

ALESANDRA CÔRTE REIS

**Estudo dos mecanismos envolvidos na resolução da resposta
inflamatória alérgica em camundongos induzida por espécies
reativas de oxigênio (ROS)**

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2015

ALESANDRA CÔRTE REIS

**Estudo dos mecanismos envolvidos na resolução da resposta
inflamatória alérgica em camundongos induzida por espécies
reativas de oxigênio (ROS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dra. Vanessa Pinho da Silva

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2015

Dedico este trabalho a minha família e ao meu amor Glauberth, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.

Em especial à minha grande amiga Camila de Oliveira Guedes (in memorian) que me incentivou a procurar iniciação científica na UFMG. A última frase que ouvi de você diz tudo nesse momento: _ Pirua, obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por nunca ter me deixado nos momentos difíceis e por me permitir realizar mais esse sonho. A professora Vanessa Pinho da Silva por ter me acolhido com tanto carinho em seu laboratório, por seus grandes ensinamentos, por sua amizade e compreensão. Ao professor Mauro Martins Teixeira, que me deu a oportunidade de fazer parte do grupo Imunofarmacologia, por suas contribuições em meu projeto e pela disponibilidade de recursos oferecidos no laboratório, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos resolutivos (Xu, Yssa, Fê, Pedro), sempre presentes em todos os momentos da minha vida, agradeço pela disponibilidade, pela companhia e pela dedicação. Vocês fizeram do local de trabalho um ambiente de muita alegria!

A todos os professores do grupo Imunofarmacologia pela disponibilidade e por suas valiosas considerações em meu trabalho. Aos amigos do NEI, do Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória e ao grupo Imunofarmacologia, muito obrigada pela ótima convivência e por tudo que aprendemos juntos.

Ao professor Marco Aurélio Martins e seus alunos Tatiana, Ana Carolina, Daiana e Diego, que me receberam com tanto carinho na Fiocruz, obrigada, pois fizemos um excelente trabalho!

Aos meus amados pais, Antonio e Sonia, meus irmãos, Eliene e Eder, e ao meu amor, Glauberth, agradeço pela enorme paciência em meus momentos de estresse, pelo incentivo à minha carreira e por tanto amor. Minhas conquistas são o fruto do amor e confiança que vocês sempre depositaram em mim!

Ainda tenho de agradecer aos amigos que torceram por mim e estiveram ao meu lado em todos os momentos. Saibam que vocês são a família que Deus me permitiu escolher! Aos meus irmãos emprestados, Keli e Japa, pelo carinho e amizade de vocês!

Em especial a minha grande amiga Camila de Oliveira Guedes (in memoriam), que iniciou comigo esta caminhada. Agradeço a Deus por cada momento que passamos juntas e sei que você está comemorando comigo esta vitória!

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e aos professores do departamento de Morfologia pelos ensinamentos, pela seriedade e competência com o trabalho que desempenham. Agradeço as agências que contribuíram financeiramente para a realização deste projeto: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Enfim, é impossível citar aqui tudo e todos que contribuíram para essa conquista, mas que não reste dúvida de minha gratidão.

"Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas, continuarei a escrever"

Clarice Lispector

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS:	8
LISTA DE TABELA:	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMO:.....	11
ABSTRACT:	12
INTRODUÇÃO.....	13
RESULTADOS	38
CONCLUSÃO E RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO 1.....	80
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.....	81
ANEXO 2.....	82
ANEXO 3.....	93
ANEXO 4.....	94
ANEXO 5.....	95
ANEXO 6.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA:** Albumina de Soro Bovino
- DAF-2:** 4,5-diaminofluoresceína
- DAF-2DA:** Diacetato 4,5 de diaminofluoresceína
- DAF-2T:** Triazolofluoresceína
- DCF-DA:** 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
- DHR-123:** Dihidrorodamina-123
- GM-CSF:** Fator estimulante de colônia de granulócito- macrófago
- H₂O₂:** peróxido de hidrogênio
- IL-4:** Interleucina 4
- IL-5:** Interleucina 5
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-9:** Interleucina 9
- IL-13:** Interleucina 13
- MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase* (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)
- mBSA:** Albumina de Soro Bovino metilada
- NF-κB:** *Nuclear factor kappa B* – (Fator nuclear kappa B)
- NO:** óxido nítrico
- NADPH-oxidase:** *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
- OVA:** Ovalbumina
- ONNO:** Peroxinitrito
- O₂:** Aniôn superóxido
- PBS:** *Phosphate buffer saline* ou Tampão de salina fosfatado
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinase
- PSGL-1:** *P-selectin glycoprotein ligand-1* ou Glicoproteína ligante 1 para P -Selectina
- ROS:** *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
- SOD:** Superoxide dismutase
- WT:** *Wild type* ou Tipo selvagem
- μM:** micromolar

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Vias de sinalização da apoptose.

Figura 2. Diferentes passos envolvidos no clearance eficiente de células apoptóticas.

Figura 3. Série orquestrada de eventos que ocorrem durante um processo inflamatório agudo culminando na resolução.

Figura 4. Caracterização da resposta inflamatória após indução da asma em camundongos.

Figura 5. H₂O₂ induz apoptose de eosinófilos *in vivo* de maneira dependente de caspases.

Figura 6. H₂O₂ induz apoptose preferencialmente de eosinófilos (imunofluorescência).

Figura 7. H₂O₂ induz apoptose preferencialmente de eosinófilos (citometria de fluxo).

Figura 8. H₂O₂ induz apoptose de células EOL-1.

Figura 9. H₂O₂ induz apoptose de células EOL-1 de maneira dependente de caspases.

Figura 10. Avaliação do estresse oxidativo no pulmão de camundongos com asma.

Figura 11. Inibição farmacológica de vias de sinalização importantes para a sobrevivência de eosinófilos.

Figura 12. O tratamento com H₂O₂ reduz a ativação de Pp44/42.

Figura 13. O tratamento com H₂O₂ reduz a ativação de Pp65.

Figura 14. O tratamento com H₂O₂ não modifica a ativação de Pp44/42 nos macrófagos.

Figura 15. O tratamento com H₂O₂ não modifica a ativação de Pp65 nos macrófagos.

Figura 16. O tratamento com H₂O₂ aumenta a capacidade eferocítica de macrófagos.

Figura 17. Avaliação da função pulmonar após o tratamento com H₂O₂.

Figura 18. Efeito do H₂O₂ no remodelamento e deposição de muco.

LISTA DE TABELA:

Tabela 1. Níveis de citocinas no pulmão.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de aprovação dos princípios éticos em experimentação animal - CETEA

Anexo 2 Artigo publicado na revista *Cell Death and Disease*

Anexo 3 Artigo de revisão publicado na revista *Mediators of inflammation*.

Anexo 4 Capítulo de livro publicado na © 2015 Editora Edgard Blücher Ltda.

Anexo 5 Artigo publicado na revista *Plos one*.

Anexo 6 Artigo enviado para publicação na revista *Oral Biology*

RESUMO:

Introdução: Os eosinófilos são células efetoras que desempenham um papel importante nas doenças alérgicas. Uma falha na remoção destas células do sítio inflamatório pode resultar em doenças inflamatórias crônicas, como a asma. Assim, há um grande interesse em compreender os mecanismos e mediadores envolvidos na eliminação dos eosinófilos dos sítios inflamatórios. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na morte celular programada de eosinófilos induzida por ROS na resposta inflamatória alérgica. **Métodos:** A inflamação alérgica foi induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi administrado no pico do infiltrado inflamatório (24 horas). O número total de leucócitos, de eosinófilos e células mononucleares foram avaliados no lavado bronco-alveolar (LBA). Além disso, verificamos os níveis de expressão de citocinas e quimiocinas, o estresse oxidativo, a produção de muco, deposição de colágeno no parênquima pulmonar e função respiratória. Avaliamos também o efeito do H_2O_2 nas vias de sinalização de sobrevivência de leucócitos e em uma linhagem celular eosinofílica humana (EOL-1) **Resultados:** O tratamento com H_2O_2 na fase de maior acúmulo de eosinófilos acelerou a resolução de inflamação alérgica através da indução de apoptose de eosinófilos dependente de caspase-3 e inibição de vias de sinalização associadas ao aumento à sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios. Além disso, H_2O_2 diminuiu o remodelamento, deposição de muco, produção de citocinas inflamatórias e hiper-reatividade das vias aéreas. **Conclusão:** H_2O_2 induz a apoptose de células EOL-1 *in vitro* e é necessário para a resolução da inflamação *in vivo* através da indução de apoptose eosinófilos e inibição de vias de sobrevivência celular. De maneira importante, H_2O_2 mantém a integridade e função do tecido.

ABSTRACT:

Introduction: Eosinophils are effector cells that have an important role in the pathogenesis of allergic disease. Defective removal of these cells likely leads to chronic inflammatory diseases such as asthma. Thus, there is great interest in understanding the mechanisms responsible for the elimination of eosinophils from inflammatory sites. Previous studies have demonstrated a role for certain mediators and molecular pathways responsible for the survival and death of leukocytes at sites of inflammation. Reactive oxygen species have been described as proinflammatory mediators but their role in the resolution phase of inflammation is poorly understood. The aim of this study was to investigate the mechanisms whereby hydrogen peroxide resolves the allergic inflammatory responses. **Material and methods:** An eosinophilic cell line (Eo1-1) was treated with hydrogen peroxide and apoptosis was measured. Allergic inflammation was induced in ovalbumin sensitized and challenged mouse and reactive oxygen species were administered at the peak of inflammatory cell infiltrate. Inflammatory cell numbers, cytokine and chemokine levels, mucus production, inflammatory cell apoptosis and peribronchiolar matrix deposition was quantified in the lungs. Resistance and elastance were measured at baseline and after aerosolized methacholine. The expression of caspase-3 and signal transduction pathways in leukocytes were measured of immunofluorescence and confocal analysis. Phosphatidylserine expression was measured after hydrogen peroxide treatment in leukocytes by flow cytometry. **Results:** Hydrogen peroxide accelerates resolution of airway inflammation by induction of caspase-dependent apoptosis of eosinophils and inhibit survival from of pathways in eosinophils specifically. Moreover, H₂O₂ decrease remodeling, mucus deposition, inflammatory cytokine production and airway hyperreactivity. **Conclusion:** These data presented indicate a pro-resolving effect of hydrogen peroxide in allergic inflammation by inducing apoptosis of eosinophils, and inhibiting cell survival pathways. These results, could have fundamental implications for the basic concept of resolution of inflammation and may have therapeutic implications.

INTRODUÇÃO

Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma reação à lesão tecidual causada por agentes infecciosos, trauma, cirurgia, queimadura, isquemia ou câncer que elimina o agente nocivo e desencadeia, desde suas fases iniciais, eventos que culminam com o reparo e retorno à homeostase do tecido [1-4]. Entretanto, a inflamação pode se tornar persistente, constituindo a base de várias doenças crônicas como asma, artrite reumatóide, aterosclerose, rinite alérgica, fibrose pulmonar e doenças metabólicas [5-9].

Os sintomas clínicos da inflamação foram descritos no século I d.C., por Cornelius Celsius, e denominados como sinais cardinais da inflamação. São eles: o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (inchaço, causado por aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo), e dor (em parte, devido à alterações nas terminações nervosas de neurônios sensitivos primários). Um quinto sinal foi descrito por Rudolf Virchow em 1858 que caracterizou a perda da função dos órgãos afetados devido, principalmente, ao edema e dor [10].

A resposta inflamatória pode apresentar duas reações principais: a vascular e a celular. As reações vasculares e celulares são mediadas por diferentes moléculas incluindo os fatores quimiotáticos que são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. A liberação destes mediadores quimiotáticos promove uma sequência de eventos nos leucócitos circulantes: no lúmen do vaso sanguíneo ocorre a marginalização, rolamento e adesão ao endotélio, transmigração através do endotélio e a migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático [11-13]. Substâncias exógenas e endógenas podem exercer esse papel quimiotático para os diversos leucócitos. Agentes

exógenos podem ser moléculas derivadas de bactérias (como por exemplo o fMLP-*Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*). Já os mediadores endógenos envolvem componentes do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas [14]. Quando chegam ao local inflamado, os leucócitos produzem mediadores que contribuem para o início, amplificação e manutenção da inflamação, tornando-se os orquestradores dos processos inflamatórios crônicos [15]. Assim, é de grande interesse entender os mecanismos responsáveis pela eliminação dos leucócitos e inativação dos mediadores inflamatórios secretados no sítio inflamatório.

Asma alérgica

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 300 milhões de pessoas de todas as idades, em todo o mundo, sofrem de asma e cerca de 250.000 pessoas morrem de asma anualmente. A asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente, na população infantil [16]. A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas na qual diversos tipos celulares, como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e, especialmente, **os eosinófilos**, desempenham funções importantes [17, 18]. A ativação destas células leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios que são responsáveis pela saída de fluido dos capilares pulmonares para os tecidos adjacentes às vias aéreas, hiperplasia de células caliciformes com conseqüente aumento na produção de muco, resultando no espessamento e obstrução das vias aéreas. Esse aumento de mediadores produzidos por eosinófilos estão envolvidos nas exacerbações dos sintomas e no remodelamento pulmonar, modificações estruturais que podem levar à limitação irreversível do fluxo aéreo e perda da função do órgão.

Eosinófilos são granulócitos de vida curta derivados da medula óssea e estão presentes principalmente nas mucosas. Os eosinófilos representam cerca de 1 a 3% dos

leucócitos presentes no sangue humano e de camundongos [19, 20]. Essas células apresentam núcleo bilobulado e contém grânulos característicos no seu citoplasma denominados grânulos primários, grânulos secundários, grânulos pequenos e os corpos lipídicos [21, 22]. Muitos trabalhos sugerem a participação dos eosinófilos na patofisiologia de doenças alérgicas, tais como, rinite [23], dermatite [24] conjutivite [25], e doenças parasitárias [21]. Na asma, os eosinófilos têm a capacidade de exercer ação efetora sobre as vias aéreas de indivíduos acometidos pela asma, pela sua capacidade de produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento [19]. Um grande número de eosinófilos e altos níveis de MBP (do inglês: *Major Basic Protein*), proteína encontrada em grânulos citotóxicos eosinofílicos tem sido encontrado no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos. Estudos clínicos e em modelos animais tem demonstrado que os eosinófilos são marcadores da asma e podem causar danos em células epiteliais, hiperplasia de células caliciformes, hiperreatividade brônquica e, por último, remodelamento de tecido que leva à cronificação da doença e, conseqüente, deposição de colágeno e cicatrização, um processo que muitas vezes leva a perda da função do órgão afetado [17, 18, 26-32].

Resolução da resposta inflamatória e morte celular

Em indivíduos saudáveis a inflamação geralmente possui um limite próprio e, assim que o agente agressor é eliminado, um programa de resolução é ativado. Para isso, mediadores químicos especializados são gerados e alguns processos bioquímicos são ativados [33]. A vasodilatação e formação de edema contribuem para a redução das concentrações efetivas do estímulo inflamatório, os leucócitos recrutados eliminam o agente causador da inflamação, mediadores inflamatórios são desativados espontaneamente ou enzimaticamente, moléculas com função inibitória são produzidas e as células efetoras são eliminadas do tecido. As células inflamatórias podem ser

eliminadas por recirculação sistêmica, drenagem linfática ou morte celular. O principal evento de morte celular envolvido no processo de resolução da resposta inflamatória é a **apoptose** seguida pela ingestão dos corpos apoptóticos por células fagocíticas, principalmente os **macrófagos**, por um processo denominado eferocitose [34]. Vale a pena ressaltar que durante algumas doenças inflamatórias como a artrite, a dermatite atópica e asma, ocorre uma redução ou atraso da apoptose dos leucócitos efetores o que justifica a ocorrência de uma doença mais prolongada, grave e com perda de função do órgão afetado [35].

A **apoptose** é definida como uma forma programada ou fisiológica de morte celular sendo um mecanismo altamente controlado que não induz inflamação e tem características morfológicas e bioquímicas específicas. Durante a apoptose, a célula encolhe, perde volume celular, condensa da cromatina e fragmenta o núcleo associado à fragmentação do DNA. E, em algumas linhagens celulares, ocorre a formação dos corpos apoptóticos [36]. Um dos primeiros sinais bioquímicos do processo apoptótico é a exposição da fosfatidilserina (PS, do acrônimo inglês *phosphatidylserine*) na porção externa da membrana celular, atuando como um sinal de reconhecimento para a ativação fagocítica dos macrófagos, o que resulta na eliminação das células apoptóticas [37]. A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (citoplasmática) (Figura 1). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular. Os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, ocorre a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de uma proteína associada à sua membrana interna, denominada citocromo c. Esse processo é desencadeado por elevações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas da família de proteínas citoplasmáticas denominadas de Bcl-2 (Ex: Bax, Bak, Bik, Bad, Bid e Bim) [38]. No citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 (fator de ativação de apoptose 1) e ativa as

caspases que são endoproteases citoplasmáticas envolvidas na clivagem de ligações peptídicas em uma reação que depende de resíduos de cisteína no sítio catalítico ativo e ocorre depois de resíduos de ácido aspártico no substrato. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas como iniciadoras (caspases 8 e 9) ou executoras (caspases 3, 6 e 7). Caspases iniciadoras ativam as caspases executoras que, posteriormente, coordenam as suas atividades para decomposição de proteínas estruturais e resultão na fragmentação do DNA e vesiculação da membrana [39]. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de morte celular e os seus domínios de morte interagem com proteínas adaptadoras como FADD. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3/7, que executarão a morte por apoptose [38-40]. A morte celular por apoptose exerce um papel fundamental na maioria dos processos biológicos fisiológicos e patológicos e a desregulação desse mecanismo é um fator importante na patogênese e progressão de inúmeras doenças crônicas e auto-imunes. [33, 35, 41, 42].

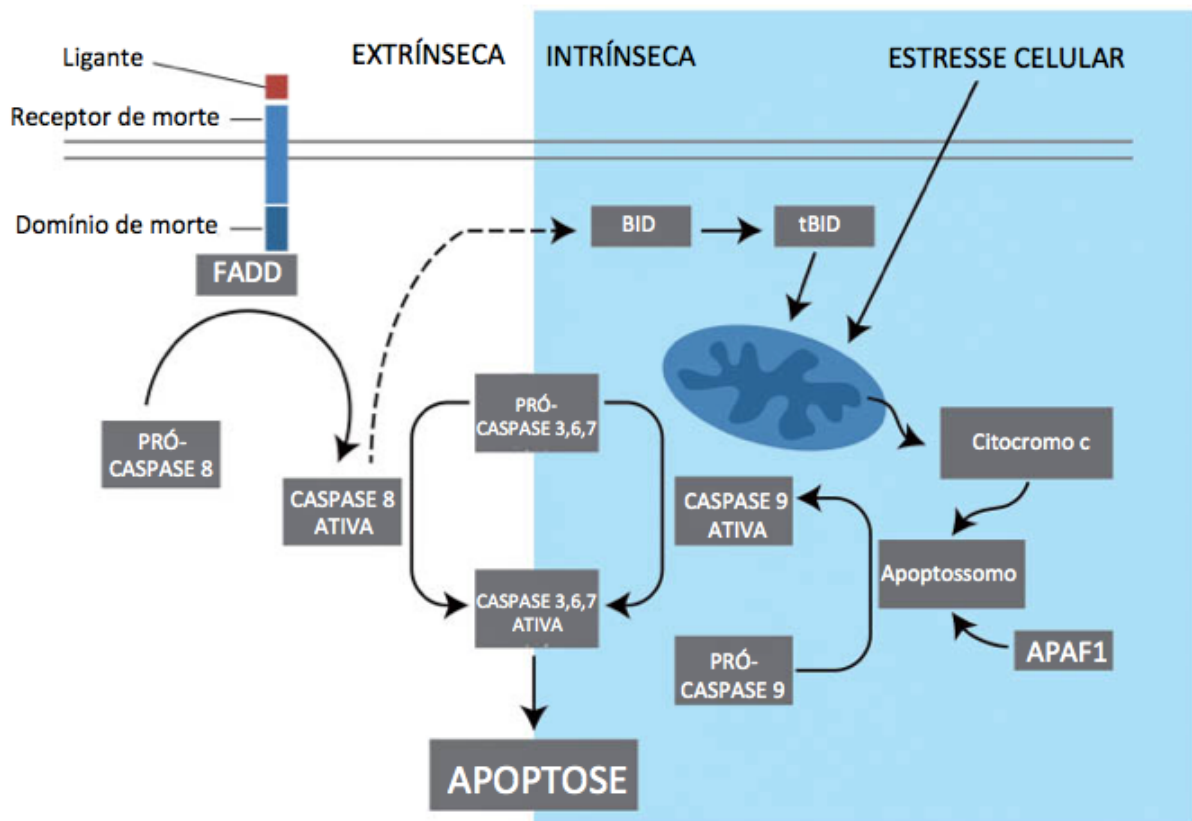


Figura 1. Vias de sinalização da apoptose. A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (citoplasmática). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular. Os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação do citocromo c. Esse processo é desencadeado por elevações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bid. No citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, o qual ativa caspase-3/7. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de morte celular, os seus domínios de morte interagem com proteínas adaptadoras como a FADD. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3/7, executando a morte por apoptose. Adaptado de McIlwain *et. al*, 2013[39].

Os **macrófagos** desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro, cicatrização, reparo e inflamação crônica [43]. São células fundamentais para a etiologia de muitas doenças inflamatórias incluindo aterosclerose, artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e na carcinogênese [44]. Além disso, os macrófagos possuem diversas funções, bem como um fenótipo diferente compatível com o seu ambiente inflamatório [43-45]. Assim, podem tornar-se classicamente ativados (M1) e alternativamente ativado (M2). A nomenclatura M1/M2 é associada com a resposta dos tipos TH1 e TH2, respectivamente [43, 46, 47]. Macrófagos M1 adquirem um fenótipo pró-inflamatório, e estão envolvidos com a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas (IL-12, IL-23, TNF α , IL-1 β , and IL-6), quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), do induzível óxido nítrico sintase (iNOS) e são caracterizados por um alta expressão de NOS2 e produção de NO [47-49]. Os macrófagos M1 podem ser induzidos por estímulo microbiano (ex. LPS) ou citocinas (TNF e GM-CSF) [44, 50-52]. Macrófagos M2 liberam mediadores pró-resolutivos e segregam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e contribui para resolução da inflamação [53, 54].

Um outro evento essencial para que resolução do processo inflamatório tenha sucesso é a eferocitose (do Latin *effere* que significa túmulo ou sepultura) [55]. Eferocitose refere-se ao processo pelo qual células apoptóticas têm seus corpúsculos apoptóticos removidos e degradados pelas células fagocíticas. Formam-se eferossomas, as células mortas são removidas antes que percam a integridade da membrana e seu conteúdo seja liberado no espaço extracelular. Isto previne a exposição do tecido às enzimas tóxicas, moléculas oxidantes e outros componentes intracelulares, tais como proteases e caspases [55-60]. A eliminação de células apoptóticas é mediada, principalmente, por fagócitos profissionais como macrófagos, mas fagócitos não profissionais também podem participar deste processo fagocítico[34] (Figura 2).

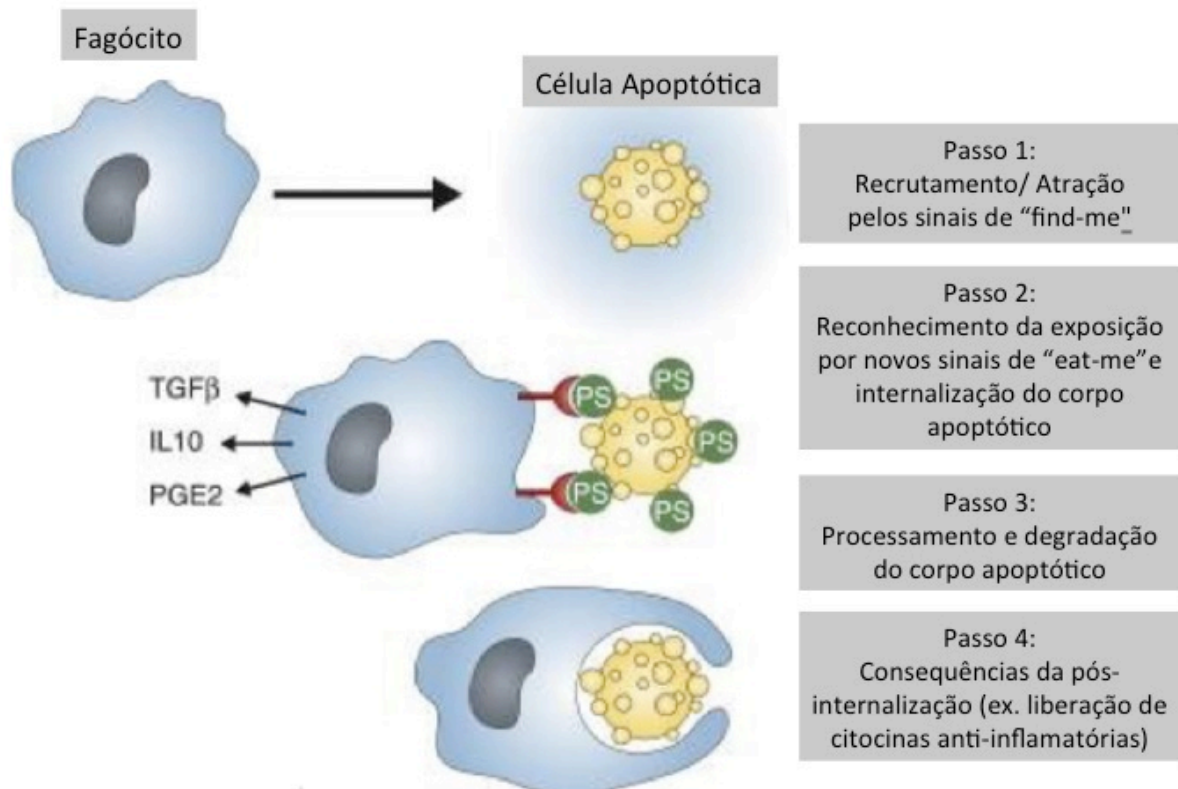


Figura 2 - Diferentes passos envolvidos no clearance eficiente de células apoptóticas. Os sinais de "find-me" (como baixos níveis de nucleotídeos ATP e UTP, fractalcina, lisofosfatidilcolina ou esfingosina 1-fosfato) liberados pelas células apoptóticas ajudam a atrair fagócitos para as proximidades das células que estão sofrendo apoptose. Os fagócitos utilizam os receptores de fagocitose em sua superfície para encaixar com os sinais de "eat-me" das células apoptóticas. O acoplamento dos receptores (ligados ao reconhecimento fosfatidilserina) estimulam a liberação de citocinas antiinflamatórias, tais como TGF-β, IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2). A sinalização intracelular induzida dentro do fagócito pelas interações ligante-receptor conduz a rearranjos do citoesqueleto e internalização da célula em apoptose. O fagócito internaliza os corpos apoptóticos por uma série de passos, e a digestão apropriada parece ser importante para a absorção continuada de outras células apoptóticas pelos fagócitos. Fonte: Adaptado de Ravichandran, 2010 [60].

Após a eferocitose, os macrófagos podem mudar seu fenótipo para alternativamente ativados-M2 [45], os quais produzem moléculas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) e mediadores pró-resolutivos (lipoxinas, maresinas, prostaglandinas da série D, resolvinas das séries E e D e protectinas que são derivados de ácidos graxos) que impedem o recrutamento de novos leucócitos, induzem apoptose dos leucócitos infiltrados e induzem o recrutamento não flogístico de novos monócitos para o sítio inflamatório os quais contribuirão para o processo de eferocitose [33, 48, 61-63]. Os macrófagos M2 estão envolvidos com a reconstituição de tecidos e tem um papel importante no retorno à homeostase tecidual [64, 65]. Além dos dois tipos citados anteriormente, um outro tipo de macrófago pode ser identificado na fase resolutiva da inflamação e é denominado macrófago resolutivo (Mres). O Mres está envolvido com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, que posteriormente serão drenados pelos vasos linfáticos ou sofrerão apoptose para que ocorra a total resolução da resposta inflamatória [55, 56]. A Figura 3 destaca as diferentes fases da inflamação aguda em direção a um processo resolutivo bem sucedido.

