Miller GE. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychol Bull.* 130, 601–630, 2004.

Smith C. Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis. *Cancer Control.* 10, 9-16, 2003.

Smith DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL *et al.* Melanin-Concentrating Hormone-1 Receptor Modulates Neuroendocrine, Behavioral, and Corticolimbic Neurochemical Stress Responses in Mice. *Neuropsychopharmacology.* 31, 1135–1145, 2006.

Strek ME. Difficult Asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 3, 116–123, 2006.

Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP, Gleich GJ. Molecular cloning of human eosinophil peroxidase: evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.*, 169, 1757-1769, 1989.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research;* 53, 865–871, 2002.

Vargaftig BB, Singer M. Leukotrienes mediate murine bronchopulmonary hyperreactivity, inflammation, and part of mucosal metaplasia and tissue injury induced by recombinant murine interleukin-13. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 410–419, 2003.

Veres TZ, Rochlitzer S, Braun A. The role of neuro-immune cross-talk in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacology & Therapeutics.* 122, 203–214, 2009.

Xavier-Elsas P, Santos-Maximiano E, Queto T, Medonça-Sales S, Joseph D, Gaspar-Elsas MI *et al.* Ectopic lung transplantation induces the accumulation of eosinophil progenitors in the recipients' lungs through an allergen- and interleukin-5-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.* 37, 29-38, 2007.

Xavier-Elsas P, Gaspar-Elsas. Eosinophilopoiesis at the Cross-Roads of Research on Development, Immunity and Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry,* 14, 1925-1939, 2007.

Xavier-Elsas P, Queto T, Mendonça-Sales SC, Elsas MIG, Kanaoka Y, Lam BK. Cysteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures. *British Journal of Pharmacology,* 153, 528-535, 2008.

Wilbert-Lampen U, Straube F, Trapp A, Deutschmann A, Plasse A, Steinbeck G. Effects of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) on Monocyte Function, Mediated by CRH-Receptor Subtype R1 and R2 A Potential Link Between Mood Disorders and Endothelial Dysfunction? *J Cardiovasc Pharmacol.* 47, 110–116, 2006.

Wilckens T. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *TIPS*. 16, 193-197, 1995.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 282, 2258–2261, 1998.

Zabeau L, Gevaert P, Bachert C, Tavernier J, Interleukin-5, eosinophilic diseases and therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2, 319-28, 2003.

Zieg G, Lack G, Harbeck RJ, Gelfand EW, Leung DYM. *In vivo* effects of glucocorticoids on IgE production. *J Allergy Clin Immunol*. 94, 222-30, 1994.

Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allerg Clin Immunol*. 111, 227-242, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)