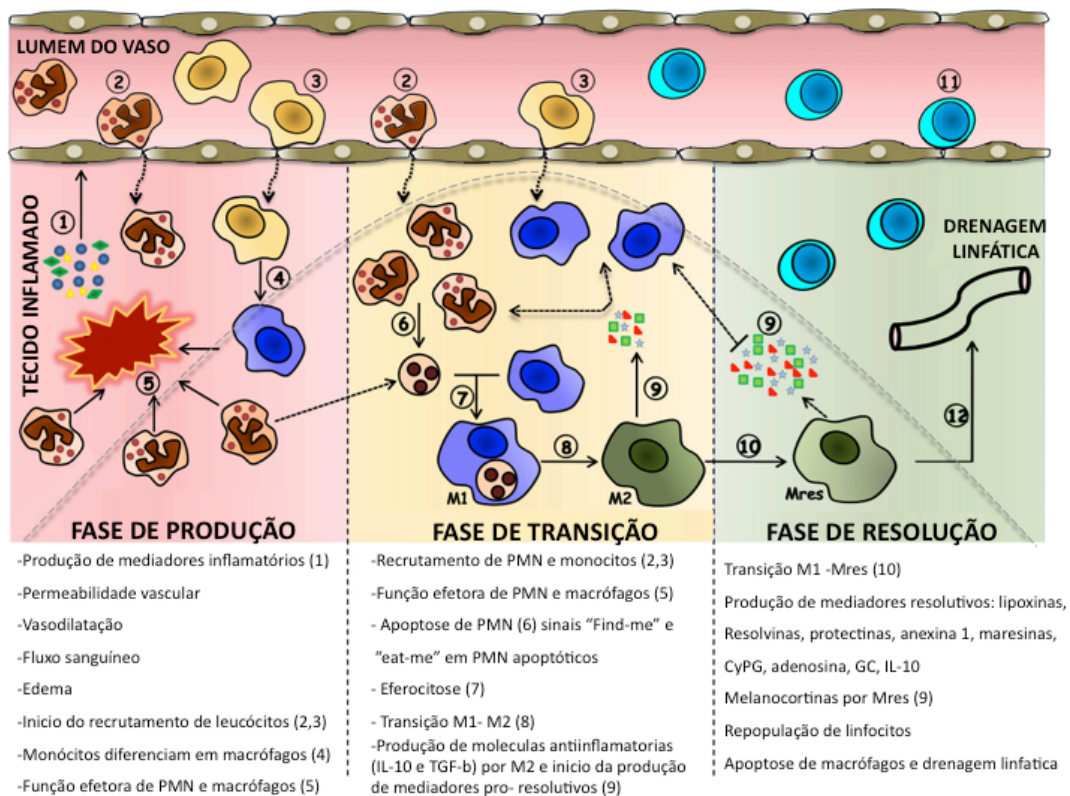


Figura 3. Série orquestrada de eventos que ocorrem durante um processo inflamatório agudo culminando na resolução. A lesão tecidual (infecção estéril ou infecciosa) leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais), os quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios (1). Nesta fase produtiva da inflamação, mediadores atuam promovendo vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo local, modificando a permeabilidade do endotélio. Estes eventos são acompanhados por hiperemia e exsudação de proteínas plasmáticas e de líquidos (edema). As células endoteliais também são ativadas e expressam moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) e apresentam mediadores quimioatrativos, que permitam a captura e extravasamento de leucócitos (2-4). Leucócitos polimorfonucleares (sobretudo neutrófilos) são as primeiras células que extravasam para os tecidos inflamados (2), seguido por células mononucleares (3). Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido inflamado. Estas células podem ser ativadas e se tornarem uma fonte importante de uma variedade de mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (5), o que permitirá que os leucócitos exerçam as suas funções efetoras nos tecidos. Na fase de transição da inflamação, apesar do intenso acúmulo de leucócitos PMNs, sob a ação de sinais pró-resolutivos (mediada por mediadores pró-resolutivos e diminuição dos níveis de agentes modificadores da sobrevivência celular), inicia-se a apoptose (6), seguido de fagocitose por macrófagos teciduais (eferocitose) (7). Este processo envolve vários sinais que levam à atração, a ligação e a remoção de células apoptóticas por macrófagos. Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 (8). Macrófagos M2 - (ou M2 like) são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como a IL-10 e TGF-β) e mediadores pró-resolutivos (9). Tais mediadores têm o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e amplificar a eferocitose. Macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres) (10), os quais apresentam capacidade fagocítica reduzida, mas, no entanto, produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e fibrose. Tais eventos pavimentam o caminho para a fase de resolução da inflamação. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por macrófagos resolutivos (Mres), a repovoação por linfócitos (11) e apoptose de macrófagos ou drenagem destas células para o linfonodo local (12) encerram o processo inflamatório e restauram a homeostase do tecido. Fonte: Adaptado de Alessandri et al., 2013 [66].

Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios são moléculas solúveis que atuam localmente na lesão ou de forma sistêmica. São originários do plasma, de células inflamatórias ou dos tecidos lesados. Sistemas derivados do plasma, tais como complemento, cininas e fibrinogênio, são ativados e seus produtos serão responsáveis pelos efeitos inflamatórios, assim como os produtos de células que produzem mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e **espécies reativas de oxigênio** (do inglês: *reactive oxygen species*: ROS) [67, 68].

Os **mediadores lipídicos** estão envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias alérgicas. Vários tipos celulares como os eosinófilos e macrófagos podem produzir os mediadores lipídicos, incluindo os eicosanóides derivados do metabolismo oxidativo do ácido araquidônico. Eosinófilos e outros leucócitos podem produzir eicosanóides e moléculas sinalizadoras que podem regular respostas celulares fundamentais no núcleo ou citoplasma, tais como a liberação de citocinas no início da inflamação [69]. Em contrapartida, os macrófagos podem alterar o seu metabolismo de lipídios de prostaglandinas e leucotrienos (pró-inflamatórios) para produzir mediadores pró-resolutivos como lipoxinas e resolvinas, protectinas e maresinas. Esses mediadores atuam na resolução do processo inflamatório, dentre outras funções, impedindo o recrutamento de neutrófilos e estimulando o recrutamento de macrófagos para eferocitose de células apoptóticas [54].

As **citocinas** são proteínas de baixo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares com função na regulação da resposta imune, na diferenciação e proliferação celular, na maturação de células de medula óssea e algumas atuam como fatores quimiotáticos para leucócitos. Durante uma resposta inflamatória alérgica ocorre um aumento na produção de citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5),

interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13) e fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF) [18, 26-28]. Essas citocinas são responsáveis pelos sinais clínicos da alergia [18, 26-28]. Em contrapartida, citocinas como a IL-10 e o TGF- β possuem um importante papel modulador negativo de respostas inflamatórias, inibindo a proliferação e ativação celular, e induzindo apoptose e reparo do tecido [70, 71].

As **quimiocinas** são pertencentes à família das citocinas e denominadas citocinas quimiotáticas [72]. Elas desempenham um importante papel em processos inflamatórios, primeiramente por guiarem o recrutamento e ativação de leucócitos para o sítio inflamatório e também por participarem dos processos de resolução e reparo [73]. As eotaxinas CCL11 e CCL22 são quimiocinas cuja função primordial é promover quimiotaxia de eosinófilos. Seus receptores estão presentes em vários tipos celulares importantes na fisiopatologia da asma como os eosinófilos, basófilos e linfócitos T [74].

As **espécies reativas de oxigênio** inclui um grupo de moléculas, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido O_2^- e radical hidroxila (OH) [4]. ROS são essenciais para a defesa do hospedeiro e são produzidos intracelularmente em resposta a estímulos microbianos e inflamatórios pelos fagócitos dentro das mitocôndrias ou através de um processo conhecido como "explosão oxidativa" mediado pelo complexo da NADPH-oxidase (NOX), que contém 7 isoformas distintas nas membranas celulares, mitocôndrias, peroxissomas, e retículo endoplasmático [75]. Para evitar danos aos tecidos os níveis de ROS precisam ser rigorosamente controlados por sistemas de defesa antioxidantes que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD está presente na mitocôndria e no citoplasma celular e sob condições de estresse oxidativo age como um sistema de defesa celular endógeno que degrada superóxido (O_2^-) em oxigênio e H_2O_2 sendo este último convertido em água

pela GPx ou CAT [76]. ROS são liberadas durante a resposta inflamatória e são consideradas como mediadores pró-inflamatórios [77], entretanto, evidências para ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas tem sido descritas atualmente [78]. Um exemplo disso é o fato que a produção diminuída de ROS esta associada com várias condições patológicas humanas, por exemplo, mutações herdadas nas subunidades da NADPH oxidase resultam em doença granulomatosa crônica (CGD), caracterizada por inflamação excessiva [79, 80]. Além disso, H₂O₂ é descrito como indutor da apoptose de células epiteliais [81], células endoteliais [82], hepatócitos humanos [83], miócitos [84] e neutrófilos [67]. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que o H₂O₂ derivado da NADPH oxidase está diretamente ligado à indução da apoptose de neutrófilos e resolução da inflamação em um modelo de artrite induzida por antígeno [67]. Entretanto, o papel de ROS para a resolução da inflamação alérgica e os mecanismos envolvidos nesse processo são ainda desconhecidos.

Vias de sinalização desencadeadas durante a resposta inflamatória

A apoptose pode ser desencadeada através da inibição de vias de sinalização associadas à manutenção de sobrevivência das células. Em leucócitos, a ativação de PI3K/Akt, MAPK/ERK e fatores de transcrição como o NF-κB são importantes para manutenção da sobrevivência celular e vários tipos celulares [85, 86]. PI3K e MAPK/ERK são vias importantes para muitos processos celulares relacionados ao sistema imune, como ativação, migração e sobrevivência celular [87, 88]. Dados do nosso grupo utilizando um modelo de pleurisia alérgica mostraram que o tratamento sistêmico com inibidores de PI3K antes do desafio antigênico impede o recrutamento de eosinófilos associado a uma diminuição da fosforilação de Akt e produção de IL-5. E o tratamento com inibidores de PI3K 24 horas após o desafio com antigênico reduz os eosinófilos acumulados na cavidade pleural, um efeito relacionado com a inibição da

fosforilação de Akt e um aumento do número de eventos apoptóticos [85]. Além disso, em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, a ativação de PI3K, fosforilação de Akt e a translocação nuclear de NF- κ B foram importantes para conduzir os processos inflamatórios e pró-fibróticos que culminam em fibrose e morte dos camundongos após a instilação de bleomicina [89].

O NF- κ B é um fator de transcrição regulador da resposta imune que atua como um ponto de convergência de várias vias de transdução de sinal, como as citadas anteriormente, transmitindo os sinais destas moléculas para o núcleo e promovendo a ativação transcricional de genes associados com a inflamação e a sobrevivência das células [90, 91]. A inibição de NF- κ B impede a lesão de tecidos e letalidade em um modelo de lesão intestinal por esquiemia e reperfusão, e isto foi associado com a inibição da produção de TNF- α e diminuição no recrutamento de neutrófilos [92]. Já foi demonstrado em um modelo de artrite induzida por antígeno, que o aumento da geração de H₂O₂ pela administração de SOD diminui a fosforilação de Akt e a ativação de NF- κ B em neutrófilos recuperados do lavado articular. Dessa forma, esses dados sugerem que a produção endógena ou administração exógena de ROS desempenha um papel ativo na resolução da inflamação neutrofílica [67]. Portanto, o potencial de H₂O₂ para resolver a inflamação eosinofílica na asma, pode estar associado à sua capacidade de controlar a ativação de PI3K, MAPK e NF- κ B e, conseqüentemente, a sobrevivência dos eosinófilos. Resultados anteriores mostraram que ROS induzem a apoptose de eosinófilos em diferentes modelos de resposta inflamatória alérgica (Anexo 2). Entretanto, os mecanismos e as vias de sinalização envolvidos na ativação, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos em locais de inflamação alérgica, ainda são pouco compreendidos. O entendimento destes mecanismos pode ser útil para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o controle de doenças alérgicas.

OBJETIVO:

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os mecanismos pelos quais o tratamento com H₂O₂ induz resolução da resposta inflamatória e se esse tratamento poderia melhorar a perda de função pulmonar em um modelo de asma induzida por ovalbumina em camundongos.

Objetivos específicos:

1. Investigar se os mecanismos de apoptose e resolução da resposta inflamatória induzido pelo aumento de ROS são dependentes ou não da ativação de caspases *in vivo e in vitro*.
2. Investigar o efeito do tratamento com H₂O₂ no estresse oxidativo gerado durante a asma.
3. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na expressão de moléculas envolvidas na sobrevivência de eosinófilos tais como PI3K, MAP kinases e vias de transdução de sinal, principalmente o NfκB.
4. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na função pulmonar através da medida da hiper-reatividade brônquica;
5. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias potencialmente importantes para aumento da sobrevivência de eosinófilos como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), CCL11, CCL24, fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) e TNF-α;

MATERIAL E MÉTODOS:

Animais

Neste estudo utilizamos camundongos C57Bl/6 obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Todos os procedimentos experimentais foram avaliados pelo Comitê de Ética da UFMG com protocolo de aprovação número 218/2011 (anexo 1).

Drogas e reagentes

H₂O₂, U0126, SB203580, LY294002, ovalbumina, Z-VAD-fmk, Albumina de Soro Bovino (BSA), iodeto de propídio (PI) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Apo DETECT ANNEXIN-V-FITC KIT foi adquirido da Invitrogen. Anticorpos foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) e da Cell Signalling (Cell Signalling Technology). Q-VD-OPh (R&D Systems), anexina-V-FLUOS (Roche), *perm wash e FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II* foram adquiridos da BD Bioscience.

Modelo de asma induzida por antígeno:

Todos os animais foram sensibilizados intraperitonealmente (i.p.) com 100 µg de OVA (*albumin from chicken egg white* - A5503, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em 2% alum (Adjuvante de Hidróxido de alumínio em gel; Brenntag) nos dias 0 e 7 e foram desafiados pela administração intranasal de antígeno (OVA) do dia 12 ao 20 com 10 µg of OVA [93].

Lavado bronco-alveolar (LBA)

Os camundongos foram eutanasiados por uma superdosagem de anestésico e a traquéia foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno de 1.7mm. O lavado foi feito através da administração separada de duas alíquotas de 1 mL de PBS 1X gelado, que foram injetadas e recolhidas 3 vezes cada uma, obtendo-se 1,7 – 2,0 mL de volume final

de lavado. O líquido recolhido foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4°C por 5 minutos a 1500 rpm e o *pellet* de células foi utilizado para contagem total de células e confecção de lâminas histológicas em citocentrífuga para contagem diferencial das células. Após o lavado bronco-alveolar, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS 1x pelo ventrículo direito do coração para remoção de sangue do leito vascular pulmonar e foram imediatamente extraídos para análise histopatológica e testes enzimáticos.

Cultura de células Eol-1 e indução de apoptose

A linhagem celular eosinofílica humana (Eol-1), foi mantida em meio RPMI - 1640 (PAA) com 2% de FBS (Biosera), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) (PAA). As células foram aliquotadas (2×10^6 cels/mL) e incubadas com H₂O₂, QVD- OPH ou uma combinação de ambos em uma placa de 96 poços (volume final de 150 µL) ou em tubos de 2 mL (volume final de 500 µL) em estufa a 37 °C com 5 % de dióxido de carbono. O estoque QVD-OPH foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido (Sigma) e diluído em tampão obtendo-se uma concentração final de 0,2 %. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se o equipamento BD - LSR Fortessa (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) usando a anexina-V-FLUOS (Roche) em combinação com iodeto de propídio (PI) (Sigma), como descrito anteriormente [94]. Os dados foram analisados no software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR). As características morfológicas de apoptose foram também avaliadas por microscopia de luz em lâminas preparadas em citocentrífuga [94].

Tratamento com H₂O₂, Z-VAD, SB 203580, U0-126 e LY 294002

Os camundongos foram tratados com H₂O₂ (0,5 M), SB-203580 (1mg/Kg) , U0-126 (3 mg/kg) ou LY-294002 (10µg/animal) i.n. após a indução da resposta inflamatória em tempos previamente determinados. O tratamento com z-VAD-fmk (1mg/kg) i.p foi

concomitantemente com o tratamento com H₂O₂ para comprovar a participação de caspases no modelo.

Contagem total e diferencial dos leucócitos

As células do lavado broncoalveolar foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i) e o sedimento celular ressuspenso em 100µL de BSA 3% em PBS. Uma alíquota das células foi diluída na solução de lise de hemácias (Solução de Turk – IMBRALAB, 1:10) para a realização da contagem total de células utilizando câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, as células foram citocentrifugadas utilizando preparações em lâminas de citospin (Shandon III) com as células diluídas em albumina 3%, de forma que cada lâmina tivesse aproximadamente 50 mil células. As lâminas foram coradas com o método de May-Grunwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 100x no microscópio ótico. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

Técnica histológica

O pulmão foi removido e fixado em solução tampão Milloning (pH 7,4) com paraformaldeído 4% para preservar a arquitetura pulmonar. As amostras foram incluídas em paraplast (Sigma-Aldrich) ou parafina e foram coradas com diferentes corantes, visando identificar e analisar o influxo de leucócitos, produção de muco e fibrose peribronquial. Para a análise do infiltrado de leucócitos em torno da região brônquica, os cortes de pulmão foram corados utilizando a técnica de hematoxilina e eosina (H&E) ou foram submetidos a coloração Sirius Red (Llewellyn's Sirius Red Direct Red 80, CI 35780; Aldrich, Milwaukee, WI pH 10,2). A análise morfométrica foi realizada utilizando microscópio de luz (Olympus®) em sete vias aéreas aleatórias na região

peribronquial visando a identificação e contagem de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos. Os resultados foram expressos como leucócitos/ $10^4\mu\text{m}^2$. A produção de muco foi analisada a partir de cortes de tecidos corados com hematoxilina e uma combinação de ácido periódico de Schiff (PAS-reagente de Schiff, Merck, Rio de Janeiro, BR). Fotomicrografias de vias aéreas obtidos com aumento de 400x foram analisados utilizando o Imagem-Pro Plus software (imagem -Pro ® Plus 4.1, Media Cybernetics , Houston, TX). Nove a doze áreas de bronquios pulmonares foram delineadas e quantificadas. Os resultados foram expressos como área PAS positivo (pixels/ μm^2). A fibrose peribrônquica foi analisada a partir de cortes de tecidos corados com hematoxilina e eosina e uma combinação de Tricromico de Gömöri (tricroômico LG Solution , Sigma - Aldrich). Fotomicrografias de vias aéreas obtidas no aumento de 200x foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus ®. Oito a doze areas peribronquiais do pulmão foram delineadas e quantificadas. Os resultados foram expressos como área de deposição de matriz extracelular (μm^2).

Quantificação do acúmulo de eosinofilos no pulmão através da dosagem da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO)

A extensão do acúmulo de eosinófilos nos pulmões foi mensurada pelo ensaio de atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) como descrito anteriormente [95]. Foram pesados 100 mg do pulmão dos animais e estes foram processados em um homogeneizador de tecidos com 1 mL de PBS. O material foi centrifugado a 10.000 rpm no rotor utilizado por 10min. O sobrenadante foi descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1,5 mL de salina 0,2% seguida de 1,5 mL de salina 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado (pellet) foi ressuspensão em 1,9 mL de solução de HTAB 0.5% em PBS. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado no ensaio

enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75 µl de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços juntamente com 75 µl da solução do substrato (1,5 mM OPD, em tampão tris-HCl - ácido clorídrico, 0,075 mM, pH=8,0 suplementado com H₂O₂ 6,6 mM). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1 mol/L. A absorbância foi lida em Leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) a 492nm. Os valores foram expressos em O.D.

Determinação de citocinas por ELISA

Foram dosadas no pulmão dos camundongos tratados ou não com H₂O₂, as citocinas IL-4, IL-5, TNF- α , CCL11 e CCL24. Os fragmentos dos pulmões foram pesados e homogeneizados em tampão de extração de citocinas (contendo anti-proteases, Tween 20 e EDTA), e em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado até o dia do ensaio. Para a realização do ensaio utilizamos kits *Quantikine human immunoassay* (R&D System, Abington, United Kingdom). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Expert Plus, Assays Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) utilizando 492 nm de comprimento de onda. As reações de ELISA tiveram como controle positivo citocinas recombinantes de camundongo (RD Systems). Os resultados foram expressos como pg/100 mL de tecido pulmonar.

Avaliação da morte celular:

-Caracterização morfológica da apoptose

A Caracterização morfológica da apoptose foi realizada como rotineiramente realizado no laboratório [85, 96]. Resumidamente, as células (5×10^4) coletadas 48 h após o desafio com antígeno foram citocentrifugadas, fixadas, coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas usando microscopia de imersão em óleo (objetiva x100) para determinar a proporção de células com morfologia apoptótica.

-Caracterização bioquímica da apoptose

Avaliação de apoptose também foi realizada por citometria de fluxo através da marcação com anexina-V-FITC + Gr-1 e com iodeto de propídio como uma forma de excluir da amostra células que tenham perdido a integridade de membrana. Os procedimentos foram realizados como recomendado pelo fabricante (Invitrogen). As células foram selecionadas com base no tamanho e granulosidade, permitindo a análise separada da população de granulócitos e os resultados foram expressos como células que se encontram num estágio precoce da apoptose quantificada através de coloração com anexina-V, mas não PI.

Western blotting para detecção de caspase 3 clivada

As células em uma concentração de 2×10^6 células/mL foram incubadas com H_2O_2 (Fisher Scientific), QVD-OPH (R&D Systems) ou combinações de ambos a 37 °C em um agitador durante 4h. As células foram centrifugadas a 3000xg durante 60 segundos e ressuspensas em tampão de lise. A amostra foi incubada no gelo durante 10 min, e adicionados de NP-40 e a amostra foi centrifugada durante 20 min a 3000xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento de células remanescente foi ressuspendido em tampão de amostra durante 5 min a 95°C. O lisado foi corrido em géis de 12% pré-moldados (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e transferidos para PVDF (Immobilon - P, Millipore, Herts, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora antes da incubação com anticorpos de caspase-3 clivada diluído 1:500 (Cell Signaling Technologies) *overnight* a 40°C ou GAPDH diluído 1: 20 000 (Sigma - Aldrich), 1h à temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens de 5 min em TBS/0.1 % de Tween - 20 e em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluído a 1:2500, durante 1h à temperatura ambiente, antes da incubação com ECL (GE Healthcare, Bucks, UK), a

exposição ao filme BioMax MS- 1 X-ray –sensíveis e o processamento (x- OGRAFIA Imaging Systems, Wilts, UK).

Análise de estresse Oxidativo:

1- Glutathiona reduzida (GSH):

A glutathiona é um mecanismo não-enzimático de defesa contra estresse oxidativo. Ela é um tripeptídeo que permanece livre no citoplasma e serve para detoxificar peróxidos e outros agentes reativos. A glutathiona existe em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que em casos de estresse oxidativo, os níveis de GSH são muito reduzidos. A quantidade de GSH no pulmão foi determinada colorimetricamente pela reação com ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) DTNB (*Ellman's reagent*). A absorbância das amostras foi lida em 450 nm, e comparada a uma curva-padrão de GSH.

2- Ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Resumidamente, este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malonaldeídos (MDA) e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada e por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano lida em espectrofotometro (532nm e 600 nm); os resultados são expressos em nmol/mL de plasma.

Hiper-reatividade das vias aéreas

Hiper-reatividade das vias aéreas (AHR) foi determinada como alterações da função das vias aéreas após administração de metacolina (concentração 3, 9 e 27 mg/mL aerossol durante 5 minutos cada) 48h após o último desafio com OVA. Para isso, os

animais foram anestesiados com Nembutal (60 mg/kg). A atividade neuromuscular foi bloqueada com o brometo de pancurônio (1 mg/kg). Camundongos traqueostomizados foram mecanicamente ventilados e função pulmonar foi avaliada. A traquéia foi canulada e a cânula foi ligada a um pneumotacógrafo. O fluxo de ar e pressão transpulmonar foram registados utilizando um sistema de processamento de mecânica pulmonar Buxco (Buxco Electronics, Wilmington, NC, EUA). Este instrumento foi usado para calcular a resistência pulmonar (RL) (cm H₂O/mL/s) e a complacência pulmonar dinâmica (mL/cmH₂O) em cada ciclo de respiração. A elastância pulmonar foi calculada como o inverso dos valores de complacência. Sinais analógicos do computador para Buxco foram digitalizados usando Analógico/Digital converter (Eletrônica Buxco). Parâmetros pulmonares basais foram avaliados com solução salina em tampão fosfato (PBS). Resultados foram expressos com os valores absolutos médios das respostas de resistência pulmonar e elastância recolhidas durante 5 minutos após a administração de metacolina em aerossol.

Técnica de Microscopia Confocal

As células do lavado broncoalveolar foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), o sedimento celular foi ressuspenso em PBS e contado com corante Turk (1:10). A partir da contagem, foi definido o volume de amostra que continha o número de células desejado (3×10^5) e células foram preparadas para citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) e foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos e em seguida foram submetidas a 3 lavagens, de 5 minutos cada, com PBS. As lamínulas foram bloqueadas com Fc Block (CD16/32-BD Biosciences) diluído em PBS-BSA 1% (1:100, 50 µL) por 30 minutos. Para realização de marcação intracelular as lamínulas foram incubadas por 30 minutos em uma solução de permeabilização celular (*Perm Wash*- BD Bioscience)- 1:12 em PBS-

BSA1%) e em seguida com o anticorpo primário *overnight*. Em seguida as laminulas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína por 30 minutos. Na sequencia, se necessário e após lavagem, foram adicionados os anticorpos extracelulares. Por último, as lamínulas foram preparadas com Fluormount (Sigma Aldrich, USA) para análise. Para obtenção das imagens foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse Ti com laser confocal C2, equipados com 3 diferentes lasers (excitação 405, 488 e 543 nm) e filtros de emissões de 450/50 nm (canal 1), 515/30 nm (canal 2) e 584/50 nm (canal 3). A leitura foi feita por um espelho dicromático de 405/488/543 nm. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando um software Volocity 6,3 (Perkin-Elmer) e o perfil de fluorescência foi avaliada usando o Image J (NIH). Os anticorpos utilizados foram Pp44/42 Alexa Fluor 488, verde (Cell Signaling) Pp65 Alexa Fluor 488 (Cell signaling) verde e PI (1: 1000), Caspase-3 clivada (1:100) (Cell signaling), Siglec-F (1:100) (Santa Cruz, CA, EUA)., diluídos em solução de permeabilização (*perm wash*- BD Bioscience).

Ensaio de Eferocitose *in vivo*.

Para avaliar a eferocitose de neutrófilos foi realizado uma adaptação dos protocolos utilizados por Newson et al., 2014 e Dalli et al., 2012 [97, 98]. No tempo 0 os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de Zimosan (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na dosagem de 1 mg/animal. Após 72h os animais receberam neutrófilos isolados do sangue humanos apoptóticos i.p. (2×10^6), a apoptose foi estimulada por incubação com staurosporina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na concentração de 10 μ M por poço durante 1 hora. Após 75 horas do desafio com zimosan os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal recolhido com 4 mL de PBS com auxilio de pipeta Pasteur. As células (5×10^4) recuperadas foram citocentrifugadas, fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia eferocítica.

Análises estatísticas

Todos os experimentos realizados *in vitro* foram realizados pelo menos três vezes, sendo cada um realizado em triplicata. Todos os experimentos realizados *in vivo* incluíram 5-10 animais por grupo. Os dados foram expressos como a média \pm EPM (Erro padrão da média). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-Way* ANOVA) seguida do teste Newman-Keuls (com um intervalo de confiança de 95%). A fim de testar a significância estatística entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os cálculos foram realizados utilizando o software Prism 5.0 Program for do Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Objetivo específico 1. Investigar se os mecanismos de apoptose e resolução da resposta inflamatória induzido pelo aumento de ROS são dependente ou não da ativação de caspases *in vivo e in vitro*.

Durante o mestrado nós mostramos que H₂O₂ resolveu a inflamação alérgica por induzir apoptose de eosinófilos. Dessa forma, neste projeto, fomos investigar os mecanismos de resolução da resposta inflamatória pelo aumento de H₂O₂ exógeno. Para isso, utilizamos um modelo de inflamação alérgica diferente do modelo usado no mestrado (esquemático na Figura 4A- do anexo 2) que nos permitiu verificar outro parâmetro da resposta inflamatória que é a perda de função do órgão afetado, a função pulmonar [99]. Primeiramente, avaliamos a cinética do infiltrado inflamatório e vimos que ele foi similar ao observado em nossos experimentos prévios (dados do mestrado - ver Figura 1 do anexo 2 (Figura 4B-D)). A resposta inflamatória caracterizou-se por um acúmulo de eosinófilos de 24-48 horas após o desafio com OVA e a resolução natural da inflamação iniciou-se com 48h e estava completa 72h após o desafio antigênico (Figura 4D). Além disso, observamos um aumento de células mononucleares 48h após o desafio, coincidindo com o início da diminuição do número de eosinófilos (Figura 4C). O tratamento com H₂O₂ também reduziu o número de eosinófilos no lavado bronco-alveolar neste modelo (Figura 4E) comprovando nossos dados anteriores, onde utilizamos o modelo do mestrado.

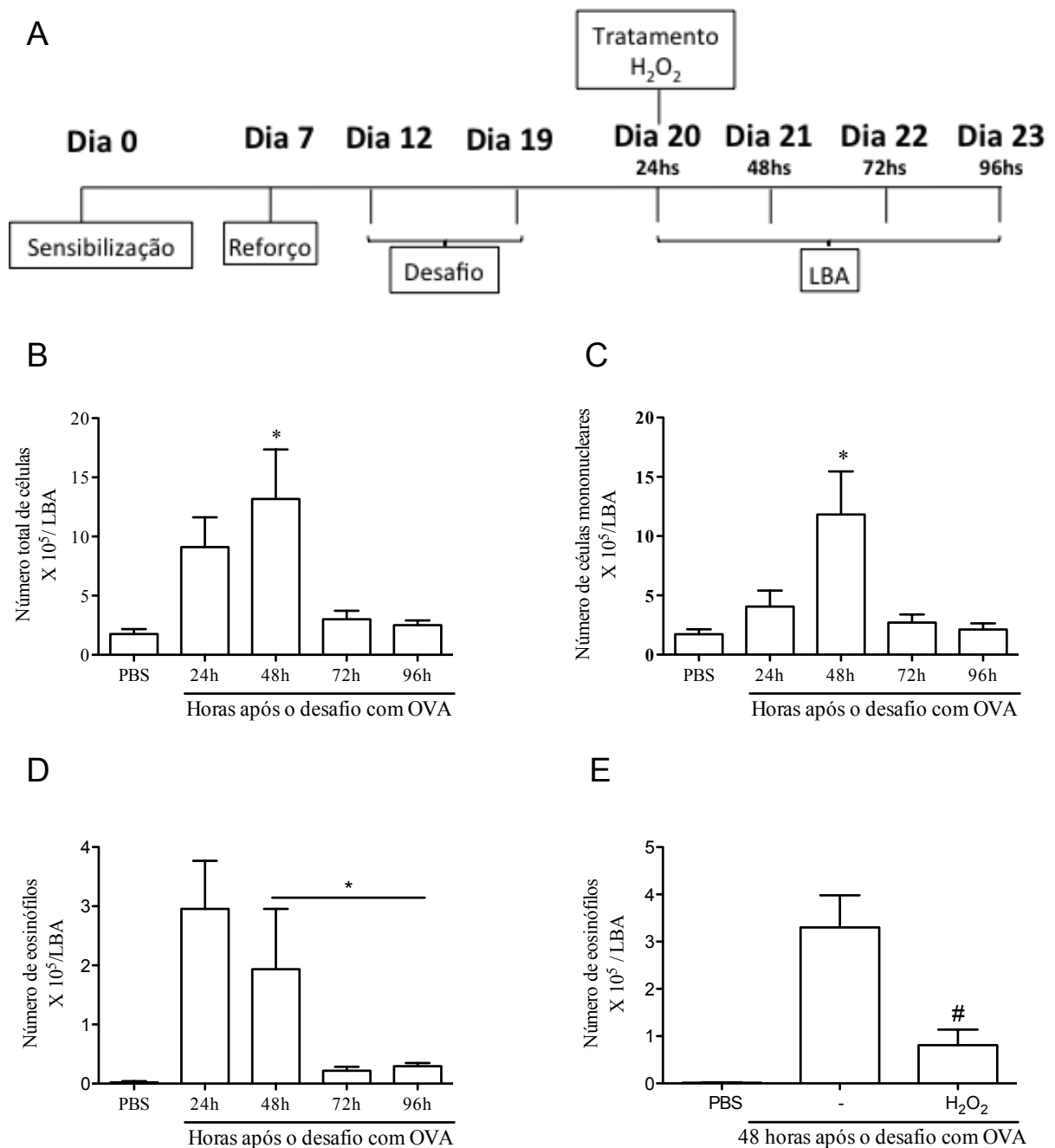


Figura 4. Caracterização da resposta inflamatória após indução de asma em camundongos. O número de leucócitos no LBA foi determinado em diferentes tempos nos camundongos. Em (A) temos o esquema do protocolo experimental, (B) o número total de células, (C) eosinófilos e (D) células mononucleares. O efeito do tratamento com H₂O₂ (0.5M) realizado 24 horas após o desafio com OVA é mostrado em E. Os animais que receberam PBS no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P < 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle (PBS) e # P < 0,05 quando comparados ao grupo tratado veículo (-). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Anteriormente (ver anexo 2), demonstramos que geração de H₂O₂ endógena através do tratamento com SOD e a administração de H₂O₂ reduziu o número de eosinófilos e isso estava associado à um aumento no número de eosinófilos apoptóticos identificados por critérios morfológicos e pela marcação com anexina-V (dados do mestrado - ver Figura 4 do anexo 2). Assim, o próximo passo foi investigar se a apoptose de eosinófilos após incubação com H₂O₂ era dependente de caspase. Para isso, nós realizamos um experimento *in vivo* com zVAD-fmk, um pan-inibidor de caspases administrado juntamente com H₂O₂. Nós observamos que a administração de zVAD-fmk manteve o número de eosinófilos na cavidade broncoalveolar e inibiu as ações pró-apoptóticas de H₂O₂, demonstrando que a morte de eosinófilos foi dependente da ativação de caspase (Figura 5). A morte de eosinófilo, induzida pelo tratamento com H₂O₂ foi associada à ativação de caspase-3 e aumento da exposição de fosfatidilserina, como detectado pela marcação com anexina-V (Figura 6 e 7A). Além disso, as células mononucleares não apresentaram um aumento na ativação de caspase-3 e anexina-V sugerindo que o tratamento com H₂O₂ afetou de maneira específica os eosinófilos no tempo observado. (Figura 6 e Figura 7B e C). Os animais não tratados apresentaram níveis baixos e semelhantes de caspase-3 clivada no citoplasma de eosinófilos e células mononucleares.

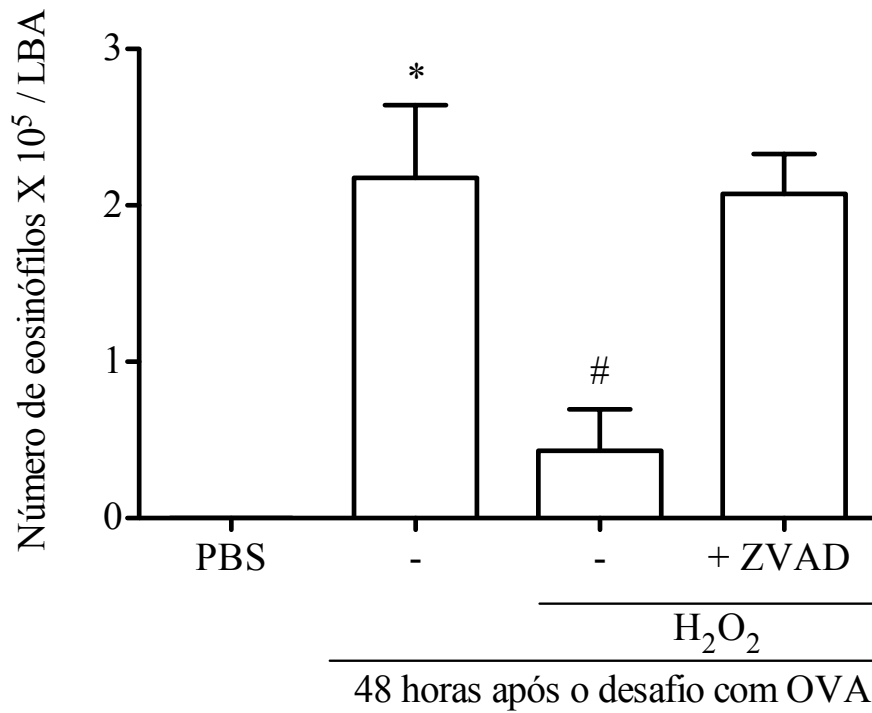


Figura 5. H₂O₂ induz apoptose de eosinófilos *in vivo* de maneira dependente de caspases.

Camundongos selvagens receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM i.n) ou zVAD-fmk (1 mg/kg, i.p) + H₂O₂ (i.n.), ou veículo 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, foi realizado o LBA. Os animais que receberam PBS no desafio foram considerados como grupo controle do experimento* P< 0,05 quando comparados aos animais do grupo controle (PBS) e # P< 0,05 quando comparados ao grupo tratado veículo (-). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

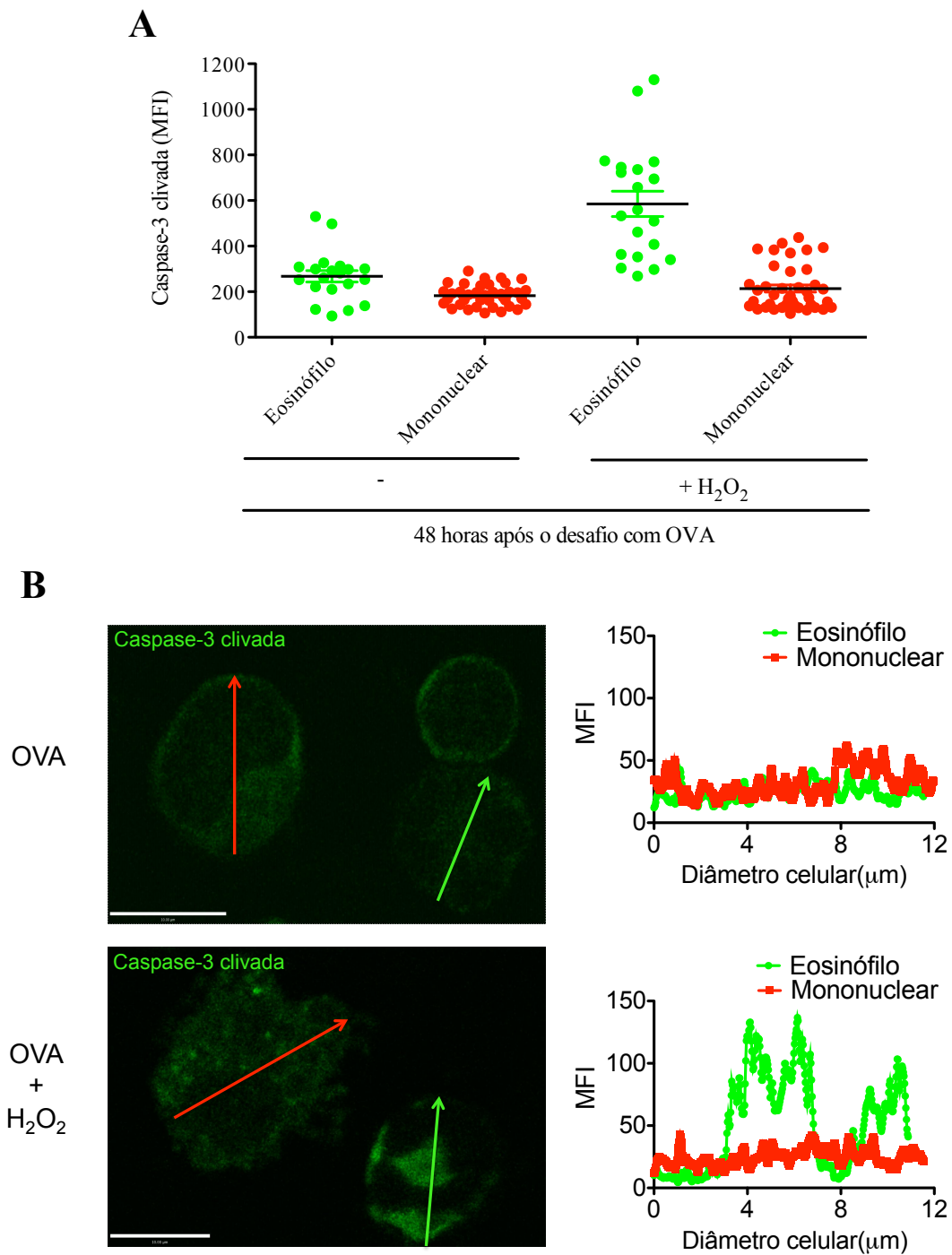


Figura 6. O tratamento com H₂O₂ preferencialmente induz apoptose de eosinófilos. Camundongos selvagens receberam o tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) i.n, ou veículo, 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, a intensidade média de fluorescência foi quantificada nos leucócitos do LBA por microscopia confocal. Em (A) observamos a ativação de caspase-3 clivada nos eosinófilos em comparação com células mononucleares e em (B) o perfil de análise da fluorescência. As setas mostram a região onde o perfil de fluorescência foi mensurado. 60x. Scala = 10μm

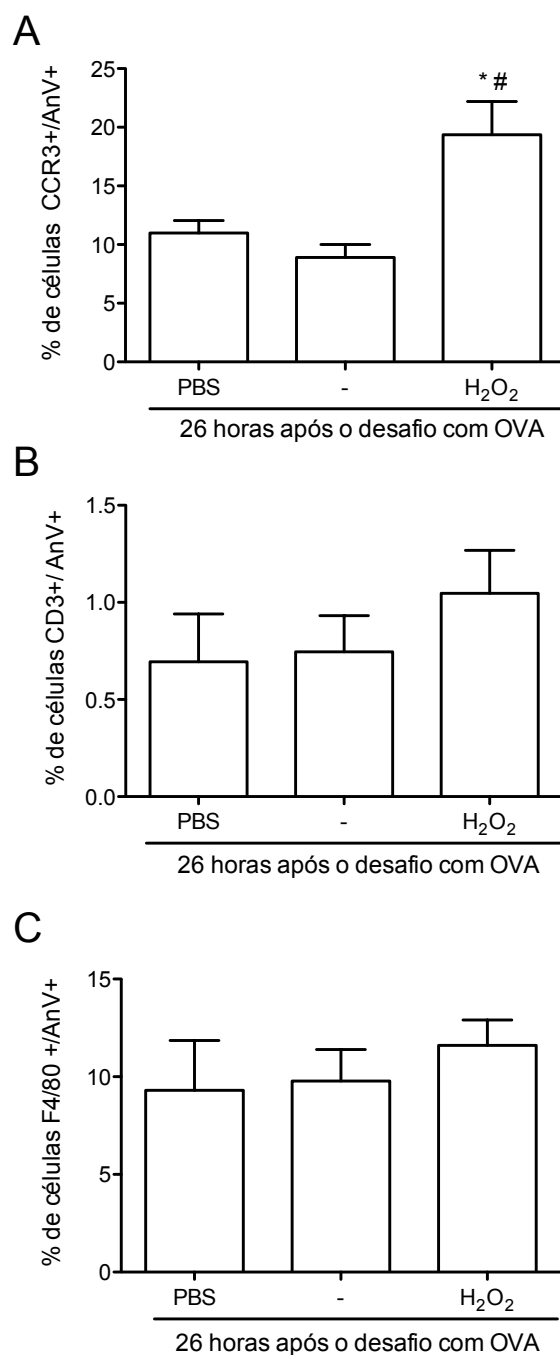


Figura 7. O tratamento com H₂O₂ induz apoptose preferencialmente de eosinófilos. Citometria de fluxo realizada 26h após o desafio com OVA (2h após o tratamento com o H₂O₂). Em (A) temos a porcentagem de células positivas para CCR3 e anexina V (marcação para apoptose de eosinófilos). Em (B) a porcentagem de células positivas para CD3 e anexina V (marcação para apoptose de linfócitos). Em (C) a porcentagem de células positivas para F4/80 e anexina V (marcação para apoptose de macrófagos). Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$ (*) quando comparados aos animais do grupo controle (PBS) e $P < 0,005$ (#) quando comparados aos animais do grupo veículo (-). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Para confirmar se a morte dos eosinófilos foi devido à ação direta do H_2O_2 na célula, nós realizamos experimentos *in vitro* em uma linhagem celular de eosinófilos humanos, Eo1-1. Esta linhagem celular tem sido bem utilizada em modelos de estudo de função de eosinófilos, incluindo quimiotaxia, liberação de mediadores e indução de apoptose por diferentes moléculas [100, 101]. As células Eo1-1 foram incubadas por 2h e 4h com diferentes concentrações de H_2O_2 (0.01, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 e 10 mM). A apoptose foi verificada por análise de citometria de fluxo usando marcação com anexina-V/iodeto de propídio (PI). As células positivas para anexina-V foram consideradas apoptóticas e as células positivas para anexina-V e PI foram consideradas apoptóticas tardias ou necróticas. Observamos que o tratamento com H_2O_2 aumentou significativamente a apoptose de células Eo1-1 dependente da concentração (Figura 8A e 8B). Após estabelecer as melhores concentrações de H_2O_2 para o tratamento da células, o experimento foi repetido no tempos de 4 e 6 h. Observamos que no tempo de 4h e na concentração de 1.0 mM, o H_2O_2 aumentou o número de células apoptóticas com um número menor de células morrendo por necrose (Figura 8 C-F). Por essa razão, esse tempo e concentração de H_2O_2 foram escolhidos para os próximos experimentos.

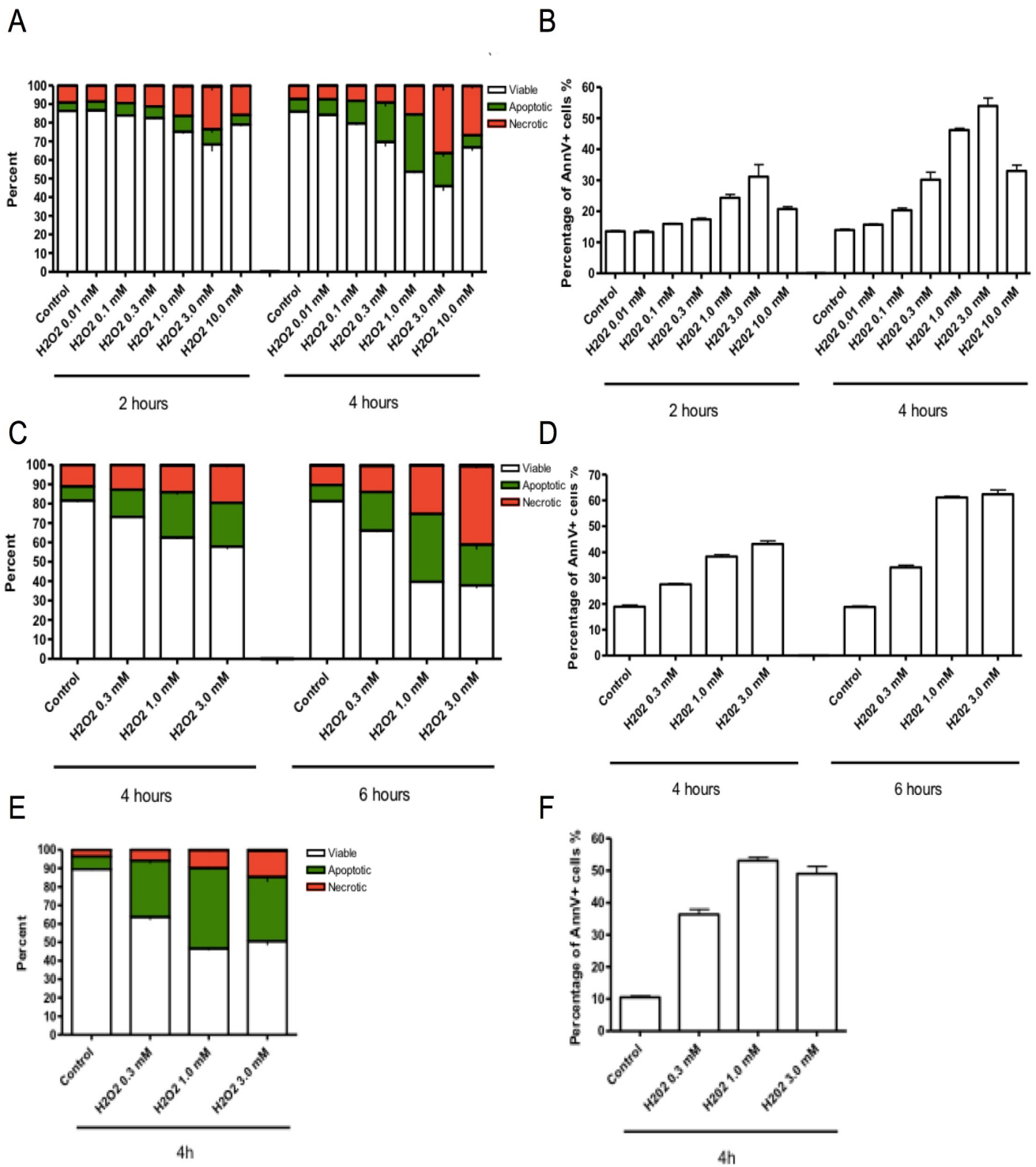


Figura 8. H₂O₂ induz apoptose de células EOL-1. Cultura de Eol-1 com H₂O₂ (0.01 mM–10mM) 2h e 4h. (A) Porcentagem de células positivas para anexina-V após 2h, 4h e 6h de incubação (B, D, F). Cultura de Eol-1 com H₂O₂ (0.3 mM–10.0 mM) 4h e 6h (C). Cultura de Eol-1 com H₂O₂ (0.3 mM–3.0 mM) 4h após incubação. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, n=3

Para verificar se a apoptose de células Eol-1 após incubação com H₂O₂ foi devido à ativação de caspase, Eol-1 foi co-incubada com H₂O₂ e Q-VD-OPh, um pan-inibidor de caspases. A co-incubação de Eol-1 com Q-VD-OPh inibiu o efeito do H₂O₂ na indução de apoptose (Figura 9A-D). Além disso, investigamos a expressão da caspase-3 por *western blot*, em lisados de células Eol 4h após a estimulação com diferentes concentrações de H₂O₂. Nossos resultados mostraram que a incubação de Eol-1 com H₂O₂ aumentou a expressão de caspase-3 clivada (Figura 9E). Avaliamos também a apoptose das células morfológicamente por microscopia de luz após citocentrifugação e coloração com Diff-Quick™. A análise morfológica mostrou que as células Eol-1 tratadas com H₂O₂ apresentaram características apoptóticas tais como condensação da cromatina e encolhimento do núcleo celular, confirmando os dados de citometria de fluxo (Figura 9F).

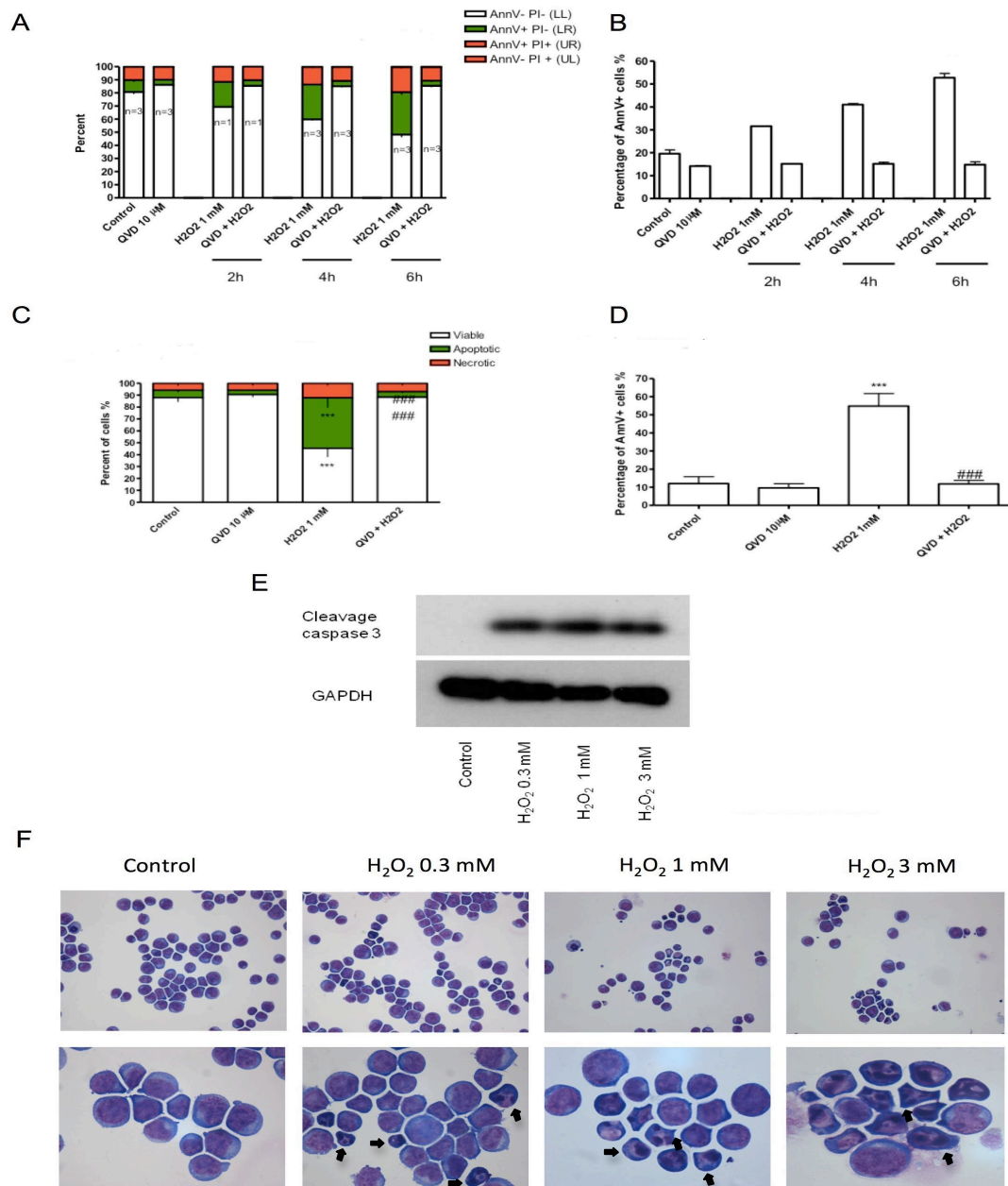


Figura 9. H₂O₂ induz apoptose de células EOL-1 de maneira dependente de caspases. Eol-1 com H₂O₂ (1mM) e Q-VD-OPh (10μM) 2h, 4h e 6h (A) Porcentagem de células positivas para anexina V 2h, 4h e 6h (B) Eol-1 com H₂O₂ (1mM) e Q-VD-OPh (10μM) 4h (C) Porcentagem de células positivas para anexina V analisada no tempo de 4h (D). Western blotting para caspase-3 clivada (17/19kDa) and GAPDH (37kDa) (E). Morfologia de células EOL-1 40x (acima) e 100x (abaixo) (F). As setas mostram células com morfologia apoptótica. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, n=3. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ### p < 0,001 quando comparado ao H₂O₂ (1mM). A figura de *Western blot* é representativa de 3 experimentos independentes.

Objetivo específico 2. Investigar o efeito do tratamento com H₂O₂ no estresse oxidativo.

Para verificar se o tratamento com H₂O₂ induziu estresse oxidativo nas células e se essa modificação poderia ser um mecanismo de indução de morte celular, fizemos ensaios enzimáticos para detecção de glutathiona reduzida (GSH) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no pulmão dos animais desafiados com OVA e após tratamento com o H₂O₂. Os resultados mostram que não houve alteração nos níveis de glutathiona reduzida em nenhum dos grupos estudados (GSH) (Figura 10A). Entretanto, a resposta inflamatória alterou os níveis de TBARS, os quais não foram modificados pelo tratamento com H₂O₂ (Figura 10B). Esses dados em conjunto sugerem que o H₂O₂ não aumenta o dano à membrana lipoproteica e indicam que o uso de H₂O₂ não causa dano às células do parênquima pulmonar. Assim, podemos sugerir que o mecanismo de morte celular induzido pelo tratamento com H₂O₂ não acontece por indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica.

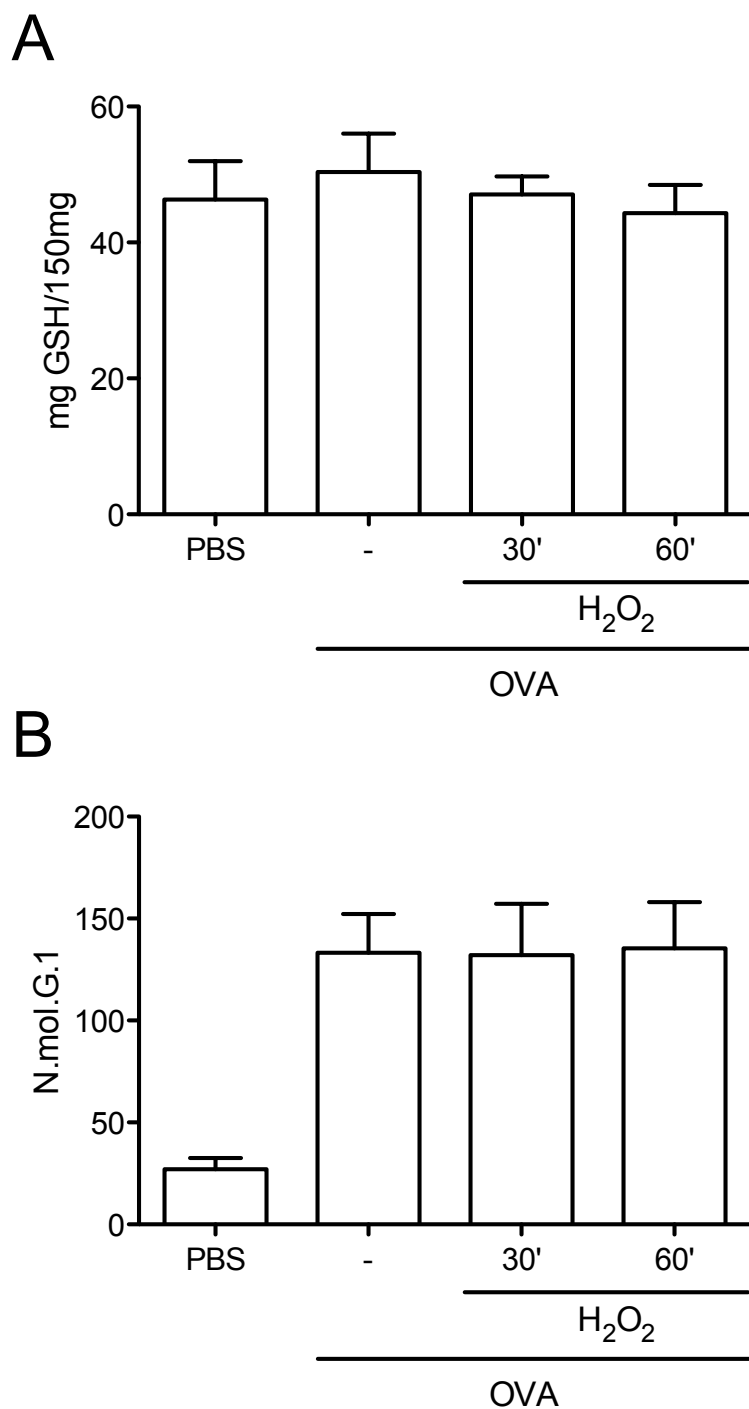


Figura 10. Avaliação do estresse oxidativo após indução de asma em camundongos. Camundongos receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) ou PBS i.n, 24 horas após o desafio com OVA. Após 30 ou 60 minutos, o pulmão foi retirado para análise dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (A) e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B). Os animais que receberam PBS no desafio foram considerados como grupo controle do experimento. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Objetivo específico 3. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na expressão de moléculas envolvidas na sobrevivência de eosinófilos tais como PI3K, MAP kinases e vias de transdução de sinal, principalmente o NfκB.

Uma vez que não houve mudança no balanço oxidante/redutor o próximo passo foi verificar o efeito do H₂O₂ em moléculas já identificadas pelo nosso grupo como importantes para a sobrevivência de leucócitos nos sítios inflamatórios. Inicialmente, tratamos os animais 24 horas após o último desafio com OVA, com os inibidores LY2940002 (inibidor de PI3K), U0126 (inibidor de ERK1/2) e SB203580 (inibidor de P38). O tratamento com os inibidores reduziu o número total de células (Figura 11A), o número de eosinófilos (Figura 11B) e não alterou o número de células mononucleares (Figura 11C). Além disso, foi observado um aumento do número de células apoptóticas no LBA (Figura 11D). O H₂O₂ foi utilizado como controle de nossos experimentos. Esse resultado demonstra a importância dessas vias para a sobrevivência de eosinófilos e para a resolução da resposta inflamatória alérgica.

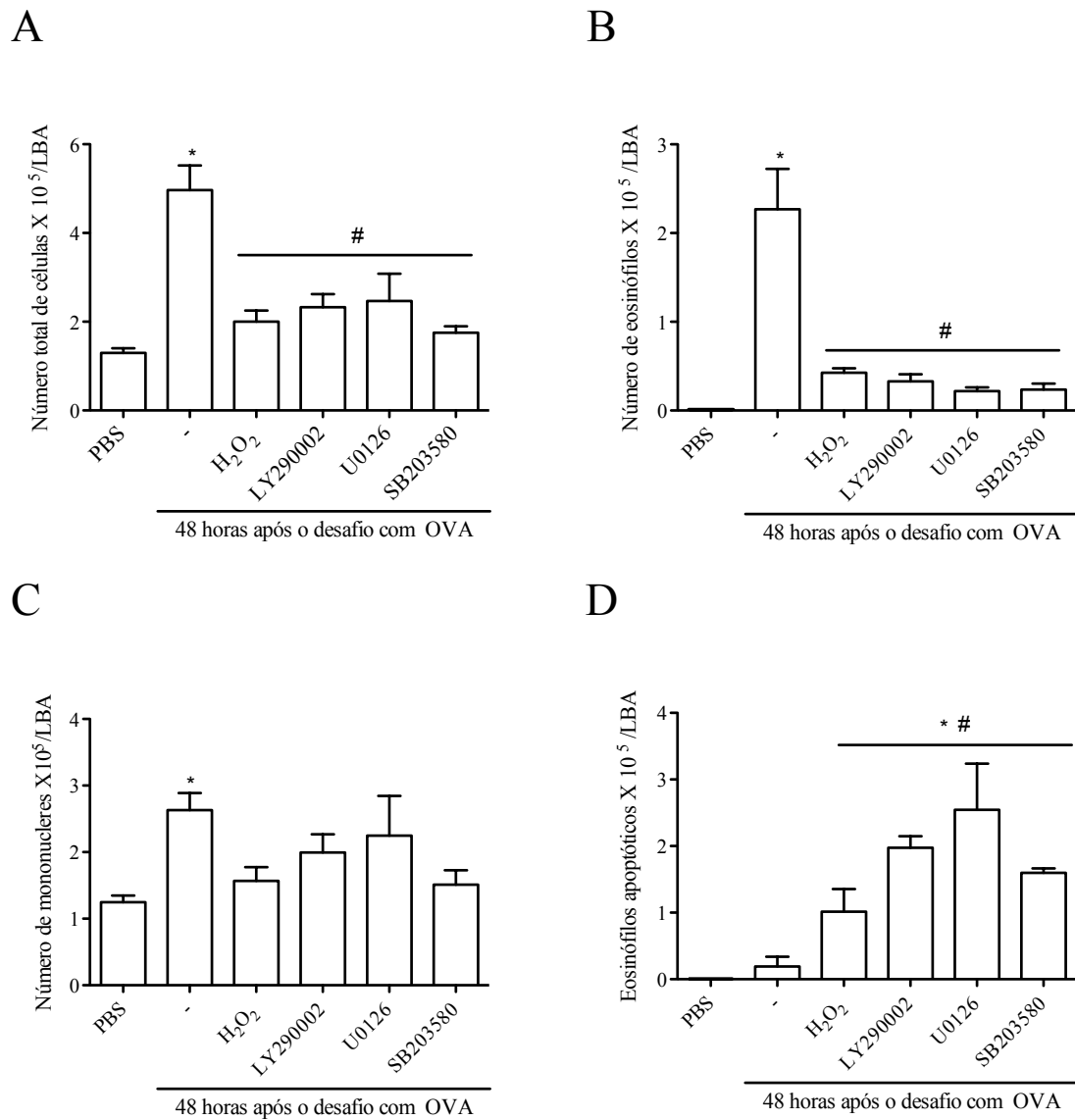


Figura 11. Inibição farmacológica das vias sinalizadoras importantes para a sobrevivência de eosinófilos. Os animais previamente sensibilizados foram desafiados e tratados com os inibidores das vias de sinalização 24 horas após o último desafio. 24 horas depois as células foram recolhidas por LBA. O número total de células (A), eosinófilos viáveis (B), mononucleares (C), eosinófilos apoptóticos (D) foram avaliados em lâminas preparadas em citocentrífugas. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$ (*) quando comparados aos animais do grupo controle (PBS) e $P < 0,05$ (#) quando comparados ao grupo veículo (-). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Sabendo da importância dessas vias para a sobrevivência de eosinófilos e para a resolução da resposta inflamatória alérgica, tratamos os camundongos com H_2O_2 e avaliamos por imunofluorescência e microscopia confocal a ativação das proteínas p44/42 (ERK) e p65 (NFkB) fosforiladas. Nossos resultados mostraram que os eosinófilos dos animais desafiados com OVA apresentaram um aumento na ativação das proteínas p44/42 (ERK) e p65 (NFkB) fosforiladas. Em contrapartida, os eosinófilos de animais tratados com H_2O_2 apresentaram uma redução nos níveis de Pp44/42 e Pp65 ativadas. Além disso, essas células exibiram características apoptóticas quando observadas morfologicamente (Figura 12 e Figura 13).

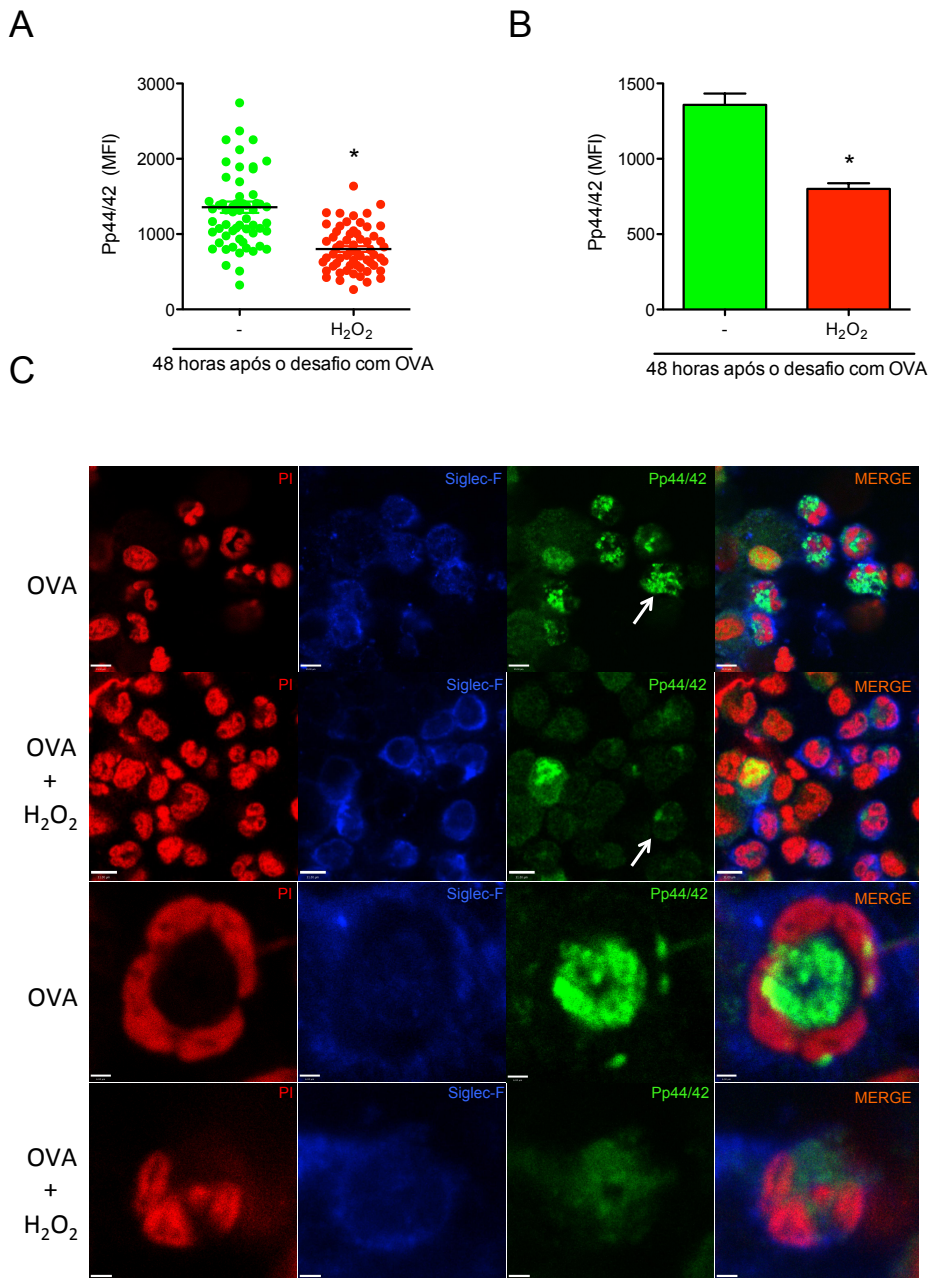


Figura 12. O tratamento com H₂O₂ reduz a ativação de Pp44/42. Camundongos C57 receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) i.n, ou veículo 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, a intensidade média de fluorescência foi quantificada nos eosinófilos do LBA (A-B). Perfil de análise de fluorescência (C) 60x. Seta branca= eosinófilos. PI = iodeto de propídio-marcador de núcleo. Siglec-F= marcador de eosinófilos. Escala: OVA painel superior 29µm, painel inferior 6 µm; OVA+H₂O₂ painel superior 31µm, painel inferior 7 µm. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P < 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle positivo (OVA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

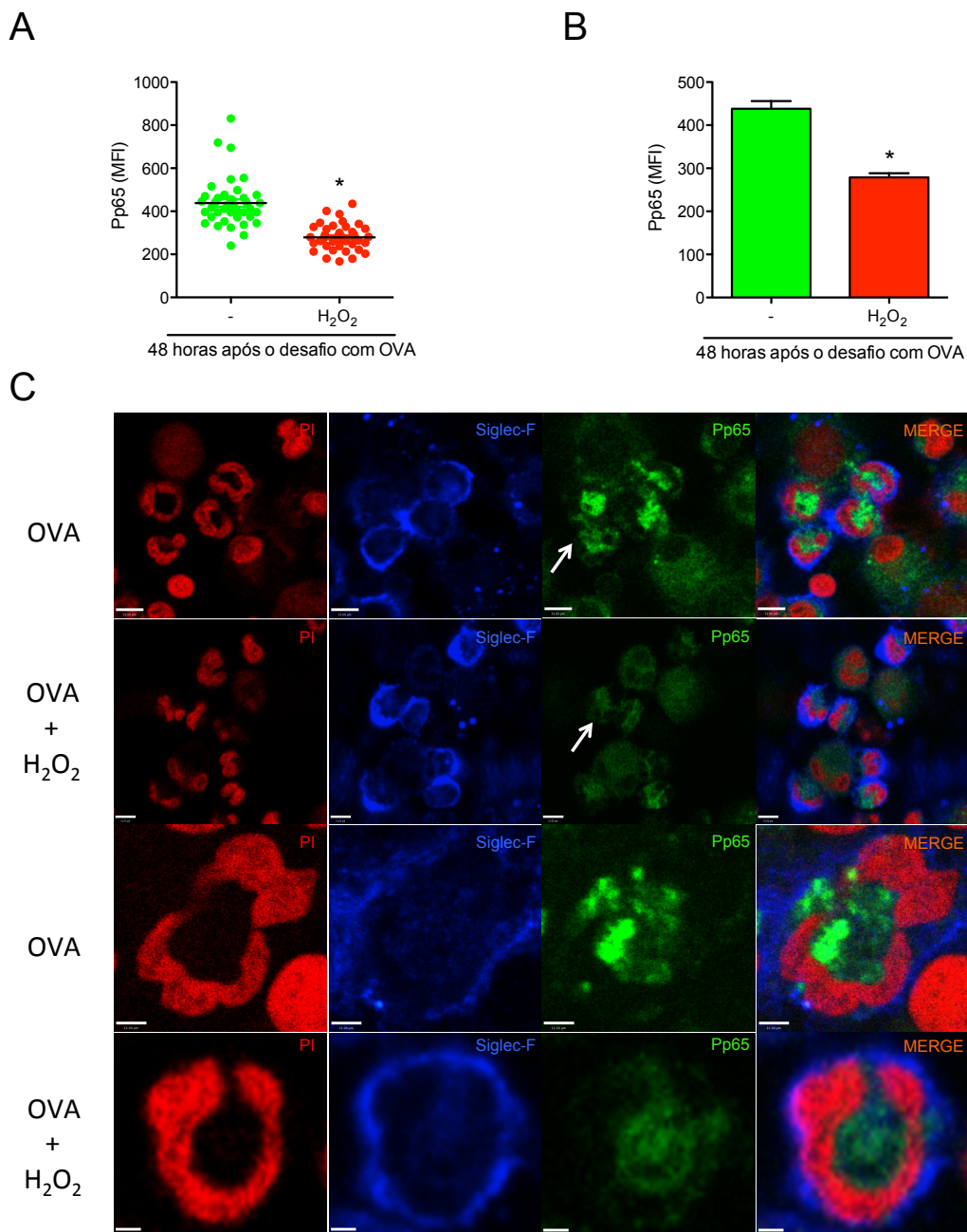


Figura 13. O tratamento com H₂O₂ reduz a ativação de Pp65. Camundongos selvagens receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) i.n, ou veículo 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, a intensidade média de fluorescência foi quantificada nos eosinófilos do LBA (A-B). Perfil de análise de fluorescência (C). 60x. Setas brancas= eosinófilos. PI = iodeto de propídio-marcador de núcleo. Siglec-F= marcador de eosinófilos. Escala = OVA painel superior 31µm, painel inferior 12 µm; OVA+H₂O₂ painel superior 31µm, painel inferior 8 µm. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P < 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle positivo (OVA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Após a apoptose dos leucócitos um evento esperado é o *clearance* dessas células por eferocitose. Para que a eferocitose aconteça é necessário além da morte do leucócito por apoptose, a viabilidade dos macrófagos (ou fagócitos profissionais) no nicho inflamatório [34]. Corroborando com os dados anteriores que mostraram que H₂O₂ não induziu apoptose de macrófagos, observamos que estas células não apresentaram diferença na expressão de vias importantes para sua sobrevivência (Pp44/42 e Pp65) após o tratamento com H₂O₂ (Figura 14 e Figura 15).

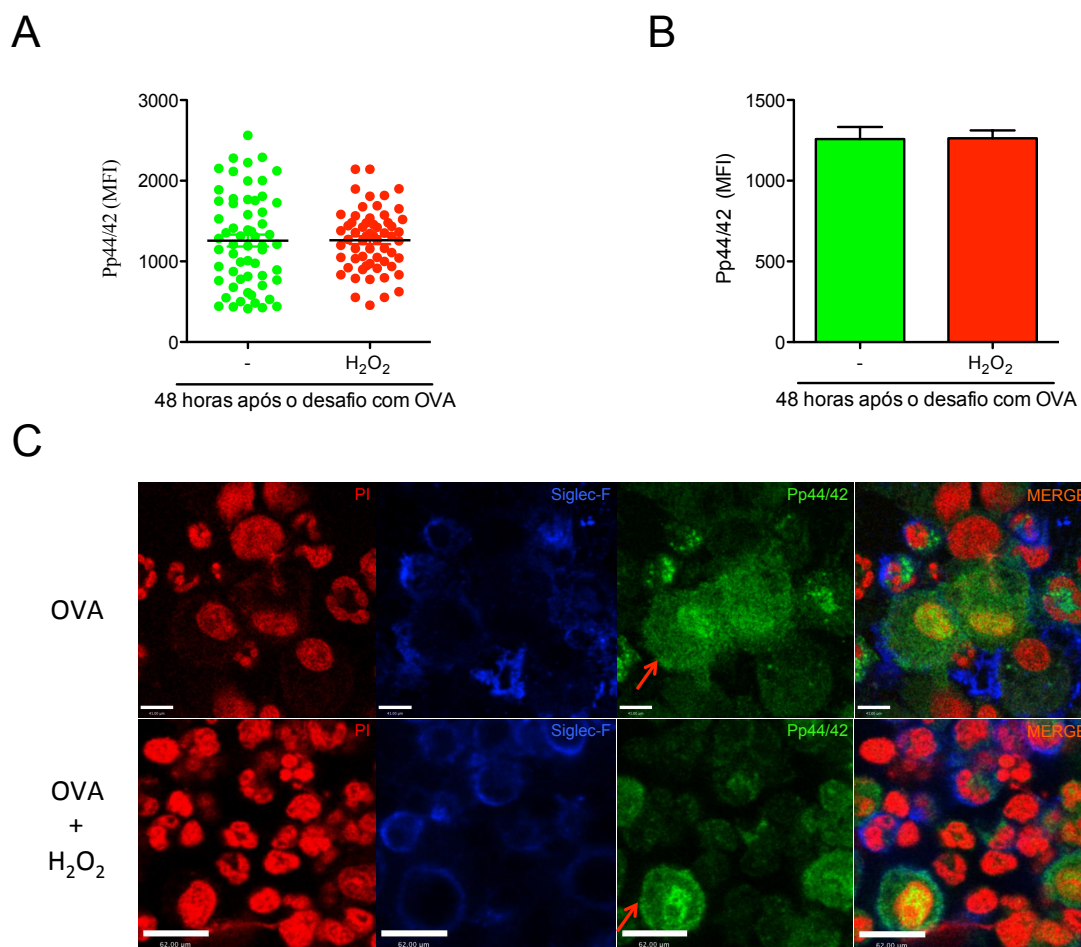


Figura 14. O tratamento com H₂O₂ não modifica a ativação de Pp44/42 nos macrófagos. Camundongos selvagens receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) i.n, ou veículo 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, a intensidade média de fluorescência foi quantificada nos macrófagos do LBA (A-B). Perfil de análise de fluorescência (C). 60x. Setas vermelhas= macrófagos. PI = iodeto de propídio-marcador de núcleo. Siglec-F= marcador de eosinófilos. Escala = OVA 41µm, OVA+H₂O₂=62µm. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P< 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle positivo (OVA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

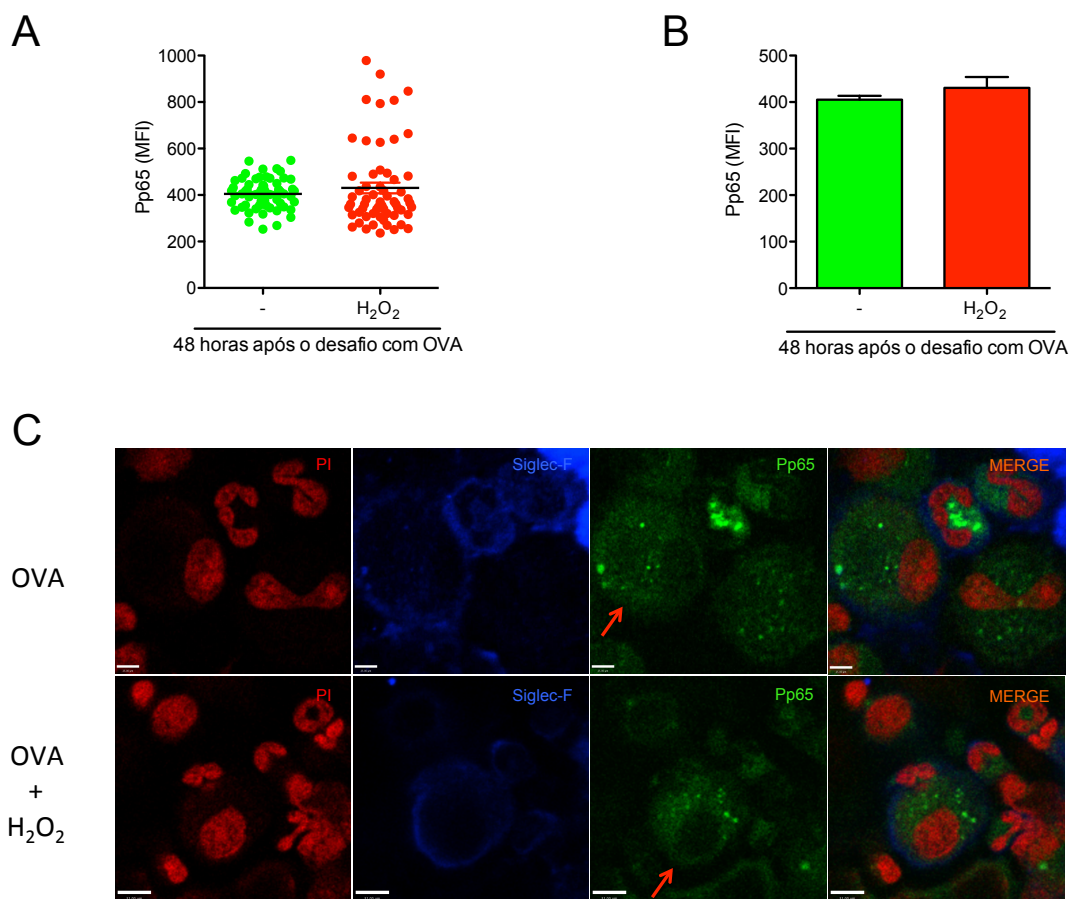


Figura 15. O tratamento com H₂O₂ não modifica a ativação de Pp65 nos macrófagos. Camundongos selvagens receberam tratamento com H₂O₂ (0.5 mM) i.n, ou veículo 24 horas após o desafio com OVA. Após 24 horas do tratamento, a intensidade média de fluorescência foi quantificada nos macrófagos do LBA (A-B). Perfil de análise de fluorescência (C). 60x. Setas vermelhas= macrófagos. PI = iodeto de propídio-marcador de núcleo. Siglec-F= marcador de eosinófilos. Escala = OVA 25µm, OVA+H₂O₂ =31µm. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P< 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle positivo (OVA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Até o momento demonstramos que o tratamento com H_2O_2 foi eficaz em aumentar a apoptose de eosinófilos na inflamação alérgica em camundongos. Entretanto, não sabemos se o tratamento afeta a atividade eferocítica dos macrófagos. O próximo passo foi, então, avaliar a eferocitose de células apoptóticas por macrófagos após o tratamento com H_2O_2 . Para isso, camundongos tratados ou não com H_2O_2 foram injetados com neutrófilos apoptóticos 72h após o desafio com zimosan (1mg/kg i.p). Três horas depois os animais foram eutanasiados e as células foram recuperadas por lavado peritoneal. Observamos um aumento de eferocitose em animais previamente tratados com H_2O_2 que receberam neutrófilos apoptóticos posteriormente (Figura 16). Nesta estratégia experimental, escolhemos trabalhar com neutrófilos pela facilidade da purificação das mesmas de sangue humano, entretanto, não descartamos a possibilidade de avaliar, posteriormente, o efeito do tratamento com H_2O_2 na eferocitose de eosinófilos e/ou da linhagem de células EOL-1. Vale a pena ressaltar que neutrófilos humanos também são sensíveis à morte por apoptose após incubação com H_2O_2 (dados não mostrados). Assim, podemos ressaltar que H_2O_2 induz a apoptose de neutrófilos, não interfere na sobrevivência de macrófagos e aumenta a capacidade eferocítica dessas células, eventos importantes para resolução da inflamação.

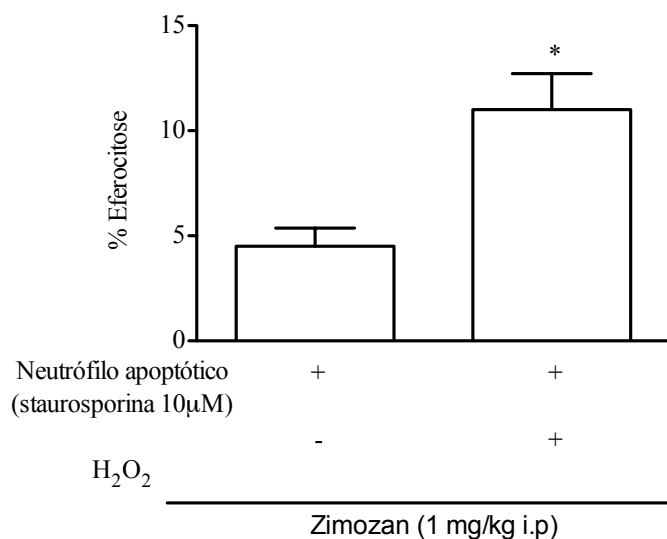


Figura 16. O tratamento com H₂O₂ aumenta a capacidade eferocítica de macrófagos. Animais receberam zimozan i.p (1mg/animal), 30 minutos antes de receberem 2x10⁶ de neutrófilos apoptóticos – a apoptose foi estimulada por staurosporina 10 µM – os animais receberam H₂O₂ 75h após o desafio com zimozan/3h após administração de células apoptóticas os animais foram eutanasiados e as células peritoneais recolhidas para análise morfológica. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$ (*) quando comparados ao grupo que recebeu somente neutrófilos apoptóticos. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 4-6 animais em cada grupo.

Objetivo específico 4. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na função pulmonar através da medida da hiper-reatividade brônquica.

Para verificar se o tratamento com H₂O₂ melhorou a função pulmonar, a hiper-reatividade das vias aéreas (AHR) foi avaliada através da medição da resistência pulmonar (RI) e parâmetros de elastância em resposta à doses crescentes de metacolina (3-81 mg/ml) 48 horas após o desafio com ovalbumina, em animais tratados ou não com H₂O₂. Nossos resultados mostraram que a exposição à OVA aumentou a resistência das vias respiratórias e a elastância nos pulmões em resposta a metacolina inalada quando comparado com o grupo controle desafiado com PBS. Em contrapartida, os animais que receberam o tratamento com H₂O₂ apresentaram menor hiper-reatividade das vias aéreas (Figura 17).

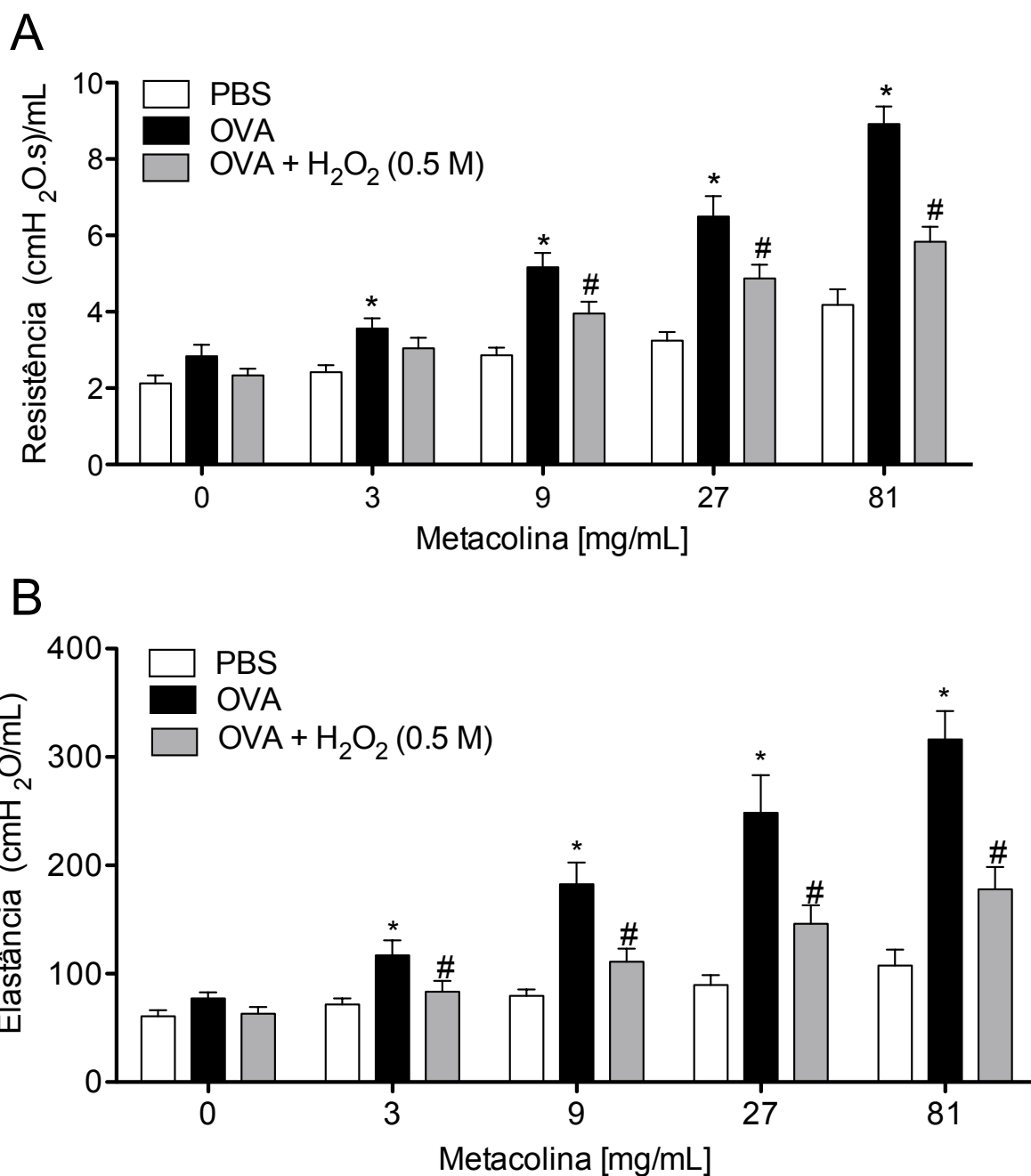


Figura 17. Avaliação da função pulmonar após o tratamento com H₂O₂. Resistência das vias respiratórias e elastância após doses crescentes de metacolina. H₂O₂ (0.5M) ou veículo (30 µl PBS) foram administrados i.n. 24 após a indução da asma. Resistência (A) e elastância (B) das vias aéreas foram mensuradas em resposta ao aumento de doses de metacolina (3, 9, 27, 81mg/mL) 24h após o tratamento. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram P < 0,05 (*) quando comparados aos animais do grupo controle (PBS) e P < 0,05 (#) quando comparados ao grupo veículo (OVA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 10 animais em cada grupo.

A análise do parênquima pulmonar de camundongos desafiados com OVA demonstrou um aumento no infiltrado de eosinófilos em comparação com os camundongos desafiados com PBS (Figura 18A e 18C). Os camundongos desafiados com OVA que receberam tratamento com H_2O_2 , apresentaram redução no infiltrado eosinofílico no parênquima pulmonar 48h após o desafio antigênico (Figura 18A e 18D). Para avaliar a produção de muco, as secções de tecido de pulmão foram coradas com ácido periódico de Schiff. A análise das vias aéreas demonstraram metaplasia de células caliciformes e acúmulo de muco 48h após o último desafio com OVA em camundongos previamente sensibilizados (Figura 18E e 18G). O tratamento com H_2O_2 reduziu o acúmulo de muco induzido por OVA e a porcentagem de células produtoras de muco para valores semelhantes aos observados em camundongos desafiados com PBS (Figura 18E e 18H). As secções pulmonares foram também coradas com tricrômico de Gomori e as análises histológicas demonstraram um aumento de deposição de matriz extracelular na região peribronquiolar em camundongos desafiados com OVA em comparação com os camundongos desafiados com PBS (Figura 18I e 18K). O tratamento com H_2O_2 diminuiu a deposição de matriz extracelular nos camundongos desafiados com OVA (Figura 18I e 18D).

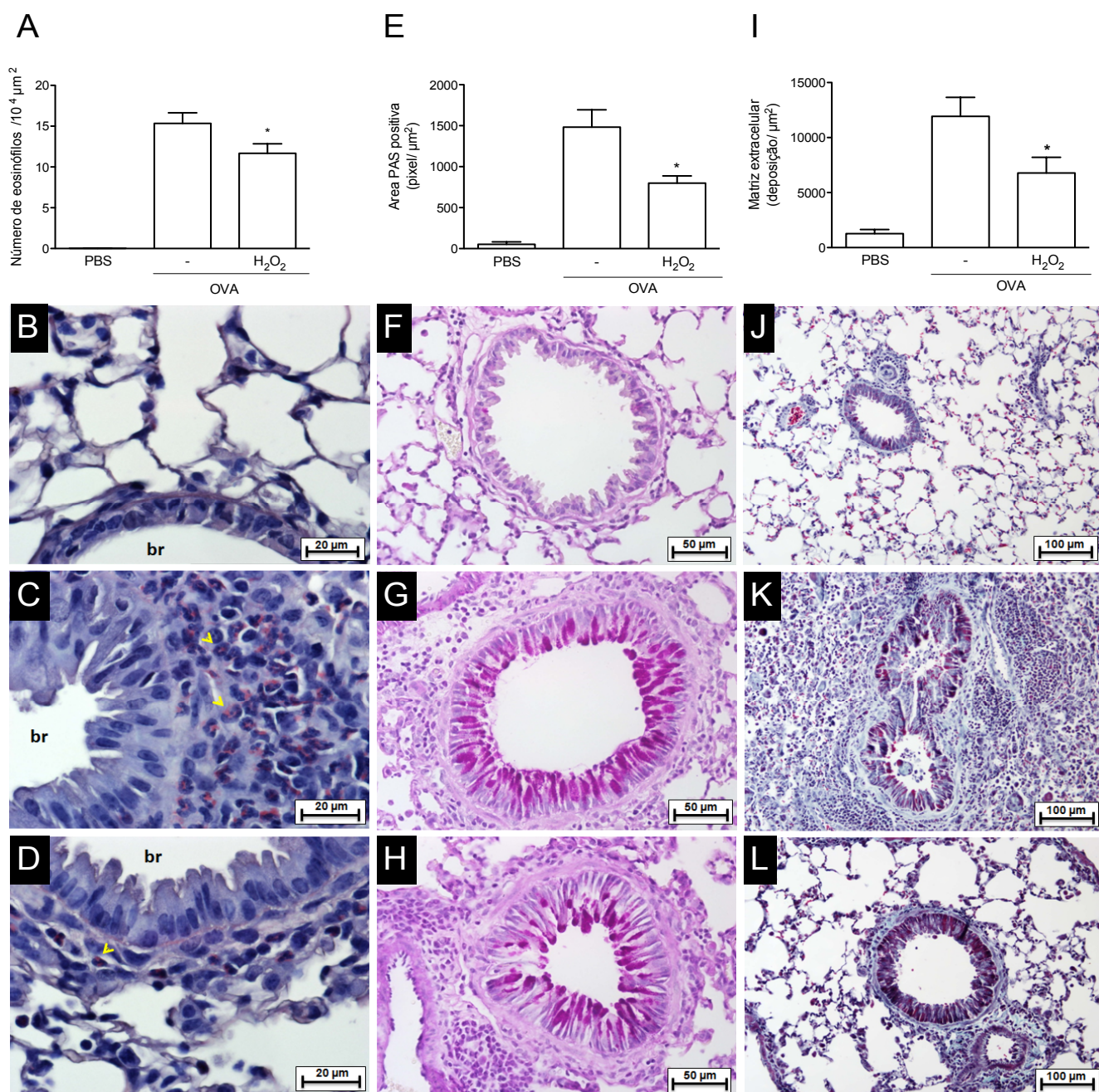


Figura 18. Efeito do H_2O_2 no remodelamento e deposição de muco. Infiltrado de leucócitos na região brônquica pulmonar corados com hematoxilina e eosina (H & E) ou Sirius Red (pH 10,2) (A-D). Produção de muco nas vias aéreas corados com Hematoxilina e ácido periódico de Schiff (PAS) (E-H). 400x. Fibrose peribrônquica corada com hematoxilina e eosina e uma combinação de Gomori (I-L). 200x. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$ (*) quando comparados ao grupo veículo (-). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais em cada grupo.

Objetivo específico 5. Estudar o efeito do tratamento com H₂O₂ na produção das citocinas e quimiocinas inflamatórias potencialmente importantes para aumento da sobrevivência de eosinófilos como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), CCL11, CCL24, fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) e TNF- α .

As respostas inflamatórias alérgicas são coordenadas pela produção de diferentes citocinas, tais como, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF- α , IL-10 e TGF- β e quimiocinas [102-106]. Para verificar o perfil dessas citocinas na resposta inflamatória alérgica após o tratamento com H₂O₂, fizemos ensaios de ELISA no tecido pulmonar. Nossos resultados mostram que a exposição à OVA em camundongos previamente sensibilizados induziu um aumento na produção de CCL11, CCL24, IL-4, IL-5 e TNF- α . Em contrapartida, os resultados mostraram que o tratamento com H₂O₂ diminuiu as concentrações de todas essas citocinas 48 horas após a exposição ao antígeno. Não observamos alteração nos níveis de IL-10, IL-13 e TGF- β neste tempo (Tabela 1). Esses dados também corroboram com os dados de função pulmonar.

Tabela 1. Níveis de citocinas no pulmão (pg/ml).

Citocinas	PBS	OVA	H₂O₂
CCL11	743 ± 152	9109 ± 5063*	5845 ± 2048 [#]
CCL24	903 ± 245	11956 ± 6304*	6896 ± 1143 [#]
IL-4	110 ± 32	238 ± 149*	127 ± 34 [#]
IL-5	847 ± 84	1226 ± 445*	829 ± 140 [#]
IL-10	671 ± 80	447 ± 128	484 ± 68
IL-13	809 ± 137	938 ± 109	793 ± 131
TNF- α	182 ± 41	310 ± 135*	157 ± 45 [#]
TGf- β	540 ± 73	493 ± 57	487 ± 91

* diferença significativa com o grupo controle ($p < 0,05$)

[#] diferença significativa com o grupo veículo ($p < 0,05$)

Mean \pm SD

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

IL-4 = interleucina 4

IL-5 = interleucina 5

DISCUSSÃO

No processo inflamatório, para que haja um mínimo de dano tecidual um programa de resolução precisa ser ativado. Assim, o entendimento das vias específicas envolvidas na permanência de leucócitos no tecido é de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias capazes de interferir na resposta inflamatória. Já é sabido que o H_2O_2 é um importante mediador pró- inflamatório [107]. Entretanto, nosso trabalho demonstra que espécies reativas de oxigênio podem ter um papel pró-resolutivo, atuando no controle do acúmulo de leucócitos durante uma resposta inflamatória alérgica. Esta hipótese é apoiada pelos seguintes achados: (i) H_2O_2 acelera a resolução de inflamação das vias aéreas através da apoptose de eosinófilos em camundongos e aumento da eferocitose; (ii) H_2O_2 induz a apoptose de uma linhagem de eosinófilos humanos (células EOL-1); (iii) H_2O_2 diminui a secreção de muco, a deposição de matriz extracelular, a produção de citocinas inflamatórias com consequente melhora da função pulmonar; (iv) H_2O_2 inibe proteínas importantes para sobrevivência de leucócitos.

Em nosso estudo, constatamos que a administração exógena de H_2O_2 no pico da resposta inflamatória diminui o número de eosinófilos viáveis e aumenta o número de eosinófilos em apoptose em um modelo experimental de asma alérgica, adiantando o processo de resolução. A estratégia utilizada de realizar o tratamento no pico de acúmulo de eosinófilos é muito importante uma vez que, na clínica, não se sabe quando o paciente irá inflamar e quando este procura atendimento médico a inflamação já está instalada. É conhecido que a ativação de caspases iniciadoras e efetoras é essencial para desencadeamento da apoptose [39]. Neste trabalho, demonstramos que o tratamento com o inibidor de caspases zVAD-fmk impediu a apoptose e a resolução da inflamação eosinofílica. Demonstramos também que eosinófilos de camundongos tratados com H_2O_2 apresentaram um aumento na expressão de caspase-3. Estes resultados mostram que a

morte celular induzida pelo H_2O_2 é dependente da ativação de caspase-3. Em conjunto, esses dados confirmaram os dados de análise morfológica e são consistentes com nossos estudos anteriores que mostraram que a administração de H_2O_2 no pico da inflamação aumenta o acúmulo de proteínas pró-apoptóticas e caspase-3 no modelo de artrite induzida por antígeno [67]. Demonstramos também que H_2O_2 induziu apoptose em células Eo1-1, linhagem eosinofílica humana e em neutrófilos purificados de sangue humano (dados não mostrados), sugerindo que H_2O_2 tem efeito direto no leucócito, podendo ser relevante para tratar doenças alérgicas humanas. Contudo, temos que testar esse efeito em eosinófilos purificados de sangue humano ou de fluidos de lavado bronco-alveolar.

Após a apoptose um evento esperado é a remoção dessas células apoptóticas por eferocitose. Para que a eferocitose aconteça é necessário que os macrófagos permaneçam viáveis e ativados no nicho inflamatório [34]. Nós mostramos em nosso trabalho que H_2O_2 induziu morte seletiva em eosinófilos. Células mononucleares como linfócitos e macrófagos permaneceram viáveis após o tratamento com H_2O_2 . Além disso, observamos que o tratamento com H_2O_2 aumentou a capacidade eferocítica dos macrófagos. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da eferocitose para resolução da resposta inflamatória. A eferocitose mantém a homeostase do tecido por executar a remoção e degradação das células em apoptose e proteger as células adjacentes do conteúdo altamente inflamatório e imunogênico das células que morrem [108]. Algumas moléculas tem se mostrado eficazes em otimizar essa forma de *clearance* celular como a anexina A1 e resolvinas [56, 63, 98, 109-111].

Já foi demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ROS) são liberadas durante a resposta inflamatória e regulam a sobrevivência celular [77] estando envolvidas na apoptose de neutrófilos [67, 112]. Em células em repouso, os componentes do complexo enzimático NADPH oxidase estão distribuídos no citosol e na membrana plasmática.

Quando a célula é ativada, os componentes citosólicos migram para a membrana plasmática, onde se associam aos componentes da membrana. Essa associação ativa a NADPH oxidase que produz ROS. Animais deficientes na subunidade de membrana gp91^{phox} da NADPH oxidase (que possuem a NADPH oxidase não funcional) apresentam uma resposta inflamatória prolongada [67, 113]. Em contraste, a administração exógena de SOD, enzima que gera H₂O₂, ou ainda do próprio H₂O₂ acelera a resolução da inflamação e resulta em um maior número de eosinófilos apoptóticos nos modelos de asma e pleurisia alérgica (Anexo 2- Figura 2 e Figura suplementar 2). Além disso, dados recentes do nosso grupo mostraram que o tratamento com catalase, enzima que degrada H₂O₂ em H₂O e O₂, atrasa a resolução da inflamação [67, 113]. O mesmo efeito foi observado em neutrófilos no modelo de artrite induzida por antígeno [67, 113]. Além disso, H₂O₂ induz a apoptose em células epiteliais [80], células endoteliais [81], hepatócitos humanos [83] e miócitos [114]. ROS poderia estar ativando a via de apoptose através da abertura dos poros de permeabilidade da membrana mitocondrial (MMPP) forçando a liberação de citocromo c que leva a ativação intrínseca de caspases [115]. Esses dados ressaltam um novo papel para as ROS durante o curso de uma resposta inflamatória: participar do controle da inflamação. Esse papel duplo, inflamatório e pró-resolutivo, já foi descrito para alguns mediadores lipídicos incluindo as prostaglandinas [116-118]. Assim, término adequado da inflamação está associado à um início adequado da resposta inflamatória, ou seja, a produção de mediadores pró-inflamatórios governam o processo de resolução.

O H₂O₂ promove a resolução da resposta inflamatória por induzir apoptose em eosinófilos, entretanto, os mecanismos pelos quais isso acontece são desconhecidos. Uma grande variedade de estímulos pode desencadear a apoptose, dentre esses o estresse oxidativo [119]. O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de ROS e anti-oxidantes [120]. Em condições de estresse oxidativo as células

apresentam dois mecanismos de defesa antioxidante importantes: um tampão redutor tiol, a glutatona GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) e um sistema enzimático composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) [121]. Uma queda na concentração de GSH celular tem sido relatada como sendo um evento precoce na cascata apoptótica induzidas por receptores de morte [122], sinalização apoptótica mitocondrial [123] e o estresse oxidativo [124]. Além disso, na presença de ROS, os fosfolípidos da membrana celular podem sofrer degradação por peroxidação resultando em mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana, perda da seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, dentre eles, o malondialdeído (MDA) e tendo como consequência a morte celular [115, 125]. Assim, verificamos se o mecanismo de indução de morte celular através do tratamento com H_2O_2 aconteceu por indução de estresse oxidativo nas células. Os resultados mostraram que não houve alteração no balanço oxidante/redutor e o tratamento com H_2O_2 não aumentou o dano à membrana plasmática uma vez que os níveis de glutatona reduzida (GSH) e TBARS não sofreram nenhuma alteração. Esse resultado sugere que H_2O_2 não promove a apoptose dos eosinófilos por induzir estresse oxidativo ou peroxidação de lípidos da membrana celular.

Outro mecanismo associado à indução de apoptose de leucócitos é a inibição das vias intracelulares que estimulam ou mantêm a sobrevivência celular. Em leucócitos, algumas vias de sobrevivência são dependentes da ativação da PI3K/PKB/Akt, MAPK-ERK1/2 e MAPK-P38. Estas vias acabam convergindo para ativação do fator de transcrição NF- κ B, importante fator de transcrição associado à manutenção da sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios [126]. De fato, já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, utilizando o modelo de inflamação induzida na pleura, que a via de sinalização estimulada por PI3K é importante para a permanência de leucócitos na cavidade pleural

[85]. Além disso, inibição de PKB/Akt pode contribuir para a resolução da resposta inflamatória [127]. Já foi demonstrado que H_2O_2 é necessário para a resolução natural da inflamação neutrofílica e o seu aumento (exógeno ou endógeno) inibe a ativação da via da PI3K/NF- κ B induzindo a apoptose de neutrófilos [67]. [96]. A inibição de outra via de sinalização importante na sobrevivência celular ERK1/2, também já foi demonstrado estar envolvida com o processo de resolução em um modelo de pleurisia [128]. Neste trabalho mostramos que a inibição de vias de transdução de sinal PI3K/Akt, MAPk-ERK1/2 e MAPK-P38, realmente, adiantou a resolução da inflamação eosinofílica através da indução de apoptose e o tratamento com H_2O_2 interferiu na fosforilação de p44/42 (ERK 1/2) e p65 (subunidade de ativação de NF- κ B). Portanto, H_2O_2 resolve a inflamação eosinofílica no modelo experimental de asma através da inibição de vias de sobrevivência como MAPK e fatores de transcrição como NF- κ B, resultando na morte programada de eosinófilos.

Durante uma resposta inflamatória aguda, nosso organismo desencadeia um elaborado mecanismo de resolução. Entretanto, a perpetuação da resposta inflamatória pode causar lesões irreversíveis no parênquima do órgão. Uma das principais consequências de uma resolução adequada da resposta inflamatória é manutenção da função do órgão afetado. Para que o tecido pulmonar retorne à homeostase é necessário que ocorra uma diminuição acentuada nos níveis de citocinas como IL-4, IL-5 e TNF- α e quimiocinas como CCL11 e CCL24, consideradas essenciais para o desenvolvimento de hiper-reatividade, produção de muco e de fibrose na asma [129-133]. Nossos resultados mostram que o tratamento com H_2O_2 reduziu estas citocinas e quimiocinas inflamatórias, o acúmulo de eosinófilos, a deposição de muco, a hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas. Em conjunto estes dados sugerem que a inibição de vias de sobrevivência, a diminuição do número de eosinófilos e conseqüente redução na produção e expressão de citocinas e quimiocinas podem ser um dos mecanismos pelo qual o tratamento com H_2O_2

diminui a hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas mantendo a função pulmonar.

CONCLUSÃO E RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS

Em suma, os dados apresentados neste trabalho claramente apontam para um efeito pró-resolutivo de H_2O_2 na inflamação alérgica, por induzir a apoptose de eosinófilos e inibir vias associadas à sobrevivência celular. De maneira importante, H_2O_2 mantém a integridade e função do tecido. Estes resultados podem ter implicações fundamentais para o conceito básico de resolução da inflamação e pode ter implicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- [1] C. Gabay, I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *The New England journal of medicine*, 340 (1999) 448-454.
- [2] C.A. Dinarello, Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 11 (1997) 91-103.
- [3] A.L. Katzenstein, J.L. Myers, Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157 (1998) 1301-1315.
- [4] L. Fialkow, Y. Wang, G.P. Downey, Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function, *Free radical biology & medicine*, 42 (2007) 153-164.
- [5] K.F. Chung, Inflammatory biomarkers in severe asthma, *Current opinion in pulmonary medicine*, 18 (2012) 35-41.
- [6] S.N. Mandhane, J.H. Shah, R. Thennati, Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects, *International immunopharmacology*, 11 (2011) 1646-1662.
- [7] H.F. McFarland, R. Martin, Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity, *Nature immunology*, 8 (2007) 913-919.
- [8] T. Van-Assche, V. Huygelen, M.J. Crabtree, C. Antoniades, Gene therapy targeting inflammation in atherosclerosis, *Current pharmaceutical design*, 17 (2011) 4210-4223.
- [9] M.B. Duran-Salgado, A.F. Rubio-Guerra, Diabetic nephropathy and inflammation, *World journal of diabetes*, 5 (2014) 393-398.
- [10] R. Medzhitov, Inflammation 2010: new adventures of an old flame, *Cell*, 140 (2010) 771-776.
- [11] F.W. Luscinskas, S. Ma, A. Nusrat, C.A. Parkos, S.K. Shaw, Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair, *Seminars in immunology*, 14 (2002) 105-113.
- [12] T. Lawrence, D.W. Gilroy, Chronic inflammation: a failure of resolution?, *International journal of experimental pathology*, 88 (2007) 85-94.
- [13] W.A. Muller, Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82 (2002) 521-533.
- [14] D. Schulte, V. Kuppers, N. Dartsch, A. Broermann, H. Li, A. Zarbock, O. Kamenyeva, F. Kiefer, A. Khandoga, S. Massberg, D. Vestweber, Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability, *The EMBO journal*, 30 (2011) 4157-4170.
- [15] N.D. Burg, M.H. Pillinger, The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity, *Clinical immunology*, 99 (2001) 7-17.
- [16] P.J. Cooper, M.E. Chico, M.G. Vaca, A. Rodriguez, N.M. Alcantara-Neves, B. Genser, L.P. de Carvalho, R.T. Stein, A.A. Cruz, L.C. Rodrigues, M.L. Barreto, Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study), *BMC pulmonary medicine*, 6 (2006) 24.
- [17] A.B. Kay, The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma, *Trends in molecular medicine*, 11 (2005) 148-152.
- [18] S.T. Holgate, The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma, *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 57 (2008) 1-10.
- [19] M.A. Giembycz, M.A. Lindsay, Pharmacology of the eosinophil, *Pharmacological reviews*, 51 (1999) 213-340.
- [20] J.J. Lee, E.A. Jacobsen, S.I. Ochkur, M.P. McGarry, R.M. Condjella, A.D. Doyle, H. Luo, K.R. Zellner, C.A. Protheroe, L. Willetts, W.E. Lesuer, D.C. Colbert, R.A. Helters, P. Lacy, R. Moqbel, N.A. Lee, Human versus mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red", *The Journal of allergy and clinical immunology*, 130 (2012) 572-584.
- [21] D.C. Cara, D. Negrao-Correa, M.M. Teixeira, Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo, *Histology and histopathology*, 15 (2000) 899-920.

- [22] P. Lacy, R. Moqbel, Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation, *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 1 (2001) 79-84.
- [23] P.H. Howarth, The cellular basis for allergic rhinitis, *Allergy*, 50 (1995) 6-10.
- [24] K.M. Leiferman, A role for eosinophils in atopic dermatitis, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45 (2001) S21-24.
- [25] S. Bonini, L. Magrini, G. Rotiroti, A. Lambiase, M. Tomassini, C. Rumi, S. Bonini, The eosinophil and the eye, *Allergy*, 52 (1997) 44-47.
- [26] A.B. Kay, The role of T lymphocytes in asthma, *Chemical immunology and allergy*, 91 (2006) 59-75.
- [27] R. Afshar, B.D. Medoff, A.D. Luster, Allergic asthma: a tale of many T cells, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38 (2008) 1847-1857.
- [28] K.T. Nouri-Aria, S.R. Durham, Regulatory T cells and allergic disease, *Inflammation & allergy drug targets*, 7 (2008) 237-252.
- [29] E.A. Jacobsen, R.A. Helmers, J.J. Lee, N.A. Lee, The expanding role(s) of eosinophils in health and disease, *Blood*, 120 (2012) 3882-3890.
- [30] P.C. Fulkerson, M.E. Rothenberg, Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond, *Nature reviews. Drug discovery*, 12 (2013) 117-129.
- [31] S.J. Wilson, H.M. Rigden, J.A. Ward, M. Laviolette, N.N. Jarjour, R. Djukanovic, The relationship between eosinophilia and airway remodelling in mild asthma, *Bju Int*, 112 (2013) 1342-1350.
- [32] T. Luna-Gomes, P.T. Bozza, C. Bandeira-Melo, Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators, *Frontiers in pharmacology*, 4 (2013) 27.
- [33] J.M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, C.N. Serhan, Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes, *Nature*, 447 (2007) 869-874.
- [34] K.S. Ravichandran, U. Lorenz, Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal, *Nature reviews. Immunology*, 7 (2007) 964-974.
- [35] D.W. Gilroy, T. Lawrence, M. Perretti, A.G. Rossi, Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 401-416.
- [36] P.C. Ho, D.J. Saville, S. Wanwimolruk, Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 4 (2001) 217-227.
- [37] C.M. Lahorte, J.L. Vanderheyden, N. Steinmetz, C. Van de Wiele, R.A. Dierckx, G. Slegers, Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 31 (2004) 887-919.
- [38] S. Cory, J.M. Adams, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature reviews. Cancer*, 2 (2002) 647-656.
- [39] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (2013) a008656.
- [40] S.M. Best, Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row, *Annual review of microbiology*, 62 (2008) 171-192.
- [41] C. Nathan, A. Ding, Nonresolving inflammation, *Cell*, 140 (2010) 871-882.
- [42] C.N. Serhan, J. Savill, Resolution of inflammation: the beginning programs the end, *Nature immunology*, 6 (2005) 1191-1197.
- [43] A. Mantovani, A. Sica, M. Locati, Macrophage polarization comes of age, *Immunity*, 23 (2005) 344-346.
- [44] J. Bystrom, J.A. Wray, M.C. Sugden, M.J. Holness, K.E. Swales, T.D. Warner, M.L. Edin, D.C. Zeldin, D.W. Gilroy, D. Bishop-Bailey, Endogenous epoxygenases are modulators of monocyte/macrophage activity, *PloS one*, 6 (2011) e26591.
- [45] S.K. Biswas, A. Mantovani, Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm, *Nature immunology*, 11 (2010) 889-896.

- [46] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature reviews. Immunology*, 8 (2008) 958-969.
- [47] A. Mantovani, S.K. Biswas, M.R. Galdiero, A. Sica, M. Locati, Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling, *The Journal of pathology*, 229 (2013) 176-185.
- [48] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends in immunology*, 23 (2002) 549-555.
- [49] S. Gordon, P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nature reviews. Immunology*, 5 (2005) 953-964.
- [50] M. Locati, A. Mantovani, A. Sica, Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity, *Advances in immunology*, 120 (2013) 163-184.
- [51] F.O. Martinez, L. Helming, S. Gordon, Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, *Annual review of immunology*, 27 (2009) 451-483.
- [52] S. Gordon, F.O. Martinez, Alternative activation of macrophages: mechanism and functions, *Immunity*, 32 (2010) 593-604.
- [53] M. Rossol, H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M.J. Sweet, S. Hauschildt, LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages, *Critical reviews in immunology*, 31 (2011) 379-446.
- [54] S.E. Headland, L.V. Norling, *The resolution of inflammation: Principles and challenges*, *Seminars in immunology*, (2015).
- [55] A. Ortega-Gomez, M. Perretti, O. Soehnlein, Resolution of inflammation: an integrated view, *EMBO molecular medicine*, 5 (2013) 661-674.
- [56] Y.Y. Liang, T. Arnold, A. Michlmayr, D. Rainprecht, B. Perticevic, A. Spittler, R. Oehler, Serum-dependent processing of late apoptotic cells for enhanced efferocytosis, *Cell death & disease*, 5 (2014) e1264.
- [57] I.K. Poon, C.D. Lucas, A.G. Rossi, K.S. Ravichandran, Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential, *Nature reviews. Immunology*, 14 (2014) 166-180.
- [58] M.R. Elliott, K.S. Ravichandran, Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease, *The Journal of cell biology*, 189 (2010) 1059-1070.
- [59] I.K. Poon, M.D. Hulett, C.R. Parish, Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance, *Cell death and differentiation*, 17 (2010) 381-397.
- [60] K.S. Ravichandran, Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums, *The Journal of experimental medicine*, 207 (2010) 1807-1817.
- [61] S. Gordon, Alternative activation of macrophages, *Nature reviews. Immunology*, 3 (2003) 23-35.
- [62] C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21 (2007) 325-332.
- [63] J. Dalli, C.N. Serhan, Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators, *Blood*, 120 (2012) e60-72.
- [64] F.O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati, Macrophage activation and polarization, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13 (2008) 453-461.
- [65] P. Maderna, S. Yona, M. Perretti, C. Godson, Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26), *Journal of immunology*, 174 (2005) 3727-3733.
- [66] A.L. Alessandri, L.P. Sousa, C.D. Lucas, A.G. Rossi, V. Pinho, M.M. Teixeira, Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development, *Pharmacol Ther*, 139 (2013) 189-212.
- [67] F. Lopes, F.M. Coelho, V.V. Costa, E.L. Vieira, L.P. Sousa, T.A. Silva, L.Q. Vieira, M.M. Teixeira, V. Pinho, Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis, *Arthritis and rheumatism*, 63 (2011) 2651-2660.

- [68] N. Andina, S. Conus, E.M. Schneider, M.F. Fey, H.U. Simon, Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils, *Cell death and differentiation*, 16 (2009) 1248-1255.
- [69] C. Bandeira-Melo, P.T. Bozza, P.F. Weller, The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 109 (2002) 393-400.
- [70] L.C. Borish, J.W. Steinke, 2. Cytokines and chemokines, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111 (2003) S460-475.
- [71] J.W. Steinke, L. Borish, 3. Cytokines and chemokines, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117 (2006) S441-445.
- [72] P.M. Murphy, The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors, *Annual review of immunology*, 12 (1994) 593-633.
- [73] T.A. Wynn, Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *The Journal of pathology*, 214 (2008) 199-210.
- [74] C.M. Lilly, P.G. Woodruff, C.A. Camargo, Jr., H. Nakamura, J.M. Drazen, E.S. Nadel, J.P. Hanrahan, Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 104 (1999) 786-790.
- [75] O. Leavy, Inflammation: Regulating ROS, *Nature reviews. Immunology*, 14 (2014) 357.
- [76] K. Yasui, A. Baba, Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation, *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 55 (2006) 359-363.
- [77] C.H. Wong, K.B. Iskandar, S.K. Yadav, J.L. Hirpara, T. Loh, S. Pervaiz, Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation, *PLoS one*, 5 (2010) e9996.
- [78] O. Sareila, T. Kelkka, A. Pizzolla, M. Hultqvist, R. Holmdahl, NOX2 complex-derived ROS as immune regulators, *Antioxidants & redox signaling*, 15 (2011) 2197-2208.
- [79] B.H. Segal, M.J. Grimm, A.N. Khan, W. Han, T.S. Blackwell, Regulation of innate immunity by NADPH oxidase, *Free radical biology & medicine*, 53 (2012) 72-80.
- [80] G.J. Gardiner, S.N. Deffitt, S. McLetchie, L. Perez, C.C. Walline, J.S. Blum, A Role for NADPH Oxidase in Antigen Presentation, *Frontiers in immunology*, 4 (2013) 295.
- [81] S. Hussain, L.C. Thomassen, I. Ferecatu, M.C. Borot, K. Andreau, J.A. Martens, J. Fleury, A. Baeza-Squiban, F. Marano, S. Boland, Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells, *Particle and fibre toxicology*, 7 (2010) 10.
- [82] W.T. Fang, H.J. Li, L.S. Zhou, Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide, *Acta pharmacologica Sinica*, 31 (2010) 485-492.
- [83] S.J. Kim, H.J. Jung, D.H. Hyun, E.H. Park, Y.M. Kim, C.J. Lim, Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells, *Biochimie*, 92 (2010) 927-932.
- [84] Y. Wang, K.D. Park, C. Salome, S.M. Wilson, J.P. Stables, R. Liu, R. Khanna, H. Kohn, Development and characterization of novel derivatives of the antiepileptic drug lacosamide that exhibit far greater enhancement in slow inactivation of voltage-gated sodium channels, *ACS chemical neuroscience*, 2 (2011) 90-106.
- [85] V. Pinho, D.G. Souza, M.M. Barsante, F.P. Hamer, M.S. De Freitas, A.G. Rossi, M.M. Teixeira, Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation, *Journal of leukocyte biology*, 77 (2005) 800-810.
- [86] A.L. Alessandri, R. Duffin, A.E. Leitch, C.D. Lucas, T.A. Sheldrake, D.A. Dorward, N. Hirani, V. Pinho, L.P. de Sousa, M.M. Teixeira, J.F. Lyons, C. Haslett, A.G. Rossi, Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation, *PLoS one*, 6 (2011) e25683.
- [87] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M.H. Cobb, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocrine reviews*, 22 (2001) 153-183.

- [88] B. Kaminska, MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits, *Biochimica et biophysica acta*, 1754 (2005) 253-262.
- [89] R.C. Russo, C.C. Garcia, L.S. Barcelos, M.A. Rachid, R. Guabiraba, E. Roffe, A.L. Souza, L.P. Sousa, M. Mirolo, A. Doni, G.D. Cassali, V. Pinho, M. Locati, M.M. Teixeira, Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice, *Journal of leukocyte biology*, 89 (2011) 269-282.
- [90] M.S. Hayden, S. Ghosh, NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions, *Genes & development*, 26 (2012) 203-234.
- [91] G. Bonizzi, M. Karin, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends in immunology*, 25 (2004) 280-288.
- [92] D.G. Souza, A.T. Vieira, V. Pinho, L.P. Sousa, A.A. Andrade, C.A. Bonjardim, M. McMillan, M. Kahn, M.M. Teixeira, NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury, *British journal of pharmacology*, 145 (2005) 246-254.
- [93] M.F. Serra, E.A. Anjos-Valotta, P.C. Olsen, G.C. Couto, P.B. Jurgilas, A.C. Cotias, C.R. Pao, T.P. Ferreira, A.C. Arantes, A.L. Pires, R.S. Cordeiro, P.M. Silva, M.A. Martins, Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma, *Anesthesiology*, 117 (2012) 580-591.
- [94] R. Duffin, A.E. Leitch, T.A. Sheldrake, J.M. Hallett, C. Meyer, S. Fox, A.L. Alessandri, M.C. Martin, H.J. Brady, M.M. Teixeira, I. Dransfield, C. Haslett, A.G. Rossi, The CDK inhibitor, Roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1, *FEBS letters*, 583 (2009) 2540-2546.
- [95] M. Strath, D.J. Warren, C.J. Sanderson, Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors, *Journal of immunological methods*, 83 (1985) 209-215.
- [96] L.P. Sousa, A.F. Carmo, B.M. Rezende, F. Lopes, D.M. Silva, A.L. Alessandri, C.A. Bonjardim, A.G. Rossi, M.M. Teixeira, V. Pinho, Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB, *Biochemical pharmacology*, 78 (2009) 396-405.
- [97] J. Newson, M. Stables, E. Karra, F. Arce-Vargas, S. Quezada, M. Motwani, M. Mack, S. Yona, T. Audzevich, D.W. Gilroy, Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity, *Blood*, 124 (2014) 1748-1764.
- [98] J. Dalli, C.P. Jones, D.M. Cavalcanti, S.H. Farsky, M. Perretti, S.M. Rankin, Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26 (2012) 387-396.
- [99] C.R. Bezerra-Santos, A. Vieira-de-Abreu, G.C. Vieira, J.R. Filho, J.M. Barbosa-Filho, A.L. Pires, M.A. Martins, H.S. Souza, C. Bandeira-Melo, P.T. Bozza, M.R. Piuvezam, Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma, *International immunopharmacology*, 13 (2012) 148-155.
- [100] C.K. Wong, C.Y. Ho, C.W. Lam, J.P. Zhang, N.M. Hjelm, Differentiation of a human eosinophilic leukemic cell line, EoL-1: characterization by the expression of cytokine receptors, adhesion molecules, CD95 and eosinophilic cationic protein (ECP), *Immunology letters*, 68 (1999) 317-323.
- [101] J.S. Lee, E.J. Yang, I.S. Kim, The roles of MCP-1 and protein kinase C delta activation in human eosinophilic leukemia EoL-1 cells, *Cytokine*, 48 (2009) 186-195.
- [102] M.S. Wilson, T.A. Wynn, Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation, *Mucosal immunology*, 2 (2009) 103-121.
- [103] T.A. Wynn, Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm, *Nature reviews. Immunology*, 4 (2004) 583-594.
- [104] C.M. Lloyd, C.M. Hawrylowicz, Regulatory T cells in asthma, *Immunity*, 31 (2009) 438-449.

- [105] P.J. Barnes, Role of GATA-3 in allergic diseases, *Current molecular medicine*, 8 (2008) 330-334.
- [106] T.A. Wynn, Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases, *The Journal of clinical investigation*, 117 (2007) 524-529.
- [107] L.A. O'Neill, A critical role for citrate metabolism in LPS signalling, *The Biochemical journal*, 438 (2011) e5-6.
- [108] S.G. Kimani, K. Geng, C. Kasikara, S. Kumar, G. Sriram, Y. Wu, R.B. Birge, Contribution of Defective PS Recognition and Efferocytosis to Chronic Inflammation and Autoimmunity, *Frontiers in immunology*, 5 (2014) 566.
- [109] J. Dall'Aglio, A.P. Consalvo, V. Ray, C. Di Filippo, M. D'Amico, N. Mehta, M. Perretti, Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor, *J Immunol*, 190 (2013) 6478-6487.
- [110] H.N. Lee, Y.J. Surh, Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis, *Biochem Pharmacol*, 86 (2013) 759-769.
- [111] S.C. Frasch, D.L. Bratton, Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation, *Prog Lipid Res*, 51 (2012) 199-207.
- [112] S. Dupre-Crochet, M. Erard, O. Nubetae, ROS production in phagocytes: why, when, and where?, *Journal of leukocyte biology*, 94 (2013) 657-670.
- [113] A.C. Reis, A.L. Alessandri, R.M. Athayde, D.A. Perez, J.P. Vago, T.V. Avila, T.P. Ferreira, A.C. de Arantes, S. Coutinho Dde, M.A. Rachid, L.P. Sousa, M.A. Martins, G.B. Menezes, A.G. Rossi, M.M. Teixeira, V. Pinho, Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation, *Cell death & disease*, 6 (2015) e1632.
- [114] Y.X. Wang, Y.M. Zheng, ROS-dependent signaling mechanisms for hypoxic Ca²⁺ responses in pulmonary artery myocytes, *Antioxidants & redox signaling*, 12 (2010) 611-623.
- [115] B.E. Oyinloye, A.F. Adenowo, A.P. Kappo, Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases, *Pharmaceuticals*, 8 (2015) 151-175.
- [116] R. Torres, C. Picado, F. de Mora, The PGE₂-EP₂-mast cell axis: An antiasthma mechanism, *Molecular immunology*, (2014).
- [117] T. Aoki, S. Narumiya, Prostaglandins and chronic inflammation, *Trends in pharmacological sciences*, 33 (2012) 304-311.
- [118] J. Korbecki, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, D. Chlubek, The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid, *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 64 (2013) 409-421.
- [119] M.L. Circu, T.Y. Aw, Glutathione and modulation of cell apoptosis, *Biochimica et biophysica acta*, 1823 (2012) 1767-1777.
- [120] K. Aquilano, S. Baldelli, M.R. Ciriolo, Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant, *Frontiers in pharmacology*, 5 (2014) 196.
- [121] M. Jozefczak, T. Remans, J. Vangronsveld, A. Cuyppers, Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses, *International journal of molecular sciences*, 13 (2012) 3145-3175.
- [122] R. Franco, J.A. Cidlowski, Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell death and differentiation*, 16 (2009) 1303-1314.
- [123] A. Di Stefano, S. Frosali, A. Leonini, A. Ettore, R. Priora, F.C. Di Simplicio, P. Di Simplicio, GSH depletion, protein S-glutathionylation and mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization are early events in initiation of cell death induced by a mixture of isothiazolinones in HL60 cells, *Biochimica et biophysica acta*, 1763 (2006) 214-225.
- [124] M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free radical biology & medicine*, 48 (2010) 749-762.
- [125] A. Ayala, M.F. Munoz, S. Arguelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014 (2014) 360438.

- [126] A.P. Cope, Signal transduction pathways in chronic inflammatory rheumatic diseases, *The open rheumatology journal*, 6 (2012) 207-208.
- [127] L.P. Sousa, F. Lopes, D.M. Silva, L.P. Tavares, A.T. Vieira, B.M. Rezende, A.F. Carmo, R.C. Russo, C.C. Garcia, C.A. Bonjardim, A.L. Alessandri, A.G. Rossi, V. Pinho, M.M. Teixeira, PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner, *J Leukoc Biol*, 87 (2010) 895-904.
- [128] D.A. Sawatzky, D.A. Willoughby, P.R. Colville-Nash, A.G. Rossi, The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo, *The American journal of pathology*, 168 (2006) 33-41.
- [129] Y. Sumi, Q. Hamid, Airway remodeling in asthma, *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 56 (2007) 341-348.
- [130] P.S. Foster, A.W. Mould, M. Yang, J. Mackenzie, J. Mattes, S.P. Hogan, S. Mahalingam, A.N. McKenzie, M.E. Rothenberg, I.G. Young, K.I. Matthaei, D.C. Webb, Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung, *Immunological reviews*, 179 (2001) 173-181.
- [131] J.M. Lora, D.M. Zhang, S.M. Liao, T. Burwell, A.M. King, P.A. Barker, L. Singh, M. Keaveney, J. Morgenstern, J.C. Gutierrez-Ramos, A.J. Coyle, C.C. Fraser, Tumor necrosis factor-alpha triggers mucus production in airway epithelium through an IkappaB kinase beta-dependent mechanism, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 36510-36517.
- [132] F. Huaux, M. Gharaee-Kermani, T. Liu, V. Morel, B. McGarry, M. Ullenbruch, S.L. Kunkel, J. Wang, Z. Xing, S.H. Phan, Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis, *The American journal of pathology*, 167 (2005) 1485-1496.
- [133] M. Yang, S.P. Hogan, S. Mahalingam, S.M. Pope, N. Zimmermann, P. Fulkerson, L.A. Dent, I.G. Young, K.I. Matthaei, M.E. Rothenberg, P.S. Foster, Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112 (2003) 935-943.

ANEXO 1

Protocolo CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 218/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Papel da formação de espécies reativas de oxigênio na apoptose de eosinófilos in vivo: importância para resolução da resposta inflamatória associada à pleurisia e à asma induzida em camundongos**", que tem como responsável(is) **Vanessa Pinho da Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 09/2011**.

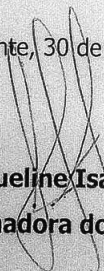
Este certificado expira-se em **28/ 09/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 218/2011**, related to the project entitled "**Role of the training of reactive oxygen species in the apoptosis of eosinophils in vivo: importance for resolution of the inflammatory response associated with pleurisy and asthma induced in mice**", under the supervisors of **Vanessa Pinho da Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 28, 2011**.

This certificate expires in **September 28, 2016**.

Belo Horizonte, 30 de Setembro de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

OPEN

Citation: *Cell Death and Disease* (2015) 6, e1632; doi:10.1038/cddis.2014.580
 © 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/15
 www.nature.com/cddis



Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation

AC Reis^{1,2,8}, AL Alessandri^{3,8}, RM Athayde^{1,2}, DA Perez^{1,2}, JP Vago⁴, TV Ávila⁵, TP T Ferreira⁶, ACS de Arantes⁶, D de Sá Coutinho⁶, MA Rachid⁷, LP Sousa⁴, MA Martins⁵, GB Menezes¹, AG Rossi³, MM Teixeira² and V Pinho^{*,1,2}

Eosinophils are effector cells that have an important role in the pathogenesis of allergic disease. Defective removal of these cells likely leads to chronic inflammatory diseases such as asthma. Thus, there is great interest in understanding the mechanisms responsible for the elimination of eosinophils from inflammatory sites. Previous studies have demonstrated a role for certain mediators and molecular pathways responsible for the survival and death of leukocytes at sites of inflammation. Reactive oxygen species have been described as proinflammatory mediators but their role in the resolution phase of inflammation is poorly understood. The aim of this study was to investigate the effect of reactive oxygen species in the resolution of allergic inflammatory responses. An eosinophilic cell line (Eo1) was treated with hydrogen peroxide and apoptosis was measured. Allergic inflammation was induced in ovalbumin sensitized and challenged mouse models and reactive oxygen species were administered at the peak of inflammatory cell infiltrate. Inflammatory cell numbers, cytokine and chemokine levels, mucus production, inflammatory cell apoptosis and peribronchiolar matrix deposition was quantified in the lungs. Resistance and elastance were measured at baseline and after aerosolized methacholine. Hydrogen peroxide accelerates resolution of airway inflammation by induction of caspase-dependent apoptosis of eosinophils and decrease remodeling, mucus deposition, inflammatory cytokine production and airway hyperreactivity. Moreover, the inhibition of reactive oxygen species production by apocynin or in *gp91^{phox}-/-* mice prolonged the inflammatory response. Hydrogen peroxide induces Eo1 apoptosis *in vitro* and enhances the resolution of inflammation and improves lung function *in vivo* by inducing caspase-dependent apoptosis of eosinophils.

Cell Death and Disease (2015) 6, e1632; doi:10.1038/cddis.2014.580; published online 12 February 2015

Eosinophils express numerous receptors and secrete a wide variety of inflammatory mediators that influence many innate and adaptive immune responses. These multifunctional cells are important in the defense against helminth infection and are involved in the pathogenesis of many eosinophilic dominant allergic diseases.¹ High levels of eosinophil granule proteins (such as major basic protein (MBP)) have been found in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma and evidence indicates that high-concentration granule products have contributed to the development of airway hyperreactivity (AHR), a cardinal feature of asthma.² Asthma is an inflammatory disease of the airways with participation of many cell types including leukocytes especially eosinophils and lymphocytes.^{3,4} Activation of these cells (mainly lymphocytes) leads to the release of proinflammatory mediators and cytokines such as leukotriene B₄, interleukin-4 (IL-4),

interleukin-5 (IL-5), interleukin-9 (IL-9), interleukin-13 (IL-13) and colony-stimulating factor granulocyte-macrophage (GM-CSF).^{3,5-7} Investigations using preclinical animal models of asthma and clinical studies in patients with asthma have demonstrated that the presence of eosinophils in the lungs are associated with epithelial damage, goblet cell hyperplasia, smooth muscle hypertrophy and airway hyperresponsiveness resulting in airflow limitation which can be fatal.^{3,8-10} Recently, anti-IL-5 treatment has been shown to ameliorate lung function in patients with eosinophilic asthma.¹¹

Apoptosis of leukocytes is regarded as an important process for the successful resolution of inflammatory responses. Reduced eosinophil apoptosis in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid has been shown to correlate positively with severity of asthma.^{3,12-14} Indeed, defective leukocyte apoptosis and subsequent removal of apoptotic cells by

¹Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Medical Research Council Centre for Inflammation Research, The Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK; ⁴Laboratório de Sinalização na Inflamação, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁵Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁶Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ⁷Laboratório de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

*Corresponding author: V Pinho, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil. Tel/Fax: +55 31 3409 2996; E-mail: vpinho@icb.ufmg.br

⁸These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; MBP, eosinophil granule proteins; AHR, airway hyperreactivity; ROS, reactive oxygen species; RNS, Reactive nitrogen species; OVA, ovalbumin; EPO, eosinophil peroxidase

Received 01.8.14; revised 07.11.14; accepted 19.11.14; Edited by G Amarante-Mendes

phagocytes is thought to be important for the initiation and propagation of chronic inflammatory diseases such as asthma.¹⁵ Therefore, a balance in the tissue microenvironment between pro- and antiapoptotic signals is likely to greatly influence the load of eosinophils in the asthmatic lung.¹⁶ Thus, there is a great interest in understanding the mechanisms responsible for the elimination of eosinophils and other leukocytes and inactivation of proinflammatory mediators in inflammatory sites.¹⁷

Several molecular pathways have been shown to modulate the survival and death of leukocytes at sites of inflammation, including reactive oxygen species (ROS).¹⁸ ROS are a family of molecules containing oxygen and includes hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide O₂⁻, hydroxyl radical (OH) and nitric oxide (NO).¹⁹ In inflammatory conditions, ROS are increased as they help in neutralizing invading organisms during infection either directly or indirectly by formation of extracellular traps (ETs).²⁰ ROS have traditionally been regarded as quintessentially proinflammatory. However, evidence for ROS-mediated anti-inflammatory actions has been described.²¹ The importance for ROS production in the context of infection can be exemplified in patients with chronic granulomatous disease (CGD) where defective production in ROS results in multiple infections and often early death.^{22,23} Furthermore, studies in mouse models have shown that NADPH oxidase is key for regulating lung inflammation and injury as well as NF- κ B activation and downstream cytokine production in response to LPS.²⁴ More recently, our group has demonstrated that NADPH oxidase-derived H₂O₂ is directly linked to induction of apoptosis of neutrophils and resolution of inflammation in a model of antigen-induced arthritis.¹⁸ However, the role of ROS in the context of the resolution of allergic inflammation is still unknown.

Here, we evaluated whether H₂O₂ drives apoptosis of eosinophils and thereby influences the resolution of established eosinophilic inflammation and reduction of airflow obstruction. Our study provides evidence that H₂O₂ is released during allergic inflammation in a gp91^{phox}-/- dependent manner and induces a caspase-dependent proapoptotic effect in eosinophils, thus having a crucial role in the resolution of allergic inflammation.

Results

Kinetics of inflammation response after asthma induction in mice. We used a well-established murine model of asthma previously described by Stock *et al.*²⁵ In this model, the inflammatory response was characterized by accumulation of leukocytes detectable at 12 h and that reached maximal at 24–48 h after challenge with OVA (Supplementary Figure 1A). There was predominant accumulation of neutrophils at 12 h after antigenic challenge (Supplementary Figure 1B). Twenty-four hours after challenge, the number of neutrophils dropped and there was increased accumulation of eosinophils. The natural resolution of eosinophilic inflammation was initiated at 48 h and virtually completed at 72 h after antigen challenge (Supplementary Figure 1C). Likewise, similar results were obtained in an allergic pleurisy model in which there is also acute

self-resolving eosinophilic inflammation (Supplementary Figure 2A). Importantly, the increased number of mononuclear cells at 12 h and 48 h after antigen challenge coincided with the decrease of neutrophils and eosinophils, respectively (Supplementary Figure 1D).

Treatment with H₂O₂ or SOD decreases eosinophil accumulation in asthma models. Next experiments were designed to investigate the ability of H₂O₂ to resolve eosinophilic inflammation *in vivo*. We treated mice with SOD or H₂O₂ 24 h after OVA challenge, a time point at which the number of neutrophils is close to basal levels and eosinophil numbers are maximal. Treatment with SOD, which increases production of endogenous H₂O₂, or exogenous H₂O₂ treatment decreased the number of eosinophils in the BAL (Figure 1a) and reduced the levels of eosinophilic peroxidase (EPO) in the lung (Figure 1b). Treatment with catalase, which degrades H₂O₂, prevented the proresolving effects of SOD (Figures 1a and b). The lung parenchyma of challenged mice exhibited intense infiltration of inflammatory cells and loss of pulmonary architecture 48 h after antigen challenge when compared with the control group (PBS) (Figures 1c and d). Mice that received H₂O₂ at 24 h showed reduced parenchymal inflammation (Figure 1e). Likewise, treatment with SOD was associated with less parenchymal inflammation and administration of catalase prevented the anti-inflammatory actions of SOD (data not shown). Likewise, similar results were obtained in an allergic pleurisy model (Supplementary Figures 2B and C).

gp91^{phox} deficiency extends the duration of allergic inflammation. Because treatment with H₂O₂ resolved eosinophilic inflammation, a series of experiments were then performed in gp91^{phox}-/- mice, which lack the ability to assemble the NADPH oxidase and have decreased capacity to generate ROS.¹⁸ ROS production in gp91^{phox}-/- mice was significantly lower when compared to wild-type mice (Figure 2a). In these mice, natural resolution of eosinophilic inflammation, which usually is complete within 72 h in WT mice, was not observed even at 96 h after antigen challenge (Figure 2b). Likewise, intranasal treatment with apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase) at a dose of 10 mg/kg prevented natural resolution of eosinophilic inflammation at 72 and 96 h after challenge (Figure 2b).

The histopathological analysis of lung sections showed that within 72 h the inflammation was present only in focal segments in wild-type mice (WT) and lung tissue was mostly preserved (Figure 2d). In contrast, there was much infiltration of inflammatory cells and derangement of tissue architecture at 72 h in gp91^{phox}-/- mice exposed to antigen when compared with the control group (PBS, Figures 2d and e).

H₂O₂ treatment induced caspase-dependent apoptosis of eosinophils. Considering that the generation of endogenous H₂O₂ (via treatment with SOD) and administration of H₂O₂ reduced the number of eosinophils, we investigated whether death of eosinophils via apoptosis could underlie the resolution of eosinophilic inflammation. Indeed, there was significant increase in the number of apoptotic eosinophils as observed morphologically in mice treated with either SOD

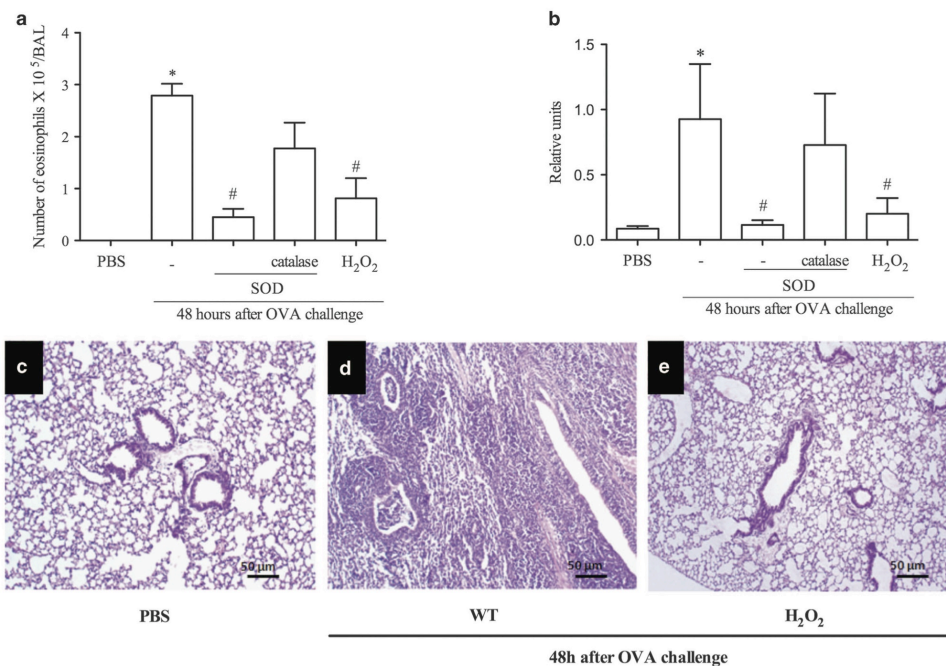


Figure 1 H₂O₂ promotes resolution of inflammation in a mouse model of asthma. Number of eosinophils after administration of SOD (0.3 mg/kg), SOD+catalase (1.2 mg/kg), H₂O₂ (0.5 M) or vehicle (30 μ l PBS) (a). Eosinophil peroxidase (b). Photomicrographs of lung sections - PBS (c), asthma (d) H₂O₂ (e) H&E. 100 \times . Scale 50 μ m. Data represent mean \pm S.E.M. (n=5). *P<0.05 versus control mice. #P<0.05 versus OVA mice

or H₂O₂ (Figures 3a and d–g and Supplementary Figure 2D) and demonstrated by flow cytometric analysis (Figure 3b). In mice treated with H₂O₂, there was an increase in expression of annexin V-FITC+ in CCR3+ cells at 2 h after treatment (Figure 3b). These data were confirmed by increased staining for cleaved caspase-3 in eosinophils, but not in mononuclear cells, in BAL from ova-challenged mice treated with H₂O₂ (Supplementary Figure 3). In contrast, T cells were not affected by H₂O₂ (% of cells CD3+/AnnX-V+: PBS: 0.69 \pm 0.24; OVA: 0.74 \pm 0.18, OVA+H₂O₂: 1.04 \pm 0.22 P>0.05, n=6), suggesting that H₂O₂ treatment affected eosinophils more specifically. Treatment of animals with zVAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, reversed the proresolution actions of H₂O₂, demonstrating the caspase dependency of the resolution of eosinophilic inflammation (Figure 3c).

H₂O₂ induces concentration-dependent apoptosis of an eosinophilic cell line *in vitro*. Next, we evaluated whether H₂O₂ could induce directly the apoptosis of a human eosinophil cell line, Eo1-1. This cell line has been extensively used as a model of eosinophil function, including chemotaxis, mediator release and apoptosis induction.^{26,27} Eo1-1 cells were incubated for a 4-h period with increasing concentrations of 0.3, 1.0 and 3.0 mM H₂O₂. Annexin-V-positive

cells were considered apoptotic cells and annexin-V/PI dual-positive cells were considered late apoptotic/secondarily necrotic cells. H₂O₂ markedly increased apoptosis of Eo1-1 cells in a concentration-dependent manner (Figure 4a). In order to confirm that Eo1-1 cells undergo apoptosis following incubation with H₂O₂, Eo1-1 was coincubated with H₂O₂ and Q-VD-OPh, a highly effective pan-caspase inhibitor. Coincubation of Eo1-1 with Q-VD-OPh abrogated the ability of H₂O₂ to induce apoptosis (Figure 4b). To demonstrate further the role of caspase-3 in Eo1-1 apoptosis induced by H₂O₂, we performed western blot analysis to investigate expression of cleaved caspase-3 on lysates from Eo1-1 cells 4 h after stimulation with different concentrations of H₂O₂. H₂O₂ caused caspase-3 cleavage when compared with cells treated with media alone (Figure 4c). Apoptosis was also assessed morphologically using light microscopy after cyto centrifugation and staining with Diff-Quick. We observed that apoptotic Eo1-1 cells exhibited nuclear condensation and cellular shrinkage, confirming flow cytometric data (data not shown).

H₂O₂ reduces airway hyperreactivity to methacholine. Airway hyperreactivity (AHR) has been studied in a well-established murine model of asthma.²⁸ In this model, the time course of the eosinophilic infiltrate was similar to that

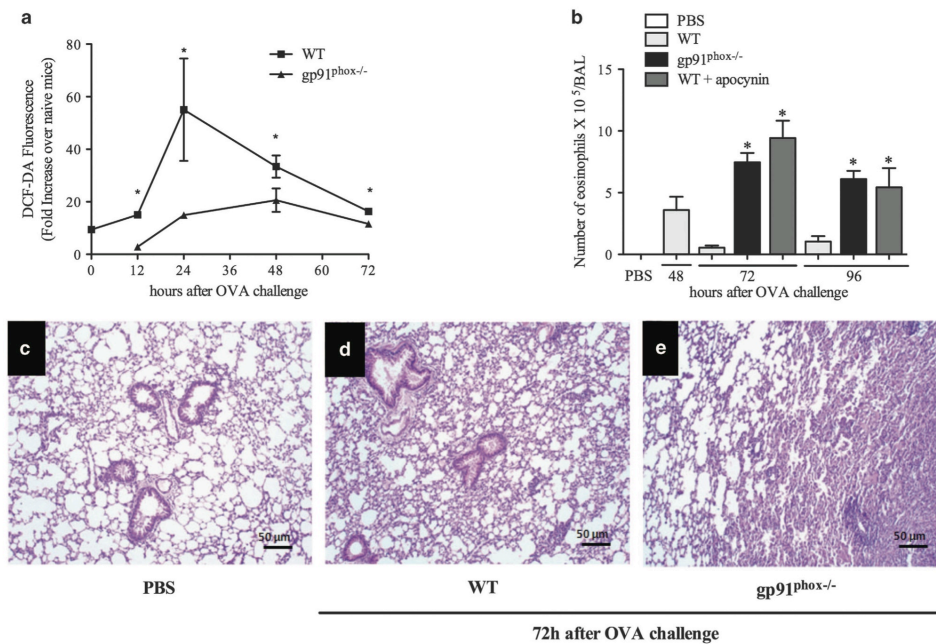


Figure 2 ROS derived from NADPH oxidase is necessary for inflammation resolution. ROS production in WT or gp91^{phox-/-} mice (a). Eosinophils 72 and 96 h after OVA in gp91^{phox-/-} mice and after apocynin treatment (b). Eosinophil peroxidase (c). Lung sections of PBS (d), WT (e) gp91^{phox-/-} (f). H&E. 100 \times . Scale 50 μ m. Data represent mean \pm S.E.M. (n=5). *P<0.05 versus control group

observed in our previous experiments (see Supplementary Figure 4 and compare with Supplementary Figure 1). Akin to experiments described previously, delayed treatment with H₂O₂ resolved the eosinophilic infiltrate in the BAL at 48 h after antigen challenge (Figures 5a and d) when compared with the control group (PBS, Figures 5a and b). In these mice, AHR was assessed by measuring airway resistance (RI) and lung elastance parameters in mechanically ventilated animals. As shown in Figure 6, antigen challenge with OVA exacerbated airway resistance and elastance of the lungs in response to inhaled methacholine (3–81 mg/ml), as compared with the control group challenged with PBS. Treatment with H₂O₂ reduced AHR, as seen by decreased airway resistance and elastance (Figure 6).

Effect of H₂O₂ administration on mucus deposition and lung remodeling. To evaluate mucus production, sections of lung tissue were stained with periodic acid-Schiff. The analysis of airway mucins demonstrated significant metaplasia of goblet cells and mucus accumulation at 48 h after the last OVA challenge in actively sensitized mice (Figures 5e and g) in comparison with the control group (PBS) (Figure 5f). Treatment with H₂O₂ reduced OVA-induced mucus accumulation and the percentage of mucus producing cells to values similar to those observed in nonallergic controls (Figures 5e, f and h). The lung sections stained with Gomori

trichrome demonstrated that OVA mice had increased peribronchiolar matrix deposition as compared with the PBS mice (Figures 5i–l). Quantitative analyses demonstrated that delayed treatment with H₂O₂ prevented extracellular matrix deposition in challenged mice (Figures 5i and l). Furthermore, H₂O₂ treatment decreased concentrations of CCL11, CCL24, IL-4, IL-5 and TNF- α that were measured at 48 h after antigen challenge (Table 1).

Discussion

There is strong evidence indicating an important role for eosinophils in the pathogenesis of allergic diseases through the release of a variety of inflammatory mediators, including MBP, EPO and cytokines.¹ Here, we evaluated the role of endogenous and effects of exogenous administration of H₂O₂ in the context of resolution of allergic inflammation. The results presented here can be summarized as follows: (i) treatment with H₂O₂ or strategies that enhanced H₂O₂ reduced eosinophil accumulation in the BAL and lung tissue; (ii) H₂O₂ promoted resolution of inflammation by inducing caspase-dependent apoptosis of eosinophils *in vivo*; (iii) H₂O₂ also induced caspase-dependent apoptosis of a human eosinophilic cell line *in vitro*. (iv) H₂O₂ derived from NADPH oxidase was necessary for natural resolution of allergic inflammation; (v) finally, treatment with H₂O₂ decreased secretion of mucus,

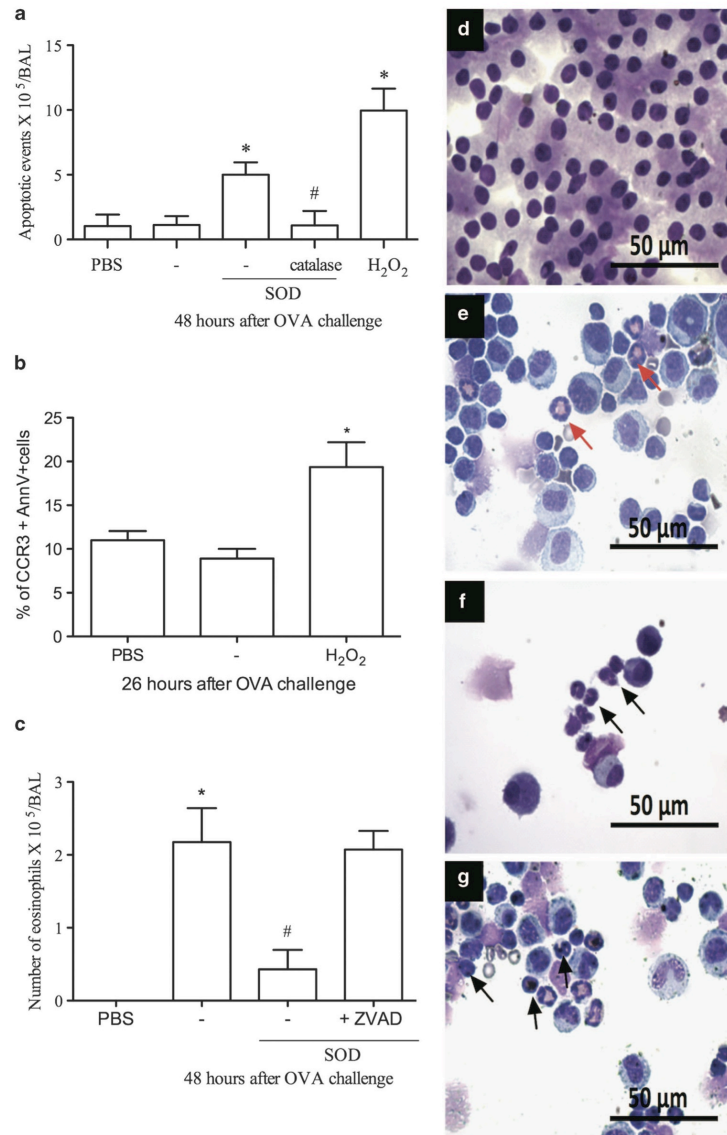


Figure 3 H₂O₂ induces apoptosis of eosinophils. SOD (0.3 mg/kg), SOD+catalase (1.2 mg/kg), H₂O₂ (0.5 M) or vehicle (30 μ l PBS) i.n. Apoptotic morphology (a) Cells expressing Annexin V-FITC+CCR3+ (b). Eosinophils after zVAD-fmk administration (1 mg/kg, i.p) (c). Cell types. Red arrow normal eosinophil. Black arrow: eosinophil with apoptotic morphology. PBS (d) asthma (e) H₂O₂ (f) H₂O₂ (g). 100 \times Scale: 50 μ m. Data represent mean \pm S.E.M. (n = 5). *P < 0.05 versus control mice. #P < 0.05 versus OVA mice

extracellular matrix deposition, inflammatory cytokine production and decreased AHR induced by antigen. Altogether, these results demonstrate a clear proresolving effect of H₂O₂ in allergic inflammation *in vivo*.

In our experiments, we have demonstrated that endogenous or exogenous H₂O₂ resolved eosinophilic inflammation in two different models of the allergic response. In the asthma model, this event correlated with increased number of

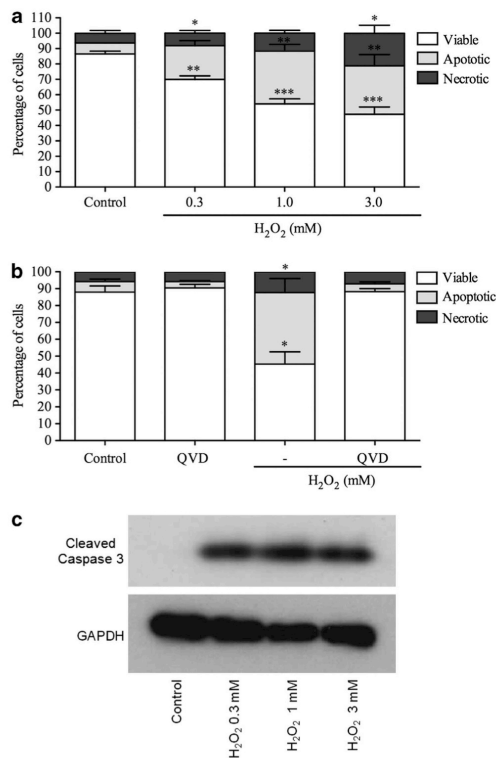


Figure 4 H₂O₂ induces concentration and caspase-dependent apoptosis in Eo1-1 cells. Eo1-1 cells with H₂O₂ (0.3 mM–3.0 mM) (a) or H₂O₂ (1 mM) and QVD-OPh (10 μM) (b). Western blotting for cleaved caspase-3 (17/19 kDa) and GAPDH (37 kDa) (c). Data represent mean ± S.E.M. *n* = 3. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Western blots representative on three experiments

apoptotic eosinophils. This is similar to the role of H₂O₂ in a model of arthritis, in which H₂O₂ limits inflammation associated with induction of caspase-dependent apoptosis of neutrophils.¹⁸ In fact, blockade of caspases with a pan-caspase inhibitor, zVAD-fmk, prevented apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation induced by H₂O₂ consistent with our previous studies on neutrophils. H₂O₂ has been shown to induce apoptosis in culture of different cell types including human hepatocyte cells,²⁹ epithelial cells,³⁰ endothelial cells³¹ and myocytes.³² Here, we demonstrate that H₂O₂ also induced apoptosis of a human eosinophilic cell line, as by assessed by flow cytometry, light microscopy and cleavage of caspase-3 assessed by western blotting. The experiments using Eo1-1 cells suggest that this pathway may be relevant in humans and clearly deserve further investigation in human disease. Indeed, ROS have been reported to increase apoptosis of human eosinophils.^{33,34} Therefore, our evidence suggests that resolution of eosinophilic inflammation by endogenous or exogenous H₂O₂ is due to the capacity of

this molecule to induce caspase-dependent apoptosis of eosinophils.

Results in gp91phox-deficient mice showed that influx was not altered but persistency of eosinophils in tissues was greatly prolonged. Moreover, the intranasal treatment with an inhibitor of NADPH oxidase delayed the resolution of inflammatory response. It has been reported that in conditions of oxidative stress, the NADPH oxidase complex catalyzes electron transfer from NADPH to molecular oxygen and generates superoxide anions (O₂⁻). The superoxide dismutase (SOD) degrades O₂⁻ in H₂O and produces H₂O₂.²³ Our work is the first to describe the importance of the oxidative pathway involving NADPH oxidase to resolve eosinophilic response. This is consistent with other studies in mice, which showed that gp91^{phox}-/- mice had delayed resolution of neutrophilic inflammation and this process was reversed by administration of exogenous H₂O₂ in a model of antigen-induced arthritis.¹⁸ These data support the concept that ROS, which are generated by the phagocytic NADPH oxidase and commonly considered harmful mediators of acute inflammation, have a role in limiting inflammation and may be pivotal in resolving acute inflammation.³⁵ Indeed, our results show that H₂O₂ not only induces resolution of inflammation, but it is also relevant in the context of the natural resolution of eosinophilic inflammation. Recent data show that administration of SOD accelerates resolution of inflammation associated to antigen-induced arthritis resulting in increased number of apoptotic neutrophils. This coincided with activation of caspase-3 and increased Bax expression in neutrophils recovered from the articular cavity.¹⁸ We also investigated whether reactive nitrogen species (RNS) participate in the resolution of the inflammatory response in the model of allergic asthma. It was observed that in the absence of NO production by iNOS there was no change in the resolution of allergic inflammation (Supplementary Figure 5). RNS such as NO are involved in the inflammatory process in the airways of asthmatic patients. NO has also been shown to be involved in the regulation of apoptosis: it can prevent or induce apoptosis depending upon the cell type and the concentration in which it is produced.^{36–40} The data suggest that RNS are not essential for resolution of allergic inflammation.

Our results showed that in addition to resolving eosinophilic inflammation, treatment with H₂O₂ had major physiological consequences in a model of allergic asthma. Indeed, treatment with H₂O₂ greatly reduced eosinophil accumulation, changes in airway reactivity, remodeling and mucus deposition induced by antigen challenge of immunized mice. Cytokines, including IL-4, IL-5 and TNF-α, and chemokines (CCL11 and CCL24) are thought to be involved in eosinophil accumulation and linked to pathophysiology of allergic disease.^{41–44} There is also evidence that IL-5 and TNF-α promote eosinophil survival *in vitro*.^{45–47} In addition, CCL11 and CCL24 are important for eosinophil recruitment from the blood to the parenchyma and then into the airway.⁴⁸ However, the evidence that antibody or drugs targeting these cytokines or chemokine induce resolution of eosinophilic inflammation *in vivo* is scanty. In addition, IL-4, IL-5 and TNF-α are essential for the development of AHR, mucus production and fibrosis in asthma.^{49–51} Similarly, chemokines, such as CCL11 and CCL24, may also contribute to AHR and fibrogenesis in

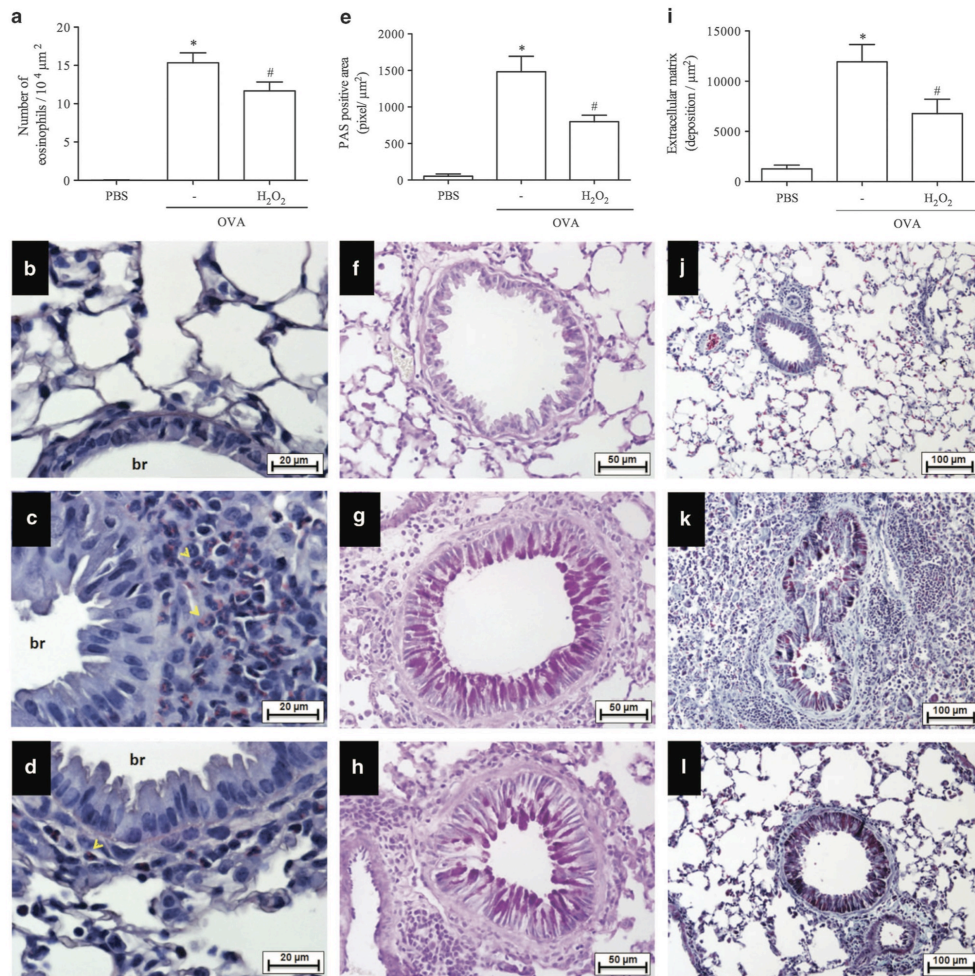


Figure 5 Effect of H₂O₂ on lung remodeling and mucus deposition. Leukocyte infiltrate around the bronchial region of the lung sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Sirius Red (pH 10.2) (a–d). Mucus production from airway stained with hematoxylin and Periodic acid-Schiff (PAS) (e–h). 400 x. Peribronchial fibrosis stained with hematoxylin and eosin and a combination of Gomori trichrome (i–l). 200 x. *P < 0.05 versus control mice. #P < 0.05 versus OVA mice

animal models of asthma.^{42,48} In our studies, there was a marked decrease in levels of these cytokines, which accompanied the resolution of the eosinophil numbers. Resolution of inflammation is known to exert potent anti-inflammatory effects and decrease of production of proinflammatory cytokines,^{52,53} suggesting that decreased levels of TNF, IL-5, IL-4 and chemokines are likely a consequence of the anti-inflammatory action of the resolution process. Alternatively, it is also possible that ROS induced a primary decrease of cytokines that could have then accounted for eosinophil apoptosis and in the resolution of eosinophilic inflammation.

The latter possibility is more difficult to ascertain in the *in vivo* situation and clearly more studies are needed to convincingly show that blockade of cytokines alter survival of eosinophils *in vivo*, as demonstrated *in vitro*. Whatever the mechanism, direct effect on eosinophils (shown here) or an indirect action via decrease on survival factors, our data clearly demonstrate the proresolving effects of H₂O₂ in the context of eosinophilic inflammation. Taken together our findings show that exogenous or endogenous generation of H₂O₂ resolve allergic inflammation by inducing eosinophil apoptosis in a caspase-dependent manner. Induction of eosinophil apoptosis by H₂O₂

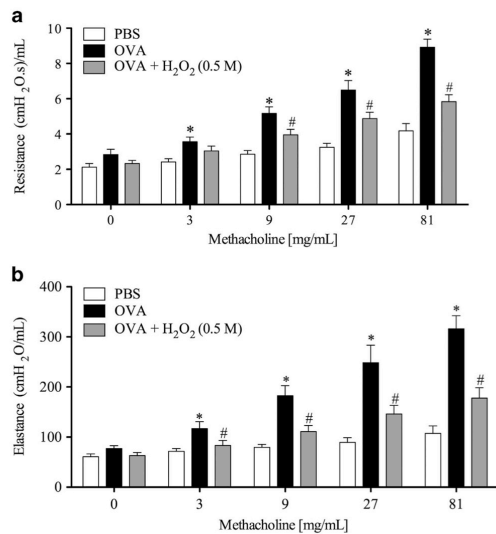


Figure 6 Airway resistance and dynamic elastance after increasing methacholine doses. H₂O₂ (0.5 M) or vehicle (30 μ l PBS) was administered i.n. instillation 24 h after asthma induction. Airway resistance (a) and elastance (b) was measured in response to increasing doses of methacholine (3, 9, 27, 81). Data represent mean \pm S.E.M. ($n = 10$). * $P < 0.05$ versus vehicle group. # $P < 0.05$ versus OVA mice

Table 1 Levels of cytokines in lung (pg/ml)

Cytokines	PBS	OVA	H ₂ O ₂
CCL11	743 \pm 152	9109 \pm 5063 ^a	5845 \pm 2048 ^b
CCL24	903 \pm 245	11956 \pm 6304 ^a	6896 \pm 1143 ^b
IL-4	110 \pm 32	238 \pm 149 ^a	127 \pm 34 ^b
IL-5	847 \pm 64	1226 \pm 445 ^a	829 \pm 140 ^b
TNF- α	182 \pm 41	310 \pm 135 ^a	157 \pm 45 ^b

Abbreviations: TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IL-4, interleukin-4; IL-5, interleukin-5

^aSignificantly different from the control group ($P < 0.05$)

^bSignificantly different from the vehicle group ($P < 0.05$)

decreases airway remodeling and dysfunction. These results have fundamental implications to the basic concept of inflammation resolution and may have therapeutic implications. Indeed, our results demonstrate that resolution of eosinophilic inflammation by H₂O₂ maintains tissue integrity and function. Restoration of tissue inflammation to homeostasis may reverse airway function and remodeling in patients, a tenet that may be exploited for the development of novel therapies for the treatment of asthma.

Materials and Methods

Ethics statement. Male C57/BL6 and gp91^{phox}^{-/-} mice (Gene *Cybb*; ES Cell Line name CCE/EK.CE)⁵⁴ (8–10 weeks) were bred and housed in a temperature-controlled room with free access to water and food. Animal Care and Use Committee and the study received prior approval from the local animal ethics committee (Animal Ethics Review Board – Comitê de Ética em Experimentação Animal-CETEA/Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG (protocol number: 218/11)).

Reagents and drugs. Superoxide dismutase (SOD) from bovine erythrocytes, catalase, H₂O₂, ovalbumin, Z-VAD-fmk, propidium iodide (PI) and 4,5-diaminofluoresceína-diacetato (DAF-2DA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Apo DETECT ANNEXIN-V-FITC KIT 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA) and dihydrorodamine-123 (DHR-123) were purchased from Invitrogen (Life Technologies, São Paulo, Brazil). Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Q-VD-OPH (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), annexin-V-FLUOS (Roche, Mannheim, Germany).

Eo1 cell culture and apoptosis induction. Human eosinophilic cell line (Eo1 cells) was maintained in RPMI-1640 medium (PAA) with 2% FBS (Biosera), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml) (PAA). Cells were aliquoted (2×10^6 cells/ml) and incubated with H₂O₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Q-VD-OPH (R&D Systems) or combinations of these either in 96-well-flat bottomed-plates (final volume of 150 μ l) or in 2 ml Eppendorf tubes (final volume of 500 μ l) in a humidified, 37 $^{\circ}$ C incubator at 5% CO₂ atmosphere or on a shaking, temperature-controlled heat block. Q-VD-OPH stock was initially dissolved in dimethyl sulphoxide (Sigma) then diluted in buffer yielding a final concentration of 0.2%; a corresponding DMSO control of 0.2% was assessed as an appropriate vehicle control. Apoptosis was assessed by flow cytometry with a BD-LSR Fortessa (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) using annexin-V-FLUOS (Roche) in combination with propidium iodide (PI) (Sigma) as described.⁵⁵ Data were analyzed using Flowjo software (TreeStar, Ashland, OR, USA). Morphological apoptotic changes were assessed by light microscopy of DiffQuick stained cytocentrifuged cells.⁵⁵

Western blotting. Cells at a concentration of 2×10^6 cells/ml per condition were incubated with H₂O₂ (Thermo Fisher Scientific), Q-VD-OPH (R&D Systems) or combinations of these at 37 $^{\circ}$ C on a shaking heat block for 4 h. Eo1 cells were pelleted by centrifugation at 3000 \times g for 60 s and resuspended with whole-cell lysis buffer. Sample was incubated on ice for 10 min then NP-40 was added, briefly vortexed and centrifuged for 20 min at 3000 \times g. Supernatant was removed and the remaining cell pellet was resuspended in sample buffer before boiling at 95 $^{\circ}$ C for 5 min. Lysate were run on 12% precast gels (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and transferred onto PVDF (Immobilon-P, Millipore, Herts, UK). Membranes were blocked for 1 h in 5% (wt/vol) dried milk/TBS/0.1% Tween-20 before probing with antibodies to cleaved caspase-3 diluted 1 : 500 (Cell Signaling Technologies) at 4 $^{\circ}$ C overnight or GAPDH diluted 1 : 20 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 h at room temperature. Following 3 \times 5 min washes in TBS/0.1% Tween-20, the blots were incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1 : 2500 for 1 h at room temperature before incubation with ECL (GE Healthcare, Bucks, UK) exposure to BioMax MS-1 X-ray-sensitive film, and processing (X-Ograph Imaging Systems, Wilts, UK).

Induction of asthma. All mice were sensitized intraperitoneally (i.p.) with 100 μ g of OVA (albumin from chicken egg white - A5503, Sigma-Aldrich) in 2% alum (aluminum hydroxide gel adjuvant; Brenntag) on day 0, then challenged intranasally (i.n.) on days 8–10 with 10 μ g of OVA or PBS.⁵⁶ The treatments with apocynin, SOD, H₂O₂ and catalase were performed i.n. and the zVAD-fmk (Tocris Bioscience) was administered i.p.

Induction of pleurisy. Mice were immunized with OVA adsorbed to aluminum hydroxide gel as described.⁵² Briefly, mice were injected subcutaneously (s.c.) on days 1 and 7 with 0.2 ml of a solution containing 100 mg of OVA and 70 mg of aluminum hydroxide. Sensitized mice were then challenged with OVA (1 mg/cavity, in a total volume of 100 μ l intrapleurally, i.pl) or PBS. Cells present in the pleural cavity were collected at different times by washing the cavity with 2 ml PBS and total cell counts performed in a modified Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytocentrifuge preparations (Shandon Cytospin III), stained with May-Grünwald-Giemsa using standard morphological criteria to identify cell types. The results are presented as the number of cells/cavity.

BAL analysis. BAL was performed to obtain leukocytes present in the alveolar space. Mice were killed by anesthetic overdose and the trachea of each animal was exposed and cannulated with a polypropylene catheter of 1.7 mm. Airways were washed with 2 ml of ice-cold PBS. Total cell counts were performed in a modified Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytocentrifuge preparations (Shandon Cytospin III), stained with May-Grünwald-Giemsa using standard morphological criteria to identify cell types. The results are

presented as the number of cells/BAL. In a separated set of experiments, apoptotic cells were morphologically identified in cytocentrifuged slides, which were also positively stained for cleaved caspase-3 (Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse cleaved caspase-3; Cell Signaling; 1:50). Fluorescence intensity was measured offline using Velocity software 6.3 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) and fluorescence profile was assessed using Image J (NIH).⁵⁷

Histological analysis. The lung was prepared as described.⁵⁸ Briefly, lungs were removed 24 h after the last challenge and fixed in Millonig buffer solution (pH 7.4) with 4% paraformaldehyde. For analysis of leukocyte infiltrate around the bronchial region, the lung sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or were subjected to Sirius Red (pH 10.2) staining (Llewellyn's Sirius Red Direct Red 80, CI 35780; Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Results were expressed as leukocytes/ $10^4 \mu\text{m}^2$. Mucus production was analyzed from tissue sections stained with Harris hematoxylin stain and a combination of Periodic acid-Schiff (PAS) stain (Schiff's reagent, Merck, Rio de Janeiro, Brazil). Photomicrographs of airways obtained at $400\times$ magnification were analyzed using the software Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, 4.1; Media Cybernetics, Houston, TX, USA). Nine to twelve bronchial areas per lung were outlined and quantified. Results were expressed as PAS positive area (pixels/ μm^2). Peribronchial fibrosis was analyzed from tissue sections stained with hematoxylin and eosin stain and a combination of Gömöri-trichrome stain (Trichrome Stain LG Solution; Sigma-Aldrich). Photomicrographs of airways obtained at $200\times$ magnification were analyzed using the software Image-Pro Plus. Eight to twelve peribronchial area per lung were outlined and quantified.⁵⁹ Results were expressed as extracellular matrix deposition area (μm^2).

Assessment of leukocyte apoptosis. Apoptosis was assessed as described.^{52,60} Briefly, cells (5×10^4) collected 48 h after antigen challenge were cytocentrifuged, fixed and stained with May-Grunwald-Giemsa and counted using oil immersion microscopy ($\times 100$ objective) to determine the proportion of cells with distinctive apoptotic morphology (cell shrinkage, chromatin condensation, nuclear fragmentation and maintenance of membrane integrity). Twenty-five fields were counted per slide and the results expressed as the mean \pm S.E.M. of number of apoptotic cells in 25 fields. Assessment of apoptosis was also performed by flow cytometry using commercial kit annexin-V-FITC (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer in cells previously stained with the following Abs to extracellular markers for 30 min on ice: anti-mouse CCR3 mAb (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or anti-mouse mAb CD3 (BD Biosciences). Flow cytometry was performed using a FACS Canto flow cytometer (BD). At least 10^4 events were recorded and analyzed using FlowJo software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA). Results are expressed as cells undergoing early stage apoptosis quantified by staining with annexin-V but not PI.

ELISA analysis. Murine IL-4, IL-5, TNF- α , CCL11 and CCL24 levels were measured in right lung tissue samples by means of ELISA technique using commercial DuoSet kits R&D Systems following the instructions of the manufacturer. Results were expressed in levels of cytokines per lung (pg/ml).

Quantification of eosinophil accumulation in lung. Pulmonary EPO activity was determined to estimate eosinophil recruitment into the lung parenchyma as described.⁶¹ Absorbance was read in an ELISA reader (Expert Plus ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) at 492 nm. Values are expressed in O.D.

Determination of the production of reactive oxygen species and nitrogen by fluorimetry. Leukocytes obtained from the BAL were incubated separately with the probes ^{1,2}-7' dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCF-DA 20 μM), dihydrodaminadiazetate 123 (DHR-123 5 μM) or 4,5-diaminofluorescein (DAF-2DA 10 μM) for 30 min in an oven at 37 °C. This stage of the experiment was performed in the dark, because the markers are photosensitive. The reading of fluorescence was performed in a fluorescence spectrophotometer (Synergy 2, Biotek, Winooski, VT, USA) with wavelengths of excitation and emission of 488 and 515 nm, respectively.

Invasive assessment of respiratory mechanics. Airway reactivity was assessed as a change in airway function after challenge with aerosolized methacholine in a FinePoint R/C Buxco Platform. The parameters were measured as previously described.⁶² The analyses were performed 48 h after the last OVA challenge.

Statistical analysis. ANOVA followed by Student Newman-Keuls was applied to comparison of multiple groups. In order to test statistical significance between two

groups we used the unpaired Student's *t*-test (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All *in vitro* experiments were performed at least three times with each experiment carried out in triplicate. All *in vivo* experiments included six mice per group. Data were expressed as the mean \pm S.E.M. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013, Timer consortium) under grant agreement n° HEALTH-F4-2011-281608, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil).

1. Luna-Gomes T, Bozza PT, Bandeira-Melo C. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Front Pharmacol* 2013; 4: 27.
2. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Ann Rev Immunol* 2006; 24: 147–174.
3. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 2008; 57: 1–10.
4. Felton JM, Lucas CD, Rossi AG, Dransfield I. Eosinophils in the lung - modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation. *Front Immunol* 2014; 5: 302.
5. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91: 59–75.
6. Alshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1847–1857.
7. Nouri-Aria KT, Durham SR. Regulatory T cells and allergic disease. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7: 237–252.
8. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* 2012; 120: 3882–3890.
9. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 117–129.
10. Wilson SJ, Rigden HM, Ward JA, Laviolette M, Jarjour NN, Djukanovic R. The relationship between eosinophilia and airway remodeling in mild asthma. *Clin Exp Allergy* 2013; 112: 1342–1350.
11. Nair P. Anti-interleukin-5 monoclonal antibody to treat severe eosinophilic asthma. *N Eng J Med* 2014; 371: 1249–1251.
12. Duncan CJA, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* 2003; 22: 484–490.
13. Walsh GM. Eosinophil apoptosis: Mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Brit J Haematol* 2000; 111: 61–67.
14. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 563–573.
15. Gautier EL, Ivanov S, Lesnik P, Randolph GJ. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 2013; 122: 2714–2722.
16. Walsh GM. Eosinophil apoptosis and clearance in asthma. *J Cell Death* 2013; 6: 17–25.
17. Alessandri AL, Duffin R, Leitch AE, Lucas CD, Sheldrake TA, Dorward DA et al. Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation. *PLoS One* 2011; 6: e25683.
18. Lopes F, Coelho FM, Costa VV, Vieira EL, Sousa LP, Silva TA et al. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2651–2660.
19. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 153–164.
20. Wartha F, Henriques-Normark B. ETOsis: a novel cell death pathway. *Sci Signal* 2008; 1: pe25.
21. Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2197–2208.
22. Segal BH, Grimm MJ, Khan AN, Han W, Blackwell TS. Regulation of innate immunity by NADPH oxidase. *Free Rad Biol Med* 2012; 53: 72–80.
23. Gardiner GJ, Deffitt SN, McLetchie S, Perez L, Walline CC, Blum JS. A Role for NADPH oxidase in antigen presentation. *Front Immunol* 2013; 4: 285.
24. Han W, Li H, Cai J, Gleaves LA, Polosukhin VV, Segal BH et al. NADPH oxidase limits lipopolysaccharide-induced lung inflammation and injury in mice through reduction-oxidation regulation of NF- κ B activity. *J Immunol* 2013; 190: 4786–4794.
25. Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1149–1156.
26. Noda H, Sakagami H, Kokubu F, Kurokawa M, Tokunaga H, Takeda M et al. Induction of apoptosis in human eosinophilic leukemic cell line (EOL-1). *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114(Suppl 1): 84–88.
27. Mayumi M. EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk Lymphoma* 1992; 7: 243–250.

28. Bezerra-Santos CR, Vieira-de-Abreu A, Vieira GC, Filho JR, Barbosa-Filho JM, Pires AL et al. Effectiveness of Cissampelos sympodioides and its isolated alkaloid warifiteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. *Int Immunopharmacol* 2012; **13**: 148–155.
29. Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* 2010; **92**: 927–932.
30. Hussain S, Thomassen LC, Ferencu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA et al. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2010; **7**: 10.
31. Fang WT, Li HJ, Zhou LS. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; **31**: 485–492.
32. Zhang L, Jiang H, Gao X, Zou Y, Liu M, Liang Y et al. Heat shock transcription factor-1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2011; **347**: 21–28.
33. Kankaanranta H, Giermycz MA, Barnes PJ, Haddad el B, Saarelainen S, Zhang X et al. Hydrogen peroxide reverses IL-5 afforded eosinophil survival and promotes constitutive human eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **127**: 73–78.
34. Wedi B, Straede J, Wieland B, Kapp A. Eosinophil apoptosis is mediated by stimulators of cellular oxidative metabolism and inhibited by antioxidants: involvement of a thiol-sensitive redox regulation in eosinophil cell death. *Blood* 1999; **94**: 2365–2373.
35. Deng J, Wang X, Qian F, Vogel S, Xiao L, Ranjan R et al. Protective role of reactive oxygen species in endotoxin-induced lung inflammation through modulation of IL-10 expression. *J Immunol* 2012; **188**: 5734–5740.
36. Zhang X, Moilanen E, Lahti A, Hamalainen M, Giermycz MA et al. Regulation of eosinophil apoptosis by nitric oxide: Role of c-Jun-N-terminal kinase and signal transducer and activator of transcription 5. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **112**: 93–101.
37. Pontin J, Blaylock MG, Walsh GM, Turner SW. Sputum eosinophil apoptotic rate is positively correlated to exhaled nitric oxide in children. *Pediatr Pulmonol* 2008; **43**: 1130–1134.
38. Ilmarinen-Salo P, Moilanen E, Kankaanranta H. Nitric oxide induces apoptosis in GM-CSF-treated eosinophils via caspase-6-dependent lamin and DNA fragmentation. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; **23**: 365–371.
39. Ilmarinen-Salo P, Moilanen E, Kinnula VL, Kankaanranta H. Nitric oxide-induced eosinophil apoptosis is dependent on mitochondrial permeability transition (mPT), JNK and oxidative stress: apoptosis is preceded but not mediated by early mPT-dependent JNK activation. *Respir Res* 2012; **13**: 73.
40. Ilmarinen P, Moilanen E, Kankaanranta H. Mitochondria in the center of human eosinophil apoptosis and survival. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 3952–3969.
41. Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; **23**: 121–128.
42. Yang M, Hogan SP, Mahalingam S, Pope SM, Zimmermann N, Fulkerson P et al. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **112**: 935–943.
43. Klein A, Talvani A, Silva PM, Martins MA, Wells TN, Proudfoot A et al. Stem cell factor-induced leukotriene B₄ production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. *J Immunol* 2001; **167**: 524–531.
44. Kobayashi T, Iijima K, Kita H. Marked airway eosinophilia prevents development of airway hyper-responsiveness during an allergic response in IL-5 transgenic mice. *J Immunol* 2003; **170**: 5756–5763.
45. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**: 1303–1310.
46. Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S et al. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 1988; **167**: 1737–1742.
47. Kankaanranta H, Ilmarinen P, Zhang X, Adcock IM, Lahti A, Barnes PJ et al. Tumour necrosis factor-alpha regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF-kappaB and AP-1. *PLoS One* 2014; **9**: e90298.
48. Huaux F, Gharaee-Kermani M, Liu T, Morel V, McGarry B, Ullenbruch M et al. Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *The American journal of pathology* 2005; **167**: 1485–1496.
49. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007; **56**: 341–348.
50. Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP et al. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* 2001; **179**: 173–181.
51. Lora JM, Zhang DM, Liao SM, Burwell T, King AM, Barker PA et al. Tumour necrosis factor-alpha triggers mucus production in airway epithelium through an IkkappaB kinase beta-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005; **280**: 36510–36517.
52. Pinho V, Souza DG, Barsante MM, Hamer FP, De Freitas MS, Rossi AG et al. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leuk Biol* 2005; **77**: 800–810.
53. Perez DA, Vago JP, Athayde RM, Reis AC, Teixeira MM, Sousa LP et al. Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 829851.
54. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* 1995; **9**: 202–209.
55. Duffin R, Leitch AE, Sheldrake TA, Hallett JM, Meyer C, Fox S et al. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. *FEBS Lett* 2009; **583**: 2540–2546.
56. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 2008; **181**: 4780–4790.
57. Marques PE, Oliveira AG, Pereira RV, David BA, Gornides LF, Saraiva AM et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology* 2014; **61**: 348–360.
58. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology* 2012; **117**: 580–591.
59. Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R et al. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol* 2008; **36**: 680–686.
60. Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL et al. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2009; **78**: 396–405.
61. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 1985; **83**: 209–215.
62. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin Exp Allergy* 2011; **41**: 250–259.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International Licence. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Table 1. Levels of cytokines in lung (pg/ml)[← Figures and tables index](#)

Cytokines	PBS	OVA	H₂O₂
CCL11	743±152	9109±5063 ^a	5845±2048 ^b
CCL24	903±245	11956±6304 ^a	6896±1143 ^b
IL-4	110±32	238±149 ^a	127±34 ^b
IL-5	847±84	1226±445 ^a	829±140 ^b
TNF- α	182±41	310±135 ^a	157±45 ^b

Abbreviations: TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IL-4, interleukin-4; IL-5, interleukin-5

^a Significantly different from the control group ($P<0.05$)

^b Significantly different from the vehicle group ($P<0.05$)

ANEXO 4

Capítulo de livro publicado na © 2015 Editora Edgard Blücher Ltda.

Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações, volume 1
organizado por Rodrigo Ribeiro Resende e Carlos Ricardo Soccol. -- São Paulo: Blucher,
2015.

ISBN 978-85-212-0896-9

1. Biotecnologia I. Resende, Rodrigo Ribeiro II. Soccol, Carlos Ricardo
623 páginas

Biotechnology applied to health: fundamentals and applications, vol. 1 Coleção Biotecnologia
Aplicada à Saúde, vol. 1

Capítulo: Segmentação, mecanismo e resolução de doenças inflamatórias

Denise Alves Perez (Doutoranda - Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória)

Alessandra Corte Reis (Doutoranda- Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória)

Juliana Priscila Vago (Doutoranda- Laboratório de Sinalização na inflamação)

Rayssa Maciel Athayde (Graduanda- Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória)

Lirlândia Pires de Sousa (Professora - Laboratório de Sinalização na inflamação)

Vanessa Pinho (Professora - Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória)

Mauro Martins Teixeira (Professor – Laboratório de Imunofarmacologia)

RESEARCH ARTICLE


Nanocomposite Treatment Reduces Disease and Lethality in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease and Preserves Anti-Tumor Effects

Priscila T. T. Bernardes¹✉, Bárbara M. Rezende¹✉, Carolina B. Resende¹, Talles P. De Paula², Alesandra C. Reis¹, William A. Gonçalves¹, Elias G. Vieira³, Maurício V. B. Pinheiro³, Danielle G. Souza², Marina G. M. Castor¹, Mauro M. Teixeira⁴, Vanessa Pinho¹*



CrossMark
click for updates

1 Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Interação Microorganismo e Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Ressonância Paramagnética, Departamento de Física Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

 OPEN ACCESS

Citation: Bernardes PTT, Rezende BM, Resende CB, De Paula TP, Reis AC, Gonçalves WA, et al. (2015) Nanocomposite Treatment Reduces Disease and Lethality in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease and Preserves Anti-Tumor Effects. PLoS ONE 10(4): e0123004. doi:10.1371/journal.pone.0123004

Academic Editor: Markus M. Heimesaat, Charité, Campus Benjamin Franklin, GERMANY

Received: June 3, 2014

Accepted: February 26, 2015

Published: April 13, 2015

Copyright: © 2015 Bernardes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and NANOVALID. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

✉ These authors contributed equally to this work.

* vpinho@icb.ufmg.br

Abstract

Graft versus host disease (GVHD) is an immunological disorder triggered by bone marrow transplantation that affects several organs, including the gastrointestinal tract and liver. Fullerenes and their soluble forms, fullerols, are nanocomposites with a closed symmetrical structure with anti-inflammatory and anti-oxidant properties. The present study evaluated the effects of treatment with the fullerol (C60(OH)18-20) in the development and pathogenesis of GVHD in a murine model. Mice with experimental GVHD that were treated with the fullerol showed reduced clinical signs of disease and mortality compared with untreated mice. Treatment with the fullerol decreased the hepatic damage associated with reduced hepatic levels of reactive oxygen species, pro-inflammatory cytokines and chemokines (IFN- γ TNF- α , CCL2, CCL3 and CCL5) and reduced leukocyte accumulation. The amelioration of GVHD after treatment with the fullerol was also associated with reduced intestinal lesions and consequent bacterial translocation to the blood, liver and peritoneal cavity. Moreover, the fullerol treatment alleviated the GVHD while preserving effects of the graft against a leukemia cell line (GFP+P815). In summary, the fullerol was effective in reducing the GVHD inflammatory response in mice and may suggest novel ways to treat this disease.

ANEXO 6

Artigo enviado para publicação na revista *Oral Biology*

Elsevier Editorial System(tm) for Archives of Oral Biology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate in the inflammatory processes for oral regenerative medicine applications

Article Type: Original Paper

Keywords: Carbon nanotubes; Hyaluronic acid; Neutrophil; Inflammation; Bone repair

Corresponding Author: Dr. Anderson J Ferreira, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Minas Gerais

First Author: Paulo Antônio Martins-Júnior, PhD student

Order of Authors: Paulo Antônio Martins-Júnior, PhD student; Marcos A Sá, PhD student; Alesandra C Reis, PhD student; Celso M Queiroz-Junior, PhD; Marcelo V Caliari, PhD; Mauro M Teixeira, PhD; Luiz O Ladeira, PhD; Vanessa Pinho, PhD; Anderson J Ferreira, PhD

Abstract: Objective: We investigated the behavior of hyaluronic acid(HY) and carbon nanotubes(MWCNT) functionalized with HY(HY-MWCNT) on the resolution of neutrophilic inflammation in the pleural cavity of LPS-challenged mice. Also, we assessed whether the materials have any influence on the inflammatory process during the bone repair of tooth sockets of rats. Design: Male C57Bl/6 mice received an intra-pleural injection of 100µL of 1%HY, MWCNT(100µg/mL), HY-MWCNT(100µg/mL), PBS or LPS. After 20min, they received another intrapleural injection of LPS(250ng/cavity). Animals were euthanized after 8h and 24h and cells were harvested for total and differential cell counting. Afterwards, Wistar rats were subjected to molar extraction and the sockets were treated with MWCNT(100µg/mL), 1%HY, HY-MWCNT(100µg/mL) or filled with blood clot(control). After one, three and seven days of surgery, histological and morphometric analyses were performed to evaluate the number of cell nuclei and blood vessels in the sockets. Myeloperoxidase(MPO) activity was also analyzed to quantify the extent of neutrophil accumulation in the tooth sockets. Results: The materials increased neutrophilic recruitment at 8h, but resolved the inflammatory process at 24h in the pleura. Histological and morphometric analysis and MPO activity showed no differences in the recruitment of inflammatory cell, vessels counting and neutrophil migration in tooth sockets. Conclusions: These findings suggest that HY and HY-MWCNT resolved neutrophilic inflammation in pleura of mice. However, the materials did not modulate of the inflammatory process in the early stages of bone repair of tooth sockets, excluding this action as a possible mechanism by which these biomaterials accelerate bone repair.

Suggested Reviewers: